

3 Material und Methoden

3.1 Bestandsbegehung

Es wurden 92 Milchviehbetriebe in Brandenburg besucht. Um in die Studie aufgenommen zu werden, mussten die Betriebe mehr als 100 Milchkühe haben und dem LKV angeschlossen sein. Auf diesen Betrieben wurden von jeweils 32 laktierenden Tieren Viertelgemelksproben für bakteriologische Untersuchungen entnommen.

Die sterile Probenentnahme erfolgte im Melkstand vor dem Melken nach Vorreinigung der Euter mit einem feuchten Eutertuch und Desinfektion der Zitzen mit Zellstoff und 70%igem Alkohol.

Die Auswahl der Tiere aus der Herde erfolgte nach dem Zufallsprinzip aus denjenigen klinisch gesunden Tieren, die sich einer der in Tabelle 6 dargestellten vier Gruppen zuordnen ließen.

Mittels der dabei vorgenommenen Einteilung ließen sich eventuelle Unterschiede zwischen Erstkalbinnen und multiparen Tieren aufdecken. Die Hauptrisikozzeiten für Mastitiden am Anfang und am Ende der Laktation wurden so berücksichtigt.

Die Tiere durften keine äußerlich sichtbaren Symptome einer Euterentzündung erkennen lassen, die Milch musste makroskopisch unverändert erscheinen.

Tabelle 6: Charakterisierung der untersuchten Tiergruppen

Anzahl der Tiere	Laktationsnummer	Laktationstage
8	1	bis 50. Tag
8	1	ab 250. Tag
8	>1	bis 50. Tag
8	>1	ab 250. Tag

3.2 Bakteriologische Untersuchungen der Milchproben

Die steril genommenen Milchproben wurden bei 4°C gelagert und nach spätestens 24 Stunden im Milchlabor der Tierklinik für Fortpflanzung der Freien Universität Berlin mikrobiolo-

gisch untersucht. Sie wurden auf hemmstofffreien Blutagarplatten (Blood Agar Base Nr. 2, Oxoid, Wesel; Zusatz von 5% Schafblut) mit 0,1% Aesculin-Zusatz ausgestrichen. Der Ausstrich erfolgte nach sorgfältigem Durchmischen mit jeweils 0,01 ml der Proben.

Die diagnostischen Kriterien im Labor umfassten das Wachstums-, Hämolyse-, und Gram-Verhalten, CAMP-Phänomen, Reaktion auf Katalase, Oxidase, Röhrchenkoagulase, anaerobe Mannitolvergärung, Acetointest und Staphylase-Test[®] (Oxoid, Wesel) bzw. Slidex Staph[®] Plus (bioMerieux, Nürtingen) sowie die Lancefieldgruppen-Bestimmung bei Streptokokken. Die isolierten Staphylokokken wurden bei -80°C eingefroren und für weitergehende Untersuchungen aufbewahrt. Für das Einfrieren wurde eine Nährbouillon (Brain-Heart Infusion/BHI, Oxoid, Wesel) mit 2-3 makroskopisch gleichen Erregerkolonien beimpft. Die Bouillon wurde bei 37°C ca. 24 Stunden bebrütet. Dann wurden 1500µl der bebrüteten Bouillon mit steriler Pipette in Cryoröhrchen gefüllt, 300µl steriles Glycerin hinzugegeben und gut vermischt. Die Cryoröhrchen wurden in Cryoboxen eingefroren. Somit standen sie für die Überprüfung der Hypothese der unterschiedlichen Stämme bei Altkühen und Erstkalbinnen zur Verfügung. Weiterhin wurden diese Daten genutzt, um Einflüsse auf die Eutergesundheit und Verbreitung von Mastitiserregern sowie deren Resistenzlage zu ermitteln (Köster, 2004).

