

3 Material und Methoden

3.1 Probanden und Proben

Die Proben für diese Studie wurden aus einer Stammsammlung entnommen, die bei einer Untersuchung zur Inzidenz von VRE in der Normalbevölkerung angelegt worden war¹¹⁴. In dieser Stammsammlung waren Enterokokken-Isolate von Probanden eingefroren, die monatlich über 6 Monate Stuhlproben abgegeben hatten. Von diesen Proben war die phänotypische Resistenz gegen Vancomycin bekannt.

Die Gruppe der Teilnehmer setzte sich aus Mitarbeitern des Hygiene-Institutes der FU Berlin, deren Familienangehörigen sowie weiteren gesunden Freiwilligen ohne Labor- oder Krankenhauskontakt zusammen.

Die Sammelperiode erstreckte sich von August 1996 bis Februar 1997. Der erste Monat war entweder August oder September 1996 und dementsprechend der letzte Untersuchungsmonat Januar oder Februar 1997. Insgesamt nahmen 86 Personen an der Studie teil.

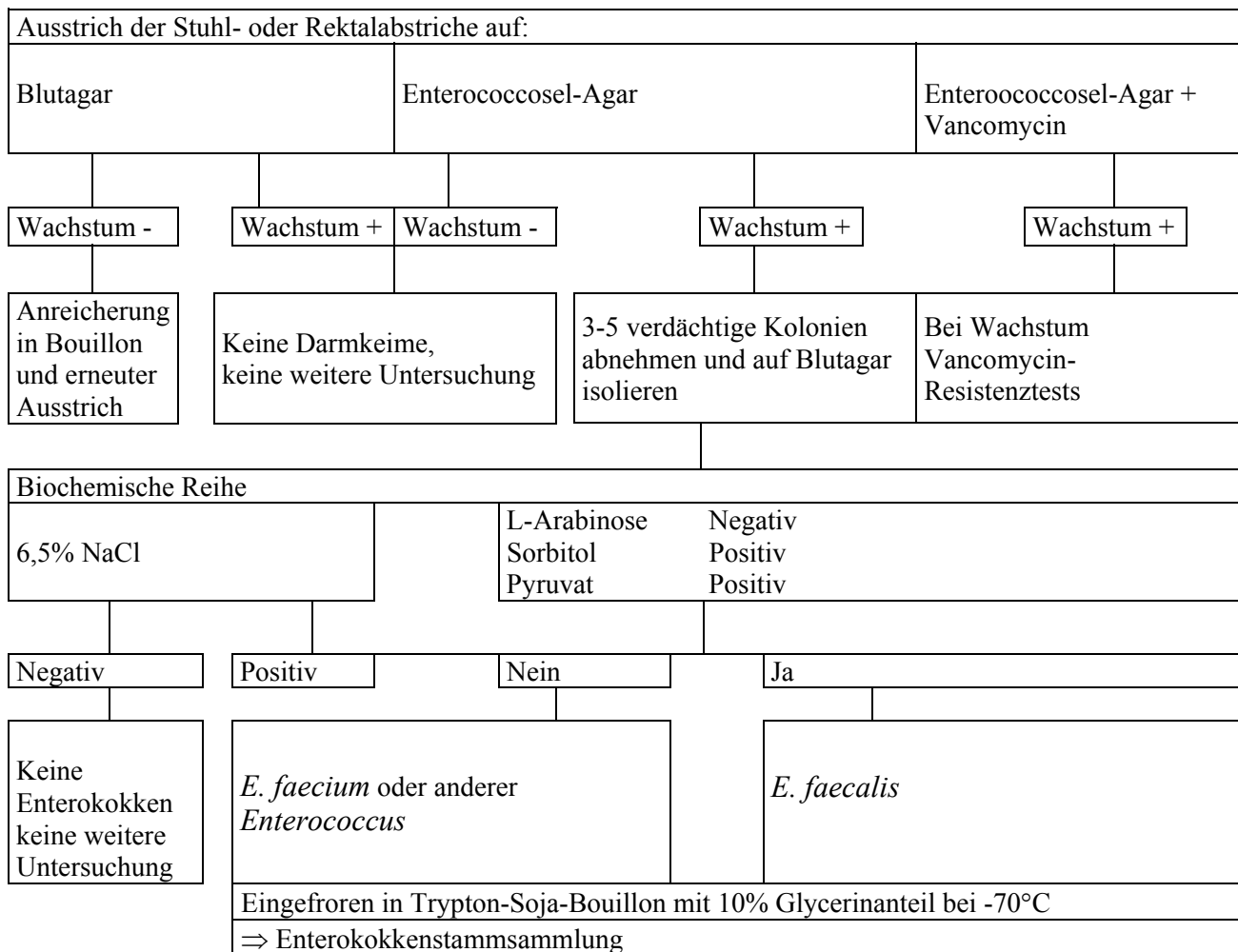
Zur Identifizierung der Enterokokken (siehe Abbildung 2) wurden die von den Probanden abgegebenen Rektalabstriche jeweils auf Enterococcosel-Agar* (ohne sowie mit Zusatz von 16µg/ml Vancomycin (bis Mitte November auch + 4µg/ml Vancomycin)) und auf Schafsblutagarplatten ausgestrichen. Bei negativem Wachstum auf der Blutplatte wurden die Abstriche nach Anreicherung in Trypton-Soja-Bouillon (TSB) erneut auf die Nährböden ausgestrichen. Bei Wachstum auf dem Enterococcosel-Agar wurde von diesen Isolaten eine biochemische Reihe durchgeführt und das Wachstum in 6,5% NaCl getestet. Die kurze biochemische Reihe bestand aus L-Arabinose, Sorbitol und Pyruvat. Alle Isolate, die nach diesem Schema als Enterokokken identifiziert werden konnten, wurden eingefroren, bis zu 5 Isolate pro Monat und Proband. Bei den Isolaten, die auf Agar mit Zusatz von Vancomycin gewachsen waren, wurden vor dem Einfrieren Resistenzbestimmungen durchgeführt. Das

* Inhaltsstoffe Enterococcosel-Agar: Pankreatisches Pepton (Casein) 17 g, Gallensalze 3 g, Hefeextrakt 5 g, Oxagall 10 g, NaCl 5 g, Natriumcitrat 1 g, Äskulin 1 g, Eisen(III)Amoniumcitrat 0,5 g, Salzsäure 0,25 g, Agar 13 g

Vorgehen ist vereinfacht in Abbildung 2 dargestellt. Zunächst wurde eine Monokultur auf Blutagarplatten hergestellt. Von dieser wurden entsprechend viele Kolonien in 2 ml 0,9 % iger steriler Kochsalzlösung eingegeben, so dass eine starke Trübung entstand. 100µl dieser Suspension wurden auf Trypton-Soja-Nährboden pipettiert und 24-48 h bei 37°C bebrütet. Der so entstandene dichte Bakterienrasen wurde mit einer Trypton-Soja-Bouillon mit 10% Glycerin abgeschwemmt und schrittweise auf -70°C eingefroren.

Diese Isolate bilden die Stammsammlung, aus denen die Proben für die vorliegende Arbeit entnommen wurden.

Abbildung 2: Schema der Entstehung der Stammsammlung (vereinfachte Darstellung)



modifiziert nach Saherwala ¹¹⁴

3.2 Auswahl der Proben und Probanden

Aus der Stammsammlung wurden Proben nach folgenden Einschlusskriterien ausgewählt:

1. Proben von Probanden, bei denen in jedem der 6 Monate mindestens ein Enterokokken-Isolat nachgewiesen wurde.
2. Alle Isolate dieser Probanden, die in der kurzen biochemischen Reihe als *E. faecium* oder andere Enterokokken (nicht klassifiziert) identifiziert worden waren. Die kurze biochemische Reihe identifiziert *E. faecalis*, *E. faecium* und andere Enterokokken. Alle als *E. faecalis* identifizierten Proben wurden nicht eingeschlossen.

Abbildung 3: Schema des Untersuchungsablaufes (vereinfachte Darstellung)

Stammsammlung (siehe Abbildung 1)			
↓			
Auswahl Probanden/Isolate		Probanden	Isolate
1. Proben von Probanden mit mindestens einem Enterokokken-Isolat b in jedem der sechs Monate	→	69	1492
2. Isolate, als <i>E. faecium</i> identifiziert	→		212
oder andere Enterokokken	→		582
Verifizierung-Methoden			
Erweiterte biochemische Reihe	} →	5	57
PCR-Methoden (EM, ddl, Multiplex)		Kontrollstämme	10
Prävalenzuntersuchung			
DDL-PCR (Nachweise <i>E. faecium</i> / <i>E. faecalis</i>)	→	69	794
Multiplex-PCR (Nachweis vanA-, vanB-, vanC1-, vanC2/3-Gen)	→	69	794
Bei Nachweis von vanA- oder vanB-Gen phänotypische Resistenztestung	→	23	109
Persistenzuntersuchung			
Probanden mit genotypischen Nachweis von <i>E. faecium</i>			
Fingerprintuntersuchungen mit M13 und AP4+ERIC	→	59	379

3.3 Aufarbeitung der Proben

Mit Hilfe einer Öse wurde von der eingefrorenen Bakteriensuspension etwas Material abgenommen und auf eine Blutagarplatte fraktioniert ausgestrichen. Diese wurde für 24 h bei 37°C bebrütet. Bis zur weiteren Verarbeitung der Isolate folgten zwei weitere Passagen über Schafsblutagarplatten.

Bei untypischem Wachstum oder Verunreinigung folgte eine Passage auf Äsculin-Acid-Agar. Die Platten wurden bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlraum bei 4°C gelagert, vor weiteren Untersuchungen aber erneut auf Blutagarplatten überimpft.

3.4 Prävalenzuntersuchung der Resistenzgene

Die Speziesdifferenzierung mit der kurzen biochemische Reihe ist insbesondere für die Differenzierung von *E. faecium*, *E. gallinarum* und *E. casseliflavus*/*E. flavescens* nur unzureichend, daher wurde die Speziesdiagnostik mit Hilfe der PCR durchgeführt. Die verschiedenen Methoden wurden zur Überprüfung an Proben und Kontrollstämmen getestet und mit einer erweiterten biochemischen Reihe verglichen.

3.4.1 Erweiterte biochemische Reihe

Zur Speziesdifferenzierung von Enterokokken wird klassischerweise das unterschiedliche Hydrolyse-Verhalten von Zuckern verwendet. Von den Isolaten lag bereits das Ergebnis der kurzen biochemischen Reihe vor (Abbildung 2). Damit konnte der Ausschluss von *E. faecalis* und einiger weiterer Enterokokken vorgenommen werden. Insbesondere aber die Differenzierung zwischen *E. faecium* und *E. gallinarum* bzw. *E. casseliflavus*/*E. flavescens* konnte mit diesen Reaktionen nicht getroffen werden. Zusätzlich wurden daher die Reaktionen mit Raffinose und α -Methyl-D-Gluco-Pyranosidase eingeführt^{115,116}. In Tabelle 1 sind die typischen Reaktionen dargestellt. Diese Reaktionen wurden zur Kontrolle der Spezies spezifischen PCR, die nachfolgend noch erläutert wird, angewendet.

Tabelle 1: Biochemische Reihe zur Spezies-Differenzierung von Enterokokken

<i>Spezies</i>	<i>L-Arabinose</i>	<i>Sorbitol</i>	<i>Pyruvat</i>	<i>Raffinose</i>	<i>α-Methyl-D-Glucopyranosidase</i>
	Gelb Blau	Gelb Blau	Gelb Blau	Gelb Blau	Gelb Rot
<i>E. avium</i>	+	+	+	-	+
<i>E. malodoratus</i>	-	+	+	+	-
<i>E. raffinosus</i>	+	+	+	+	+
<i>E. pseudoavium</i>	-	+	+	-	+
<i>E. saccharolyticus</i>	-	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i>	-	+	+ *	-	-
<i>E. faecium</i>	+	V	-	V	-
<i>E. casseliflavus/ E. flavescens</i>	+	V	V	+	+
<i>E. mundtii</i>	+	V	-	+	-
<i>E. gallinarum</i>	+	-	-	+	+
<i>E. durans</i>	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	-	-	-	V	-
<i>E. dispar</i>	-	-	+	+	+
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	+	+
<i>E. cecorum</i>	-	+	+	+	-
<i>E. columbae</i>	+	+	+	+	-

*in <3% auch negativ

V=variabel

Modifiziert nach Teixeira ¹¹⁷.

Die Zuckerlösung wurde jeweils auf 20% angesetzt und sterilisiert. Verwendet wurden 1%ige Lösungen. Die Zusammensetzung der benutzten Medien ist in Tabelle 2 dargestellt.

Die Reaktionen werden durch Farbumschlag, der bei Hydrolyse des Zuckers durch Reaktion mit dem Indikator eintritt, sichtbar. Die jeweiligen Farbumschläge sind in Tabelle 1 angegeben. Die Reaktionen wurden in Mikrotiterplatten (200 µl) durchgeführt. Dazu wurde eine TS-Bouillon mit wenigen Kolonien beimpft und für 24 h bei 36°C ± 1°C bebrütet. Aus der Bouillon wurden 10 µl in jede Vertiefung der Mikrotiterplatten überführt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Zuckerlösungen

A) Für die Zucker L-Arabinose, Raffinose und D-Sorbitol

Reagenz	Menge	Bezugsfirma
Blut Pepton (Bacto Pepton)	10 g	Difco
NaCl	5 g	Merck
Aqua dest.	Ad 1000 ml	
Bromkresolpurpur-Lösung (0,33 g in 20ml Alkohol + 80 ml Aqua dest.)	5 ml	Merck

B) Für die Methyl- α -D-Glucopyranosidase-Fermentation

Reagenz	Menge	Bezugsfirma
Phenolrot-Bouillon (Basis)	0,33 g in 100 ml	Difco
Methyl- α -D-Glucopyranosidase	1% Lösung	Fluka

C) Für die Pyruvat-Fermentation

Reagenz	Menge	Bezugsfirma
Tryptone Difco (Trypton)	5,0 g	Difco
Yeast Extract Difco (Hefeextrakt)	2,5 g	Difco
NaCl	2,5 g	Merck
K ₂ HPO ₄	2,5 g	Merck
Na-Pyruvat	5,0 g	Merck
Bromthymolblau (0,2 % Lösung)	10 ml	Merck
Müller-Hinton-Agar	6,0 g	Oxoid
Aqua dest.	Ad 500 ml	