3.3 Auswahl der Betriebe zur Typisierung

Auf Grundlage der Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen im Milchlabor der Tierklinik für Fortpflanzung wurden aus den 92 Betrieben die sechs mit der höchsten Prävalenz von *S. aureus* ausgewählt. Die isolierten und aufbewahrten Staphylokokken-Stämme aus diesen Betrieben wurden dann für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen genutzt. Die Anzahl laktierender Milchkühe lag auf den sechs ausgewählten Betrieben zwischen 250 und 470. Die Viertelprävalenz von *S. aureus* in diesen Betrieben lag zwischen 23,4% und 32,0% und die Tierprävalenz bei Werten zwischen 46,9 und 62,5% (Tabelle 7). Die Zellzahlen bei der Milchleistungsprüfung (MLP) waren in allen sechs Betrieben sehr hoch, sie lagen zwischen 430.000 und 590.000 Zellen/ml. Verschiedene im Betrieb durchgeführte Hygienemaßnahmen im Melkstand und beim Trockenstellen werden in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 7: *S. aureus* Viertel- und Tierprävalenzen der ausgewählten Betriebe

Betrieb	Viertelprävalenz/ Anzahl infizierter Viertel	Tierprävalenz/ Anzahl infizierter Tiere
1	30,5% (39)	62,5% (20/32)
2	31,3% (40)	56,3% (18/32)
3	23,4% (30)	46,9% (15/32)
4	26,6% (34)	62,5 % (20/32)
5	28,1% (36)	46,9% (15/32)
6	32,0% (41)	59,4% (19/32)

Tabelle 8: Hygienemaßnahmen in den Betrieben

Betrieb	Euterreinigung	Zitzendippen	Zwischendesinfektion	Antibio. TS	Trennung
1	feuchtes Vlies	Dippbecher, unregelmäßig	Handsprühg., regelm., nach jedem Tier	nach ZZ	ja
2	feuchtes Vlies o. Papier	Dippbecher, regelmäßig	Handsprühg., nur nach kranken Tieren	ja, alle	nein
3	Papier	Dippbecher, regelmäßig	Eimer, unregelmäßig, nach jedem Tier	nach ZZ/ Mastitis	ja
4	feuchtes Vlies	Handsprühg., regelmäßig	Handsprühg., regelm., nach jedem Tier	nach ZZ	ja
5	feuchtes Flies	Handsprühg., regelmäßig	Handsprühg., nur nach kranken Tieren	ja, alle	teilweise
6	feuchter Lappen	Handsprühg., unregelmäßig	Eimer, regelmäßig, nach jedem Tier	ja, alle	teilweise

Antibio. TS = Trockenstellen unter Antibiotikumschutz; Trennung = Trennung gesunder von kranken Tieren; nach ZZ = nur bei Tieren mit erhöhter Zellzahl; Mastitis = nur bei Tieren, die in Laktation durch Mastitis aufgefallen waren

3.4 Untersuchungen zur Differenzierung von *Staphylococcus aureus* von anderen Staphylokokken

Alle auf den verschiedenen Betrieben isolierten, als Staphylokokken identifizierten und eingefrorenen Stämme wurden nach folgenden Kriterien untersucht:

Hämolyseverhalten, Röhrenkoagulase, anaerobe Mannitvergärung, Wachstum auf acriflavinhaltigem Agar, Acetoin Test, Staphylase-Test[®] (Oxoid, Wesel) und Slidex Staph Plus[®] (bioMérieux, Nürtingen).

3.4.1 Hämolyseverhalten

Das Hämolyseverhalten wurde auf hemmstofffreien Blutagarplatten (Blood Agar Base Nr. 2, Oxoid, Wesel; Zusatz von 5% Schafblut) beurteilt. Es wurde zwischen Stämmen ohne Hämolyse, Stämmen mit vergrünender Hämolyse (alpha-Hämolyse), Stämmen mit vollständiger Hämolyse (beta-Hämolyse) und Stämmen mit doppelzoniger Hämolyse (alpha- und beta-Hämolyse) unterschieden.

3.4.2 Röhren-Koagulase

Für den Nachweis der Koagulase wurde das lyophilisierte BBL[™] Coagulase Plasma[®] (Becton Dickinson, Heidelberg) mit sterilem reinem Wasser resuspendiert. Dann wurde zu jeweils 0,5 ml des Plasmas in einem Röhrchen eine Öse der jeweiligen zu testenden Bakterienkultur gegeben und gemischt. In jedem Ansatz wurden zusätzlich zu den zu untersuchenden Stämmen Kontrollstämme in Form eines bereits bekannten *S. aureus* Stammes und eines bekannten Koagulase negativen Staphylokokken Stammes angelegt. Es erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 24 Stunden.

Nach 4 und 24 Stunden wurden die Reaktionen abgelesen. Als positives Ergebnis wurde die vollständige Koagulation des Plasmas gewertet, das gesamte Plasma haftete an der Röhrenwand. Das Ausbleiben der Koagulation war ein negatives Ergebnis.

3.4.3 Anaerobe Mannitvergärung

Zur Testung der anaeroben Mannitvergärung wurden Röhren mit 1% Mannit-haltigem Agar genutzt. Sie wurden mittels Öse jeweils mit ein bis zwei Kolonien der Stämme im senkrechten Strich bis auf den Röhrenboden beimpft. Anschließend wurde das Röhren mit einer etwa 1cm hohen Säule Paraffinöl beschichtet und somit luftdicht abgeschlossen. Als positives Ergebnis wurde ein Farbumschlag von rot nach gelb nach einer 2- bis 3tägigen Bebrütung bei 37°C gewertet.

3.4.4 Acriflavinhaltiger Agar

Es wurde das Wachstum der gefundenen Staphylokokkenstämme auf mit Acriflavin supplementiertem Standard-I-Nähragar (Merck, Darmstadt) getestet. Der Agar wurde, bevor er in Platten gegossen wurde, mit 7 µg/ml Acriflavin ergänzt. Dann wurden jeweils einige Kolonien jedes Staphylokokkenstammes auf den vorbereiteten Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Wachstum auf dem mit Acriflavin ergänzten Agar wurde als positives Ergebnis gewertet.

3.4.5 Acetoinbildung

In der Voges-Proskauer-Reaktion wird aus Glucose anaerob gebildetes Acetoin (Butandiol) mit Voges-Proskauer Reagenz durch eine rote Verfärbung nachgewiesen. Hierzu wurden 2 ml beimpfter Bouillon (LB-Glucose-Medium) bei 37°C bebrütet. Nach 2 bis 3 Tagen wurden 1 ml 5%ige alpha-Naphtollösung und 0,5ml 40%ige wässrige Kalilauge zur Bouillon gegeben. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur zeigte sich ein positives Ergebnis (Acetoinbildung) durch rote Verfärbung an. Das Ausbleiben des Farbumschlags wurde als negatives Ergebnis gewertet.

3.4.6 Staphylase-Test

Der Staphylase-Test[®] (Oxoid, Wesel) (CF) wurde nach Produktanleitung durchgeführt. Mit einer Impföse wurden jeweils 2-3 Bakterienkolonien auf das Testfeld und das Kontrollfeld der Reaktionskarte gegeben. Dann wurde ein Tropfen gut durchmischte Test-Reagenz auf das Testfeld und ein Tropfen Kontrollreagenz auf das Kontrollfeld gegeben. Der Inhalt des Test-

feldes wurde mit einer Impföse vermischt. Mit einer neuen Öse wurde auch der Inhalt des Kontrollfeldes vermischt. Hierbei wurde auf das Auftreten von Agglutination geachtet. Agglutinierte nur die Zellsuspension im Testfeld, war das Testergebnis positiv. Der untersuchte Stamm galt als *S. aureus*. Der Test konnte nicht ausgewertet werden, wenn die Suspension im Kontrollfeld agglutinierte.

3.4.7 Slidex Staph Plus

Der Slidex Staph Plus Test[®] (bioMérieux, Nürtingen) (SSP) wurde entsprechend der Produktanleitung folgendermaßen durchgeführt:

Die bei 4°C gelagerten Reagenzien wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut aufgeschüttelt. Auf zwei unterschiedliche Felder der mitgelieferten Testkarten wurde jeweils ein Tropfen des anti-*Staphylococcus aureus* Reagenzes und ein Tropfen des Kontrollreagenzes gegeben. Mit verschiedenen Impfösen wurden jeweils 1-2 Kolonien der zu untersuchenden Bakterienkultur in die Felder eingerieben und etwa 10 Sekunden durchmischt. Dann wurde die Karte 20 Sekunden leicht rotierend bewegt und die Reaktion abgelesen. Ein positives Ergebnis lag vor, wenn im Feld mit dem anti-*Staphylococcus aureus* Reagenz innerhalb dieser Zeit (30 Sekunden) eine Agglutination sichtbar wurde und im Feld mit dem Kontrollreagenz keine Agglutination auftrat. Dieses zeigte die Anwesenheit von *S. aureus* an. Ein negatives Ergebnis lag vor, wenn keine der Zellsuspensionen agglutinierte. Der Test konnte nicht interpretiert werden, wenn das Kontrollreagenz agglutinierte.