3.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

DNA-Extraktion von Enterokokkenreinkulturen

Um eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchführen zu können, muss zunächst die DNA isoliert werden. Die Isolate für die Extraktion der DNA wurden von Blutagarplatten entnommen, die 24h bebrütet waren. Mehrere Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze aufgenommen, in 50 ml Lysozym-Lösung eingerieben und 15 min bei 37°C leicht geschüttelt. Dadurch wird die Mureinschicht der Enterokokken aufgelöst, indem die Disaccharidbrücken gespalten werden. Die Suspension wurde 6 min bei 6000 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert. Das so entstandene Pellet wurde in 100 µl NaOH-SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)-Gebrauchslösung suspendiert. NaOH-SDS-Gebrauchslösung wurde aus 2 g NaOH in 100 ml 2,5% SDS-Lösung in einer Verdünnung von 1:10 hergestellt. Die Suspension wurde bei 95°C 15 min inkubiert und mit 600 U/min geschüttelt. Dadurch werden proteolytische Enzyme zerstört¹¹⁸. Durch Zentrifugation (15 sec bei 6000 U/min) wurden größere Zellbruchstücke von den leichteren (auch der DNA) getrennt, die leichteren blieben in der Oberschicht. Aus der Oberschicht wurden 20 µl abpipettiert und mit 180 µl aqua bidest. gemischt.

Die DNA-Extrakte wurden entweder am gleichen Tag in der nachfolgenden PCR eingesetzt, bzw. für maximal 7 Tage bei 4°C aufbewahrt oder aber bei -20°C gelagert.

PCR-Reaktion

Die PCR-Reaktion ist eine hoch sensitive Methode zum Nachweis von DNA-Sequenzen. Sie amplifiziert DNA-Abschnitte. Drei Reaktionen sind zu einem Zyklus verbunden, der 20-40 mal wiederholt wird. Bei jedem Durchlaufen des Zyklus wird dabei theoretisch die Anzahl der Kopien des Zielfragmentes verdoppelt. Die drei Reaktionen der PCR sind folgendermaßen aufgebaut:

Denaturierung der DNA: Die doppelsträngigen DNA-Moleküle werden bei Temperaturen von 92-96°C in Einzelstränge getrennt.

Hybridisierung oder Annealing der Primer: Synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer), die das gewünschte Zielfragment der DNA einrahmen, lagern sich bei entsprechender Hybridisierungs-Temperatur (zwischen 37-68°C, in Abhängigkeit der Basensequenz) an die

komplementären Sequenzbereiche der Einzelstränge an. Sie dienen als Startpunkte für die nachfolgende Synthesereaktion.

Elongation: Es folgt die Synthese eines neuen DNA-Stranges bzw. die Elongation. Dies erfolgt bei 72°C, dem Temperaturoptimum der hitzestabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*¹¹⁹. Dazu wurde die AmpliTaq® DNA Polymerase von Perkin Elmer verwendet. Die Elongation geht von dem Startermolekül (dem Primer) aus. Die Primermoleküle werden so Bestandteile der neuen DNA-Stränge. Als Endprodukt der Reaktion entstehen doppelsträngige DNA-Moleküle.

Nach 20-40 maliger Wiederholung dieser Zyklen wird zum Abschluss der Reaktion noch einmal eine Elongationsphase angeschlossen, um die DNA-Stränge zu komplettieren.

Mehrere Primerpaare können in einem Reaktionsansatz verwendet werden, wenn die einzelnen Primer nicht interagieren, bzw. nicht die gleiche Zielfragmente haben. Diese Methode nennt man Multiplex-PCR. Die im Folgenden noch beschriebene PCR zum Nachweis der Vancomycin-Resistenzgene wurde als Multiplex-PCR durchgeführt.

Für alle durchgeführten PCR wurden die Primer von einem kommerziellen Hersteller (TIP Molbiol, Berlin) bezogen. Alle PCR-Reaktionen wurden in dem Thermocycler GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) durchgeführt.

Größenbestimmung doppelsträngiger DNA-Moleküle mittels Agarose-Gel-Elektrophorese

Um die multiplizierten DNA-Fragmente sichtbar machen zu können, werden die Amplifikate in einem Agarose-Gel aufgetrennt. In einem elektrischen Feld wandern bei neutralem pH negativ geladene DNA-Fragmente von der Kathode zur Anode. Findet diese Wanderung durch die Poren eines Agarose-Gels statt, so werden größere Fragmente stärker in ihrer Mobilität gehindert als kleinere, woraus sich die Auftrennung eines Gemisches aus DNA-Molekülen nach ihrer Größe ergibt. Ethidiumbromid interagiert mit DNA-Molekülen und fluoresziert im ultravioletten (UV) Licht. Durch Zusatz dieser Substanz im Laufpuffer können daher die aufgetrennten Nukleinsäuren unter UV-Licht nachgewiesen werden.

In die Elektrophoresekammer wurden auf 1000 ml Tris-Borat-Puffer* 100 µl Ethidiumbromid-Lösung gegeben.

* Tris-Borat-Puffer: 1x TBE (Tris-Borat-Elektrophorese)-Laufpuffer (pH=8): 10,78 g Tris (Trishydroxymethyl-aminomethan) 5,4 g Borsäure 0,1 g Na₂-EDTA (Dinatriumethan) auf 1 l Aqua dest.

Anhand der gleichzeitigen Auftrennung von DNA-Standards bekannter Basenpaarlänge in der Gel-Elektrophorese wird die Bestimmung der Basenpaarlänge in den untersuchten Proben ermöglicht. Die Gel-Elektrophorese folgte dem modifizierten Protokoll von Sharp et al.¹²⁰.

Um die DNA in den dafür vorgesehenen Geltaschen zu halten und die bereits gefüllten Taschen zu erkennen, wurde zu jedem PCR-Produkt 2 µl Blaumarker^{**} zugegeben.

Zum Nachweis der PCR-Amplifikate wurde ein 1,5 %iges Agarose-Gel verwendet. Dafür wurden 7,13 g Agarose in 375 ml Aqua dest. geschmolzen. Die Elektrophorese wurde in einer horizontalen Biorad-Maxigelkammer bei einer Spannung von 5 V/cm durchgeführt. Dazu wurden 8 µl der PCR-Amplifikate mit 2 µl Blaumarker versetzt und in die vorbereiteten Taschen des Agarose-Gels pipettiert. Zur Abschätzung der Basenpaarlänge der Amplifikate wurden 5 µl der standardisierten Längenmarker (Sigma Bio Science Marker (50-2000bp)) parallel aufgetragen. Fluoreszierende Banden wurden im durchscheinenden ultravioletten Licht (Wellenlänge: 254 nm) dargestellt. Dokumentiert wurden die Banden mit Polaroidphotos (Polaroid von Biorad, Blende 16) und mit einem Video Dokumentations-System (BioDocII, Biometra), das die Bilder auf Thermopapier ausdruckt und auf Disketten speichert. In dem Dokumentations-System wurde die Einstellung für die Belichtung, Kontrastschärfe und Blende konstant beibehalten.