Die Aussagefähigkeit der Kombination einzelner Verfahren miteinander wurde im Anschluss vergleichend betrachtet.

3.5 Typisierung der gefundenen *Staphylococcus aureus* Isolate

Mit Hilfe von Resistenzprofilen und RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaktion) wurden von fünf der ausgewählten Milchviehbetriebe jeweils 22 und vom sechsten Betrieb 20 der gefundenen *S. aureus* Isolate identifiziert und auf ihre Variabilität geprüft.

Zur Erhöhung der Sicherheit, dass unterschiedliche Stämme auch tatsächlich als solche erkannt werden, wurde in Paralleluntersuchungen bei der Amplifikation der DNA für die PCR mit zwei verschiedenen Primern gearbeitet.

Die Durchführung erfolgte im Labor des Instituts für Tier- und Umwelthygiene der Freien Universität Berlin.

Die Genotypisierung mittels RAPD-PCR erwies sich in verschiedenen Untersuchungen als sehr geeignet, um unterschiedliche *S. aureus* Stämme voneinander zu differenzieren (Lam et al., 1996b; Lipman et al., 1996; Fitzgerald et al., 1997; Gillespie et al., 1999).

Die Auswahl der für die Typisierung genutzten *S. aureus* Isolate erfolgte nach folgenden Kriterien:

1. möglichst gleiche Anzahl von Isolaten aus unterschiedlichen Tiergruppen
2. möglichst viele verschiedene Tiere
3. die Auswahl der weiteren Isolate erfolgte per Zufall

Da die Anzahl der gefundenen *S. aureus* bei den Erstkalbinnen sehr begrenzt war, wurden fast alle Isolate, die aus diesen Tiergruppen (1 und 2) isoliert wurden, für die Genotypisierung genutzt.

3.5.1 Erstellung von Resistenzprofilen

Die Bestimmung des Resistenzverhaltens der Erreger gegenüber Antibiotika wurde mit der Agardiffusionsmethode durchgeführt. Diese Empfindlichkeitstests dienen der Erstellung von Resistenzprofilen zur Absicherung der Ergebnisse aus der RAPD-PCR. Es wurden alle *S. aureus* Isolate dem Agardiffusionstest unterzogen, die auch für die Genotypisierung ausgewählt wurden.

Die Durchführung und Bewertung der Antibiotogramme erfolgte anhand der Richtlinien zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mycobakterien) gegen Chemotherapeutika der Deutschen Norm DIN 58940.

Der Bewertungsschlüssel für die Beurteilung des Agardiffusionstests ist in der Tabelle 9 dargestellt. Grundlage war die Arbeitsanweisung „Resistenzbestimmung schnell wachsender

Mikroorganismen“ des Arbeitskreises für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik der DVG, Stand XI 1996 sowie die DIN Norm 58940.

Tabelle 9: Beurteilung der Agardiffusionstests anhand der Hemmhofgröße (in mm)

Wirkstoff	Konzentration/Blatt (μg bzw. I.E).	Resistent (mm)	Intermediär (mm)	Sensibel (mm)
Penicillin	10 I.E	<28	13-23	>29
Cloxacillin	5 μg	<15		>16
Amoxicillin/ Clavulansäure	20/10 μg	<28	21-27	>29
Erythromycin	15 μg	<16	17-20	>21
Cefoperazon	10 μg	<10	11-16	>17
Cefquinom	10 μg	<17		>18
Neomycin	30 μg	<16		>17
Tetracyclin	30 μg	<16	17-21	>22
Danofloxacin	5 μg	<17	18-21	>22
Ampicillin	10 μg	<28	15-21	>29
Potenzierte Sulfonamide	25 μg	<10	11-15	>16
Gentamicin	10 μg	<14	15-20	>21

3.5.2 Durchführung der RAPD-PCR

3.5.2.1 Isolierung und Reinigung der DNA

Die DNA wurde mit Hilfe des kommerziellen DNA-Isolierungssystems Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit der Firma Promega (Madison, USA) (enthielt Nuclei Lysis Solution, Protein Precipitation Solution und DNA Rehydration Solution) über verschiedene Bearbeitungs- und Zentrifugationsschritte (Technical Manual No. 050, Promega) isoliert und gewaschen.

Hierzu wurden die bei -80°C aufbewahrten *Staphylococcus aureus* Isolate über Blutplattenkultur (5% Schafblutagar) in LB-Bouillon (Merck, Darmstadt) übertragen und über 24 Stunden angereichert.

Jeweils 2 ml dieser Bakteriensuspension wurden in 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen pipetiert und für 2 Minuten bei 16100 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde entfernt und das zurückbleibende, die Bakterien enthaltende Pellet in 480 μl EDTA (50mM) resuspendiert. Dann wurden 60 μl Lysostaphin (10mg/ml) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 60 μl Lysozym (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zur Bakterienwandlysis zugesetzt und die Röhrchen bei 37°C für 45 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Röhrchen 2 Minuten bei 16.100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluß erneut verworfen.

Zum Rückstand wurden, um eine Kernlysis zu bewirken, 600 μl Nuclei Lysis Solution, gegeben und zum Mischen vorsichtig pipetiert. Im Anschluß wurden die Röhrchen für 5 Minuten bei 80°C inkubiert und danach wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

Schließlich wurden 3 μl RNase Solution zugegeben und gemischt. Die anschließende Inkubation bei 37°C dauerte 30 Minuten. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 200 μl Protein Precipitation Solution hinzupipetiert.

Auf eine 5minütige Inkubation auf Eis folgte ein erneuter Zentrifugenschritt bei 16.100 g für 3 Minuten. Die DNA befand sich nun im Überstand, von dem 1,5 ml in neue jeweils 600 μl Isopropanol enthaltende Mikrozentrifugenröhrchen pipetiert wurde. Der Überstand wurde mit dem Isopropanol gemischt, so dass dünne DNA Stränge sichtbar wurden.

Im Anschluß wurde erneut 2 Minuten bei 16.100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand (das DNA-Pellet) mit 600 μl Ethanol (70%) versetzt, um die DNA zu waschen. Nach 2 Minuten Zentrifugieren bei 16.100 g wurde das Ethanol wieder abgezogen und das Röhrchen mit noch enthaltener DNA auf sauberem absorbierendem Papier zum Trocknen an der Luft für 15 Minuten liegen gelassen. Die isolierte und gewaschene DNA wurde dann mit 100 μl DNA Rehydration Solution rehydriert und eine Stunde bei 65°C inkubiert.

Die Lagerung der rehydrierten DNA erfolgte im Kühlschrank bei 4°C .

3.5.2.2 Bestimmung der DNA-Dichte

Zur photometrische Bestimmung der DNA-Dichte wurde das Photometer DyNA Quant 200 (Hoefer, San Francisco, USA) und das DyNA Quant 200 Kit (Hoefer, San Francisco, USA) verwendet. Hierbei wurde die Dichte der DNA jedes Isolats in der rehydrierten Lösung gegen eine Standardlösung gemessen.

Im Anschluss konnte die Konzentration der isolierten DNA so verdünnt werden, dass die Dichte der DNA aller Isolate übereinstimmte (2ng/ μ l).