3.4.3 PCR zur Spezies- und Resistenzgen-Bestimmung

Zwei verschiedene spezies-spezifische PCR-Verfahren zum Nachweis von *E. faecium* wurden identifiziert: das Protokoll von Cheng¹²¹ zum Nachweis von *E. faecium* (EM) und das von Dutka-Malen et al.^{122,123} für *E. faecalis* und *E. faecium* (ddl). Die *E. faecalis* Komponente wurde bei dem Protokoll von Dutka-Malen et al.^{122,123} beibehalten. Während Cheng¹²¹ ein für *E. faecium* spezifisches Plasmid als Zielfragment benutzt, wurde von Dutka-Malen et al.^{122,123} das Gen für die D-Ala:D-Ala Ligase (ddl) als Zielgen verwendet. Wir testeten beide Methoden und verglichen die Ergebnisse untereinander sowie mit den Ergebnissen der biochemischen Reihe. Die verwendeten Protokolle sind in den Tabellen 3 und 4 dargestellt.

^{**} Blaumarker: 3 mg Bromphenolblau, 4 g Saccharose, 40 mg EDTA ad 10 ml aqua bidest

Tabelle 3: PCR-Protokoll zum Nachweis von *E. faecium* mit EM Primer

Primer	Gen	Aminosäuresequenz	Produkt
EM1A	EM faecium	5' TTG AGG CAG ACC AGA TTG ACG	658bp
EM2B		5' TAT GAC AGC GAC TCC GAT TCC	
Reaktionsansatz			
Bestandteile		Menge	
Aqua bidest.		Ad 25 µl	
10x Perkin Elmer Puffer (10 mM Tris-HCL, 75 mM KCL, pH8,3)		2,5 µl	
MgCl ₂		3,5 mM	
Primer		je 200 µM	
DNA		25 ng	
Polymerase AmpliGen®		0,5 U	
Temperaturschema			
PCR-Schritt	Wiederholung	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1x	94°C	2 min
Denaturierung	} 25x	94°C	1 min
Primeranlagerung		58°C	2 min
Extension		72°C	2 min
Extension	1x	72°C	5 min
Positiv- und Negativ-Kontrollen			
<i>E. faecalis</i>		DSM 2570/ATCC29212	
<i>E. faecium</i>		DSM 2146/ATCC 6047	

Tabelle 4: PCR-Protokoll zum Nachweis von *E. faecium* und *E. faecalis* mit ddl-Primern

Primer	Gen	Aminosäuresequenz	Produkte
F1	ddl faecium	5' GCA AGG CTT CTT AGA GA	
F2		5 CAT CGT GTA AGC TAA CTT C	550 bp
E1	ddl faecalis	5' ATC AAG TAC AGT TAG TCT T	
E2		5' ACG ATT CAA AGC TAA CTG	941 bp

Reaktionsansatz

Bestandteile	Menge
Aqua bidest.	Ad 50 µl
10x Perkin Elmer Puffer (10 mM Tris-HCL, 75 mM KCL, pH 8,3)	5 µl
MgCl ₂	5,5 mM
Primer	Je 500 nM
DNA	2,5 ng
Polymerase AmpliTaq®	2 U

Temperaturschema

PCR-Schritt	Wiederholung	Temperatur	Zeit
	1x	94°C	2 min
Denaturierung	} 30x	94°C	1 min
Primeranlagerung		54°C	1 min
Extension		72°C	1 min
Extension	1x	72°C	10 min

Positiv- und Negativ-Kontrollen

<i>E. faecalis</i>	DSM 2570/ATCC29212
<i>E. faecium</i>	DSM 2146/ATCC 6047

Für die genotypische Vancomycin-Resistenzen-Bestimmung mit der PCR benutzten wir eine Kombination der Protokolle von Dutka-Malen et al.^{122,123} und von Patel et al.¹²⁴.

Die Resistenzgene vanC1 und vanC2/3 sind intrinsische Resistenzen des *E. gallinarum* bzw. des *E. casseliflavus/E. flavescens*^{16,125,126}, daher wurden diese, neben dem Nachweis der Resistenz, auch zur Speziesbestimmung eingesetzt. Das Protokoll ist in Tabelle 5 beschrieben. Die Bestimmung der Spezies und Resistenz erfolgte nach dem Schema in Tabelle 6.

Tabelle 5: Multiplex-PCR-Protokoll: Nachweis von vanA-, vanB-, vanC1- und vanC2/3-Gen

Primer	Gen	Aminosäuresequenz	Produkte
VanA For	vanA	CAT GAC GTA TCG GTA AAA TC	885 bp
VanAB-Rev II		ACC GGG CAG RGT ATT GAC	
VanB1	vanB	ATG GGA AGC CGA TAG TC	635 bp
VanB2		GAT TTC GTT CCT CGA CC	
VanC1-For	vanC1	GAT GGC WGT ATC CAA GGA	467 bp
VanC1-Rev		GTG ATC GTG GCG CTG	
VanC2/3-For	vanC2/3	ATC GAA AAA GCC GTC TAC	429 bp
VanC23-Rev		GAT GGC WGT ATC CAA GGA	

Reaktionsansatz

Bestandteile	Menge
Aqua bidest.	Ad 50 µl
10x Perkin Elmer Puffer (10 mM Tris-HCL, 75 mM KCL, pH8,3)	5 µl
MgCl ₂	1,5 mM
Primer	je 500 nM
DNA	2,5 ng
Polymerase AmpliTaq®	1,2 U

Temperaturschema

PCR-Schritt	Wiederholung	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1x	94°C	2 min
Denaturierung	} 30x	94°C	1 min
Primeranlagerung		54°C	1 min
Extension		72°C	1 min
Extension	1x	72°C	10 min

Positiv-, und Negativ-Kontrollen

Referenzstämme von

<i>E. casseliflavus</i> für vanC2/3-Gen	NRZ Wernigerode
<i>E. gallinarum</i> für vanC1-Gen	NRZ Wernigerode
<i>E. faecalis</i> mit vanB-Gen	NRZ Wernigerode
<i>E. faecium</i> mit vanA-Gen	NRZ Wernigerode

Tabelle 6: Einteilung der Spezies und Resistenzen

ddl-PCR		Multiplex-PCR Resistenzgenachweis				Ergebnis
ddl F	ddl E	vanA	vanB	vanC1	vanC1/2	
+	-	-	-	-	-	= <i>E. faecium</i> sensibel
+	-	+	+	-	-	= <i>E. faecium</i> resistent
-	+	-	-	-	-	= <i>E. faecalis</i> sensibel
-	+	+	+	-	-	= <i>E. faecalis</i> resistent
-	-	-	-	+	-	= <i>E. gallinarum</i>
-	-	-	-	-	+	= <i>E. casseliflavus/E. flavescens</i>
-	-	-	-	-	-	= andere <i>Enterococcus</i> spp.

3.4.4 Methodenverifizierung

Methodenverifizierung an Kontrollstämmen

Alle PCR-Protokolle wurden an 10 Referenzstämmen mit bekannter Spezies und Resistenz durchgeführt. Die Stämme mit bekannter Spezies und Resistenz zeigten bei der Untersuchung der Spezies mit den ddl-Primern und der Multiplex-PCR zur Identifikation der Resistenzgene die entsprechenden Banden. Bei der Untersuchung der Kontrollstämmen mit den EM-Primern reagierten nicht alle *E. faecium*-Kontrollen entsprechend (Tabelle 7). Die Sensitivität ließ sich auch durch Veränderung der Zeiten und Zusammensetzung des PCR-Ansatzes nicht erhöhen.

Tabelle 7: Kontrollstämmen zur Methodenverifizierung

Bezeichnung des Stammes	Spezies/Resistenz	ddl	EM	Multiplex
NRZ Stamm 1	<i>E. faecium/vanA-Gen</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	VanA
NRZ Stamm 2	<i>E. faecalis/vanA-Gen</i>	<i>E. faecalis</i>	0	VanA
NRZ Stamm 3	<i>E. faecium/vanB-Gen</i>	<i>E. faecium</i>	0	VanB
NRZ Stamm 4	<i>E. faecalis/vanB-Gen</i>	<i>E. faecalis</i>	0	VanB
NRZ Stamm 5	<i>E. gallinarum</i>	0	0	VanC1
NRZ Stamm 6	<i>E. casseliflavus</i>	0	0	VanC2/3
ATCC 10541/DSM 3320	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	0	0
ATCC 6057/DSM 2146	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	0
ATCC 14506/DSM 2981	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	0	0
ATCC 19433/DSM 20478	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	0	0

0= Kein Bandennachweis

Methodenverifizierung erweiterte biochemische Reihe/PCR-Methoden

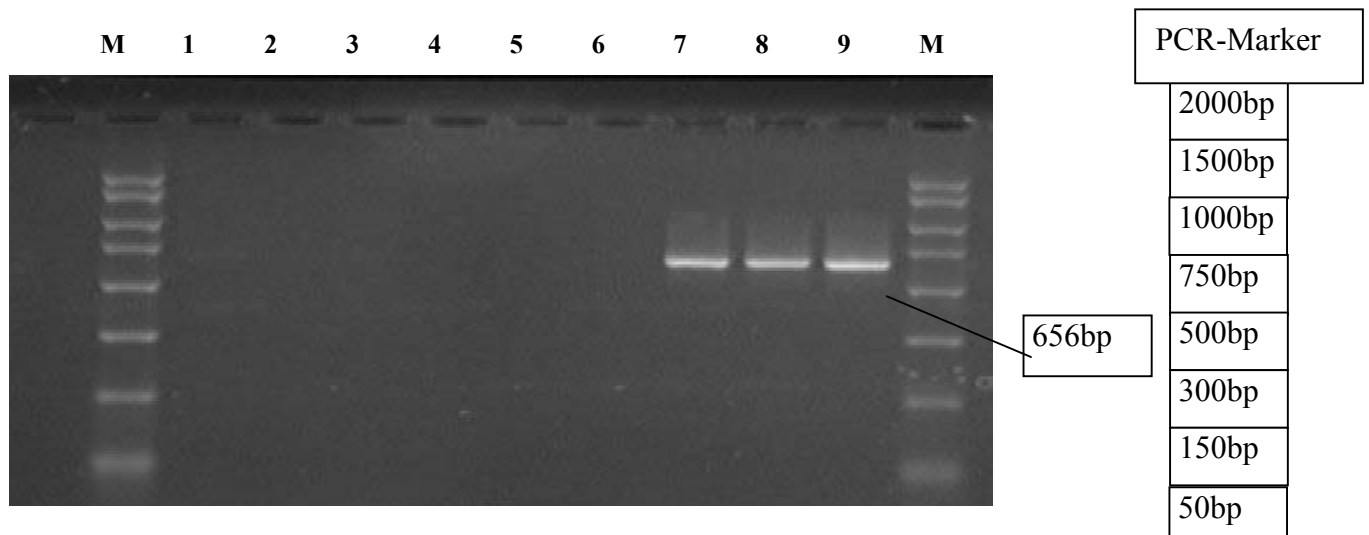
Zusätzlich zur Untersuchung der Kontrollstämme wurden die PCR-Methoden und die erweiterte biochemische Reihe an 57 Proben (5 Probanden) untersucht und verglichen

Auch hier zeigte sich, dass der EM-Primer nicht immer reagierte, wenn von der biochemischen Reihe ein *E. faecium* identifiziert worden war. Von 24 in der biochemischen Reihe als *E. faecium* erkannten Isolaten waren nur 15 auch EM positiv (Tabelle 8). Es reagierten nur Isolate mit dem EM-Primer, wenn sie auch in der erweiterten biochemischen Reihe als *E. faecium* identifiziert worden waren. Ein Beispiel einer EM-PCR Gel-Elektrophorese ist Abbildung 4 dargestellt.

Tabelle 8: Vergleich Biochemische Reihe und EM-PCR

	Biochemische Reihe					Gesamt
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	Sonstige	
EM-negativ	9	13	2	15	3	42
EM- <i>E. faecium</i>	15	0	0	0	0	15
Gesamt	24	13	2	15	3	57

Abbildung 4: Bild einer Gel-Elektrophorese EM-PCR



Beispiel einer elektrophoretischen Auftrennung für 9 PCR-Produkte mit EM-Primer. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 656bp. M: ist der DNA-Längenstandard, die jeweiligen bp sind rechts angegeben. In den Laufspuren 1-6 sind negative Ergebnisse, wobei in der 6. Spur ein *E. faecium* Referenzstamm ist, in den Spuren 7-9 sind ebenfalls *E. faecium* Referenzstämme.

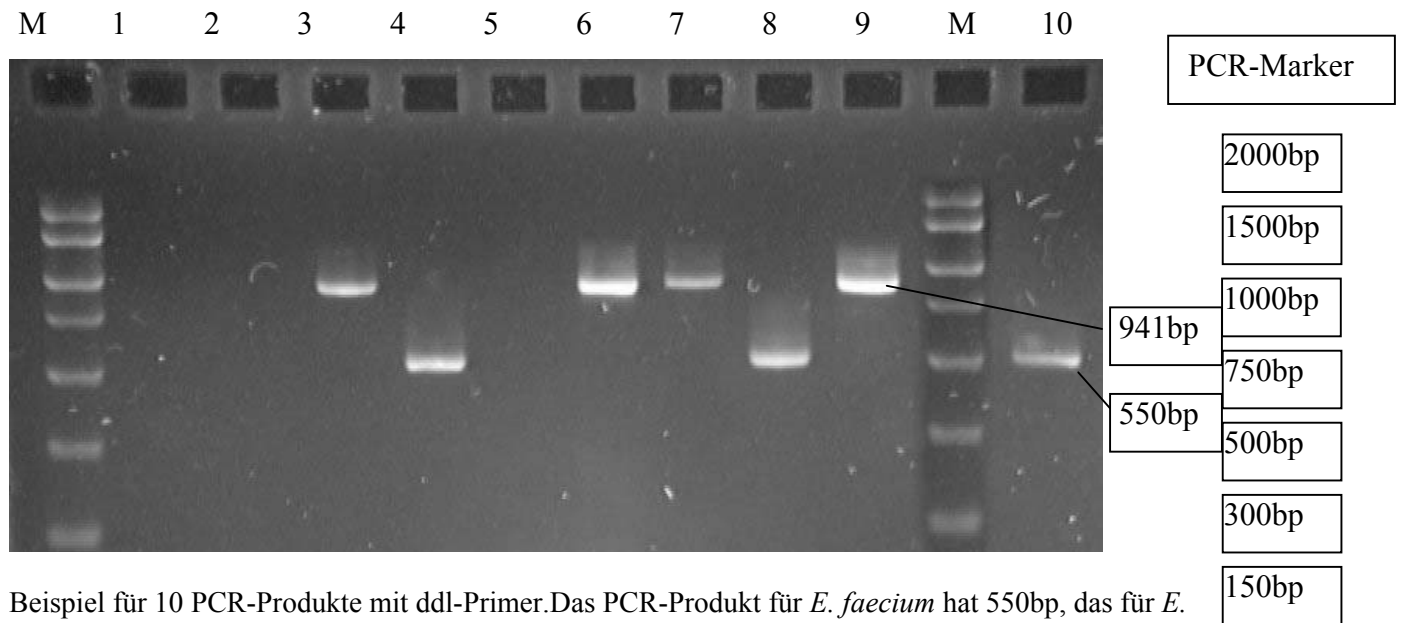
Im Gegensatz dazu reagierte die ddl-PCR auch hier entsprechend den Ergebnissen der biochemischen Reihe. Da die Multiplex-PCR durch den Nachweis von vanC1 und vanC2/3 auch zur Speziesidentifizierung eingesetzt wurde (Tabelle 6), wurden die Ergebnisse ebenfalls mit den Ergebnissen der biochemischen Reihe verglichen. Der Vergleich der Ergebnisse der ddl-PCR und der Multiplex-PCR mit der biochemischen Reihe zeigte bei den 57 getesteten Proben eine 100%ige Übereinstimmung (Tabelle 9). Beispiele einer ddl- und Multiplex-Gel-Elektrophorese sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die ddl-PCR und die Multiplex-PCR als Methode für die Spezies- und Resistenzgenbestimmung benutzt.