Die Verdünnungsprodukte wurden bis zur Durchführung der RAPD-PCR bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.5.2.3 Amplifikation der DNA

An einem sterilen Arbeitsplatz wurde die DNA für die RAPD-PCR vorbereitet. Hierzu wurden „Ready-To-Go RAPD Analysis Beads“ (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) verwendet. Zu diesen Analysekügelchen wurden jeweils 5 μ l der verdünnten DNA, 5 μ l des ausgewählten Primers und 20 μ l destilliertes Wasser gegeben. Die Analysekügelchen enthalten Puffer (3 mM MgCl₂, 30 mM KCL und 10 mM Tris), dATP, dCTP, dGTP, dTTP, BSA und hitzebeständige Polymerasen (AmpliTaq und Stoffel fragment). Als Primer wurden die Primer 2 oder 5 des „Ready-To-Go RAPD Analysis Beads“ (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) genutzt, da sich in einem Vorversuch gezeigt hatte, dass diese zwei Primer die zu untersuchenden *S. aureus* Isolate am stärksten differenzierten.

Primer 2 – (5'-d[GTTTCGCTCC]-3')

Primer 5 – (5'-d[AACGCGCAAC]-3')

Zur Kontrolle wurde bei jedem Durchgang neben der DNA der zu untersuchenden 22 bzw. 20 *S. aureus* Isolate jeweils ein Kontrollstamm *E. coli* und eine Leerkontrolle ohne DNA ebenfalls der RAPD-PCR unterzogen.

Der Inhalt der Röhren wurde gemischt und zügig in den Thermocycler Typ Gene Amp, PCR-System 2400 der Firma Perkin Elmer (Göttingen, Deutschland) gestellt. Dort wurden folgende Zyklen durchlaufen:

1 Zyklus: 95°C, 5 Minuten
95 Zyklen: 95°C, 1 Minute
 36°C, 1 Minute
 72°C, 2 Minuten

3.5.2.4 Gel-Elektrophorese

Nach Amplifikation der DNA mußten die vervielfältigten DNA-Abschnitte sichtbar gemacht werden. Hierzu wurden sie auf ein 1,5%iges Agarosegel, dem 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde, aufgetragen. Dieses wurde für 4 Stunden der Elektrophorese bei 90 Volt unterzogen.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Bild der Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Die erscheinenden Bilder der Banden wurden direkt auf einen Computerbildschirm übertragen und als Bild ausgedruckt.

3.5.2.5 Auswertung der RAPD-PCR Bilder

Die Auswertung der mittels Gelelektrophorese hergestellten PCR-Bilder erfolgte visuell. Es wurden nur die Bandenmuster miteinander verglichen, die sich auf demselben Elektrophoresegel und somit auf einem Bild befinden. Die Bandenmuster dieser *S. aureus* Isolate wurden in denselben Verarbeitungsschritten hergestellt.

Traten bei der Leerkontrolle, der keine DNA zugegeben wurde, trotzdem Banden auf, war dies als normal zu bewerten. Diese entstehen durch kleine Mengen DNA Verunreinigung in den Polymerasen.

Von jedem typisierten Isolat standen zwei mit unterschiedlichen Primern erstellte Bandenmuster zur Verfügung, die zuerst unabhängig voneinander ausgewertet und dann zu einem Ergebnis zusammengefasst wurden. Die Auswertung geschah in Anlehnung an eine Anleitung zur Auswertung von Pulsfeldgelelektrophorese-Bildern (Tenover et al., 1995).

Unterschieden sich die durch beide Primer erstellten Bandenmuster zweier Isolate in keiner Bande voneinander, wurden sie als identische Stämme betrachtet. Bei einer zusätzlichen oder einer fehlenden Bande wurden sie als nah verwandt angesehen.

Isolate mit identischen Bandenmustern wurden mit gleichen Buchstaben bezeichnet. Unterschieden sich die Bandenmuster in nur einer Bande, erfolgte die Bezeichnung mit dem gleichen Buchstaben und einer zusätzlichen Ziffer.

3.6 Statistische Verfahren

Die Darstellung der Ergebnisse der Studie erfolgte rein deskriptiv.

Im diagnostischen Teil der Studie (Kapitel 2.4) wurden als klassische Bewertungskriterien qualitativer Tests die Sensitivität als Anteil der Testpositiven an den im Goldstandard positiven und die Spezifität als Anteil der „Nicht-Testpositiven“ (Testnegative und keine Aussage) an den im Goldstandard negativen berechnet.

Auf eine schließende Statistik wurde in Anbetracht des stark vorselektierten Untersuchungsmaterials verzichtet.