Tabelle 9: Vergleich biochemische Reihe und ddl-PCR mit Multiplex-PCR

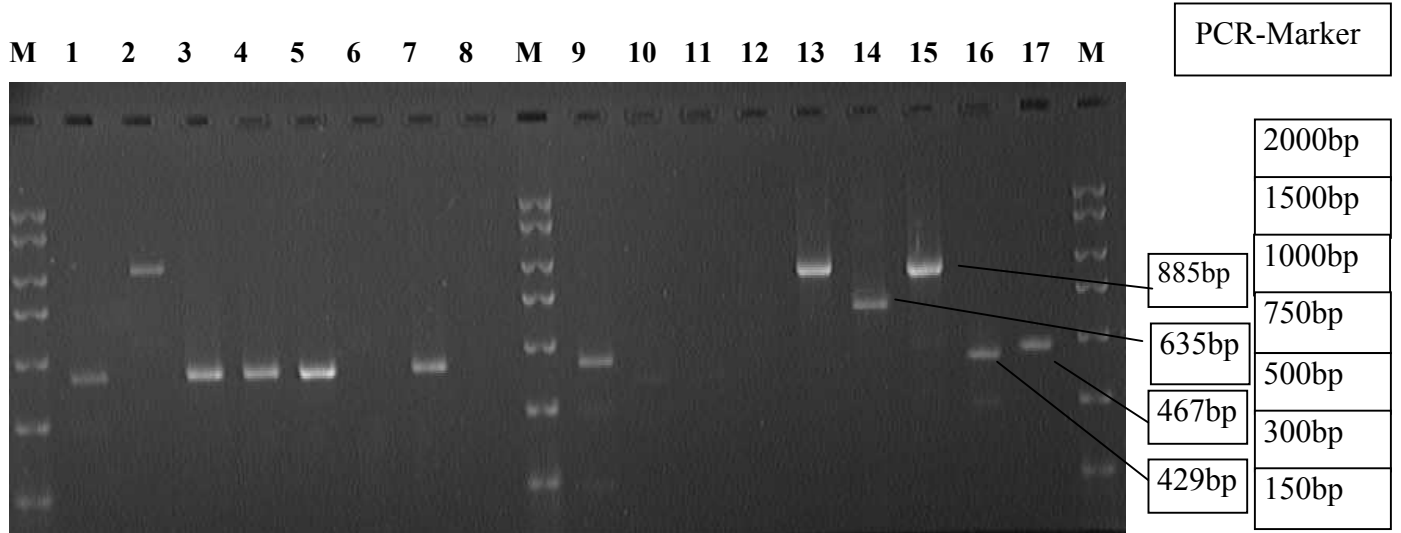
Biochemische Reihe	Spezies nach ddl- und Multiplex-PCR					
	Ddl-PCR		Multiplex-PCR		Ddl und Multiplex PCR	
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus/ E. flavescens</i>	Kein Nachweis	Gesamt
<i>E. faecium</i>	24	0	0	0	0	24
<i>E. faecalis</i>	0	13	0	0	0	13
<i>E. gallinarum</i>	0	0	2	0	0	2
<i>E. casseliflavus/ E. flavescens</i>	0	0	0	15	0	15
Nicht identifiziert	0	0	0	0	3	3
Gesamt	24	13	2	15	3	57

Abbildung 5: Bild einer Gel-Elektrophorese der ddl-PCR



Beispiel für 10 PCR-Produkte mit ddl-Primer. Das PCR-Produkt für *E. faecium* hat 550bp, das für *E. faecalis* von 941bp. M: ist der DNA-Längenstandard. In den Laufspuren 3,6,7 und 9 sind *E. faecium*-Produkte nachgewiesen worden, in den Laufspuren 4,8 und 10 *E. faecalis* Produkte. Dabei waren in den Spuren 8 und 9 jeweils die Kontrollstämme. Die übrigen Spuren zeigen negative Ergebnisse.

Abbildung 6: Bild einer Gel-Elektrophorese der Multiplex-PCR



Beispiel für 17 PCR-Produkte mit Multiplex-Primern. Das PCR-Produkt für das vanA-Gen ist 885 bp, für das vanB-Gen 635 bp, für das vanC1-Gen 467 bp und vanC2/3-Gen 429 bp; M: ist der DNA-Längenstandard. In den Laufspuren 14-17 befinden sich Referenzstämme, *E. faecium* mit vanB-Gen, *E. faecium* mit vanA-Gen, *E. casseliflavus/E. flaveszens* und *E. gallinarum*. In den Spuren 1,3,4,5,7 und 9 wurden jeweils *E. casseliflavus/E. flaveszens* nachgewiesen. In der Laufspur 2 und 13 jeweils ein vanA-Gen tragendes Isolat. Bei den übrigen Isolaten wurde kein Resistenzgen nachgewiesen.

3.4.5 Phänotypische Resistenzbestimmung

Zur Untersuchung, ob bei phänotypisch sensiblen Enterokokken Resistenzgene vorhanden sind, wurden die Ergebnisse der phänotypischen Resistenzbestimmung mit der genotypischen Resistenz-Bestimmung verglichen. Die phänotypischen Resistenzbestimmungsergebnisse wurden, wenn vorhanden, aus der Inzidenzuntersuchung ¹¹⁴ übernommen. Bei vanA-Gen-Nachweis ohne phänotypisches Untersuchungsergebnis wurde die entsprechende phänotypische Resistenzgenbestimmung durchgeführt.

Resistenzbestimmung mit Disk-Diffusion

Die Disk-Diffusion wurde mit klassischen Plättchen und mit so genannten E-Test-Streifen (Firma Via-Diagnostik) durchgeführt. Die E-Test-Streifen geben unterschiedliche Menge der Antibiotikasubstanz an den verschiedenen Höhen ab. Durch dieses Verfahren kann auch eine Quantifizierung der Antibiotika-Resistenz angegeben werden.

Von Blutagarplatten wurden Kolonien mit Tupfer abgenommen und in Standard II Bouillon eingerieben. Die Suspension wurde auf McFarland-Standard 0,5 durch Vergleich mit einem Standardröhrchen eingestellt, entsprechend etwa 10^8 KBE/ml. Diese Suspension wurde auf Müller-Hinton-Agar mit einem Tupfer ausgestrichen. Jedes Vancomycintestplättchen (30 µg) wurde auf eine halbe Platte, die E-Tests-Streifen auf eine Platte gelegt.

Die Ablesung erfolgt nach ca. 16 h in einem Auflichtmikroskop. Gewertet wurde die Zone vollständiger Hemmung; vereinzelte, kleinste Kolonien im Hemmhof wurden nicht gewertet.

Wertung der Hemmhofgröße nach Disk-Diffusion für Vancomycin

Sensibel	≥ 16 mm
Intermediär	15-16 mm
Resistent	≤ 14 mm

Wertung der E-Test-Ergebnisse für Vancomycin

Sensibel	>16 µg/ml
Intermediär	8-16µg/ml
Resistent	<8 µg/ml

Bestimmung der Minimalen-Hemm-Konzentration

Die Bestimmung der Minimalen-Hemm-Konzentration (MHK) wurden in BioTest©-Platten durchgeführt. Aus der auf McFahrlandStandard eingestellte Suspension wurden 0,5 ml in ein Set-Röhrchen mit vom Hersteller vorgegebener Inokulum-Verdünnung pipettiert.

Durch die Benutzung des Inokulators werden durch Kapillarkräfte in jeden Stift 5 µl des Inokulums aufgenommen und in die auf der BioTest©-Platten vorgesehene Vertiefung übertragen. Auf den Platten befinden sich Vancomycin und Teicoplanin in je 11 Konzentrationen von 0,5 bis 512 µg/ml. In der mittleren Reihe befinden sich zwei Vertiefungen mit Basismedium zur Wachstumskontrolle (W). Zur Kontrolle für Mischkulturen ist in dem Medium LANA (L-Alanin-p-Nitroanilidhydrochlorid) zugegeben. Bei Mischkulturen mit gramnegativen Keimen wird die Kontrolle gelb.

Die Platten wurden bei 35-37°C über 24h bebrütet. Gewertet wurden nur Platten, bei denen die Wachstumskontrolle positiv war und keine Mischkultur angezeigt wurden. Die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der kein Wachstum erkennbar ist, entspricht der MHK.

3.5 Persistenz der *E. faecium* Stämme

Für die Untersuchung der Persistenz der *E. faecium*-Isolate wurden nur die Isolate untersucht, die in der ddl-PCR-Untersuchung zur Identifizierung von *E. faecium* positiv waren.

3.5.1 Typisierung von *E. faecium* mittels PCR

Zur Identifizierung und Unterscheidung der *E. faecium*-Stämme haben wir zwei Zufalls-PCR benutzt. Diese arbitrarily primed PCR oder auch randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) ist eine Methode zur Darstellung von genetischen Fingerabdrücken¹²⁷. Die dabei verwendeten Primer binden an keinen spezifischen Genbereich. Zwei Zufalls-PCR wurden benutzt, die erste mit dem M13-Primer, die zweite mit einer Kombination aus ERIC1 (Enterobakterielle Repetitive Intergenic Consensus) und AP4. Diese Kombination von Primern hat sich in der Typisierung von *E. faecium* als geeignet erwiesen¹²⁸.

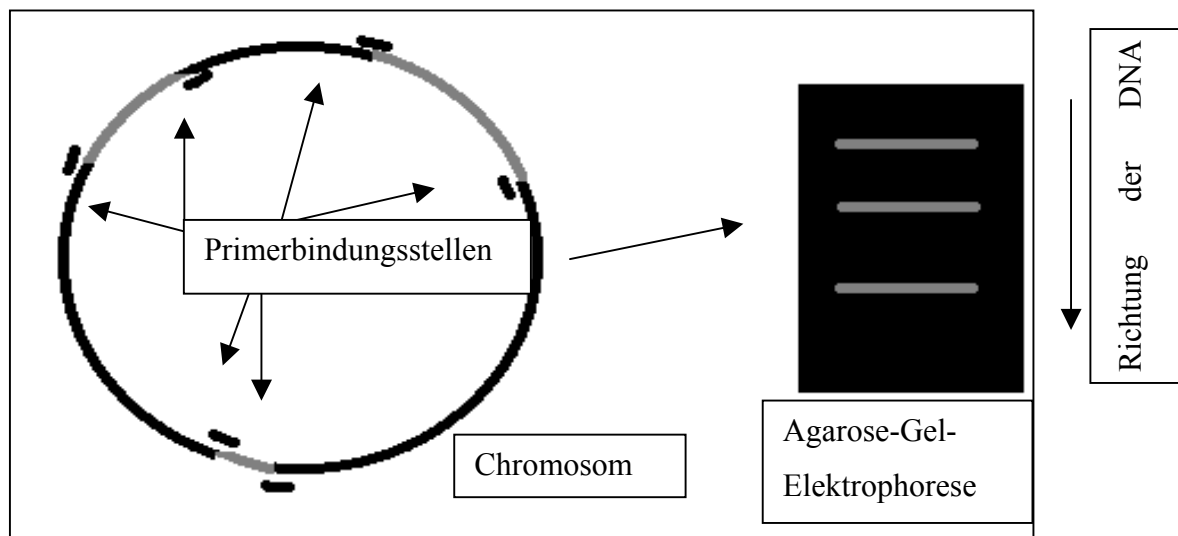
Niedrige Bindungstemperaturen erlauben, dass der Primer an vielen Stellen des Genoms bindet. Wird die Synthese gestartet und hat eine weitere Kopie des Primers an einer Stelle in der Nähe in die entgegengesetzte Richtung eine Synthese begonnen, entstehen so DNA-Fragmente

unterschiedlicher Größe, die in den weiteren Schritten der PCR multipliziert werden (Abbildung 7). Die entstehenden Bandenmuster, auch Fingerprints genannt, werden in der Gel-Elektrophorese dargestellt. Diese Fingerprints sind für jeden Stamm charakteristisch und ermöglichen, Isolate zu vergleichen und als Stämme einzuteilen. Um gleichbleibende Bedingungen zu garantieren, wurden die Isolate eines Probanden in einer PCR-Reaktion untersucht und möglichst auf ein Gel aufgetragen. Bei Wiederholungsuntersuchungen wurden stets einige der bereits untersuchten Stämme erneut mituntersucht. Bei jedem PCR-Ansatz wurde ein Referenzstamm mitgeführt.

Für diese PCR-Reaktion wurde die extrahierte DNA in standardisierte 25 µl Reaktionsgefäße gegeben. In diesen liegen die zur PCR benötigten Chemikalien in getrockneter Form bereits vor. Benutzt wurden die Ready To Go RAPD -beads von Pharmacia Biotech. Durch den Zusatz von Stoffel-Fragment in den RAPD beads werden in der Zufalls-PCR kleinere PCR-Produkte mit höherer Reproduzierbarkeit und besserer Auflösung im Gel erzeugt^{129,130}.

Zu den oben beschriebenen Ready To Go RAPD wurden jeweils die Primer, 2,5 ng DNA und Aqua bidest. ad 25µl gegeben. Für die PCR mit M13 wurden 2000 nM Primer hinzugegeben, für die Reaktion mit ERIC1+AP4 je 400 nM Primer. Die Protokolle sind in Tabelle 10 dargestellt.

Abbildung 7: Prinzip der Zufalls-PCR



Nach Tenover et al¹³¹

Tabelle 10: PCR-Protokoll Typisierung von *E. faecium*

Primer Basensequenz

AP4	TCA CGC TGC A
ERIC1	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C
M13	GAG GGT GGC GGT TCT

Reaktionsansatz

Bestandteile Ready To Go RAPD-beads	Menge
AmpliTaq ® DNA Polymerase	1,5 Einheiten
Tris-HCl	10 mM
KCl	50 mM
MgCL ₂	1,5 mmol
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	200 µM
Stoffel-Fragment	

Temperaturschema M13

PCR-Schritt	Wiederholung	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1x	94°C	2 min
Denaturierung	} 34x	94°C	20 sec
Primeranlagerung		50°C	60 sec
Extension		72°C	2 min
Extension	1x	72°C	5 min

Temperaturschema ERIC1+AP4

PCR-Schritt	Wiederholung	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1x	94°C	2 min
Denaturierung	} 44x	94°C	30 sec
Primeranlagerung		35°C	90 sec Ramp*
		60 sec	111 sec Ramp*
Extension		72°C	2 min
Extension	1x	72°C	5 min
Abkühlung	1x	4°C	Bis zum Abschalten

*Ramp bezeichnet die Übergangszeit zur nächsten Temperatur.

3.5.2 Fingerprint-Gele

Wie oben bereits beschrieben, wurden auch die PCR-Amplifikate der Fingerprints mit Hilfe der Gel-Elektrophorese aufgetrennt und dargestellt. Für die Auswertung der Fingerprints sind die Standard Molekular-Marker besonders wichtig, da sie benutzt werden, um die Gele vergleichen zu können. Im Abstand von 12 Proben wurde daher mindestens ein Standard eingefügt. Zudem ist der Färbungsprozess der Banden wichtig. Ethidiumbromid entfärbt mit der Zeit, und Banden können dadurch verloren gehen. Die Gele wurden daher direkt nach der Elektrophorese dokumentiert.

3.5.3 Vergleich der Fingerprints

Zum Vergleich der Bandenmuster und der Zuordnung zu genetisch identischen Stämmen wurden die Banden mit dem Auge verglichen und zusätzlich die auf Disketten gespeicherten Bilder mit Hilfe der GelCompare Software von Applied Math ausgewertet.

Die gespeicherten Bilder wurden dazu im Bildabschnitt zwischen den Größenstandards 150 und 2000 Basenpaaren in das Programm eingelesen und das Bild optimiert. Die jeweiligen Bandenmuster wurden vom Programm aufgesucht und eventuell per Hand editiert. Die jeweilige Information zu jedem Bandenmuster wurde eingegeben und die Standardmolekularmarker als Referenz markiert. Die Einlesung wurden immer selbst durchgeführt, und Einstellungen der Software während der Untersuchungszeit nicht verändert.

Um die Ähnlichkeit der DNA-Fingerprints zu berechnen, wurde eine Clusteranalyse-Methode mit UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) durchgeführt. Die Clusteranalyse dient der Gruppierung der Isolate in Stämme in Abhängigkeit vom Korrelationskoeffizienten, ihrer Ähnlichkeit. Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist ein Dendrogramm.

3.5.4 Auswertung der Dendrogramme

Alle Fingerprint Bilder wurden zunächst mit dem Auge ausgewertet, dabei wurde Bande für Bande verglichen und bei Übereinstimmung als Stamm markiert. Dann wurden die Isolate mit dem oben beschriebenen GelCompar-Programm ausgewertet und die Dendrogramme jeweils verglichen.

Es gibt keine international standardisierte Regel, wieviel Ähnlichkeit bei einem Dendrogramm einem Stamm entspricht. Isolate wurden als ein Stamm gewertet, wenn sie in dem vom GelCompare erstellten Dendrogramm in einer Zufalls-PCR Untersuchung mindestens eine Ähnlichkeit von 90% und in der anderen mindestens von 80% hatten. Dies erbrachte die beste Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Auswertung mit dem Auge.

3.6 Statistische Methoden

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte deskriptiv. Berechnet wurden die Proportionen, jeweils angegeben als Prozentanteil. Für die berechneten Proportionen wurde das Konfidenzintervall berechnet. Das Konfidenzintervall ist der Bereich, in dem der tatsächliche Wert des Ergebnisses mit der angegebenen Wahrscheinlichkeit liegt, bei einem 95%-Konfidenz-Intervall also mit 95% Wahrscheinlichkeit. Für das Konfidenzintervall gilt, dass es sowohl von der Stärke der beobachteten Assoziation als auch von der Größe der Studie (Zahl der Studienteilnehmer) abhängig ist. Berechnet wurde das Konfidenzintervall mit Epi-Info 6.04.

Von den Probanden waren einige Charakteristika, wie das Alter, das Geschlecht und die Zugehörigkeit zum Hygieneinstitut erhoben worden. Ob ein Charakteristikum das Vorhandensein von bestimmten Enterokokken bzw. Resistenzen begünstigt, wurde verglichen.

Die Ergebnisse werden zunächst in Form einer Vier-Felder-Tafel dargestellt.

	Enterokokkenspezies		
Exposition	vorhanden	nicht vorhanden	
Ja	A	B	A+B
Nein	C	D	C+D
	A+C	B+D	

- A= Probanden mit Nachweis dieser Spezies/Resistenz, die exponiert waren
- B= Probanden ohne Nachweis der Spezies/Resistenz, die exponiert waren
- C= Probanden mit Nachweis dieser Spezies/Resistenz, die nicht exponiert waren
- D= Probanden ohne Nachweis der Spezies/Resistenz, die nicht exponiert waren

Das epidemiologische Maß, das die Stärke der Assoziation zwischen „Fällen“ und bestimmten Risikofaktoren ausdrückt, ist in einer Querschnitts-Studie, wie die vorliegende, das sogenannte Odds Ratio. Das OR wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Odds Ratio} = \frac{\text{Odds der Exposition, wenn Spezies vorhanden}}{\text{Odds der Exposition, wenn Spezies nicht vorhanden}} = \frac{AD}{BC}$$

Das Odds Ratio ist ein Maß für die Stärke der Assoziation zwischen dem relativen Effekt eines Risikofaktors und – hier - der Besiedlung. So bedeutet z.B. ein OR=10, dass jemand mit dieser Exposition (Arbeiten im Hygieneinstitut, Geschlecht, etc.) zehnmal wahrscheinlicher den Nachweis einer Spezies haben wird, als wenn er diese Exposition nicht hat.