

### **3. Material und Methodik**

#### **3.1 Material**

Die Zusammensetzung verwendeter Medien, Lösungen, Reagenzien, Puffer und Färbungen ist dem Anhang S. 126 ff. zu entnehmen.

#### **Methode zur Isolierung und Identifizierung von Enterokokken**

Ziel der Untersuchung bildete die Isolierung und Identifizierung sowohl vancomycin-resistenter wie auch vancomycinsensibler Enterokokken aus Nutztieren. Das Probenmaterial wurde direkt auf den Schlachthöfen von Jungbullen, Kälbern, Mastschweinen und Masthähnchen gewonnen. Von besonderem Interesse waren dabei die Enterokokkenspecies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* und *E. gallinarum*. Auf diese Arten ist auch das angewandte Identifizierungs- und Isolierungsschema zugeschnitten. An vancomycinresistenten Enterokokkenstämmen werden Van A-Gentragenden und auch die weniger antibiotikaresistenten Van C-1-, Van C-2- und Van C-3-Gentragenden Enterokokkenstämme erwartet. Insgesamt wurden 18 Masthähnchen, 32 Mastschweine und 31 Jungrinder untersucht. Jedes Tier kam aus einer anderen Herde. Aus diesen 162 Proben, pro Tier eine Darm- und eine Schlachtkörperoberflächenprobe, wurden 499 Enterokokkenstämme isoliert.

#### **3.2 Methodik**

##### **Probennahme:**

Auf verschiedenen EU-zugelassenen Schlachthöfen in Deutschland wurden Tupferproben von Jungbullen, Kälbern und Mastschweinen gewonnen. Bei Kotproben wurde jeweils pro Tier mit einem langen Tupfer möglichst tief im Rektum ein Abstrich genommen. Proben von der Schlachtkörperoberfläche des Mastschweines ergaben sich, indem auf der Sternumoberfläche mit Hilfe eines feuchten Tupfers eine mit einem Einweckring umgrenzte (Durchmesser 6 cm) Fläche einmalig waagrecht und senkrecht und mit gleichmäßigem Druck abgestrichen wurde. Beim Rind wurde der Schlachtkörperoberflächentupfer mit der gleichen Technik an der plantaren Seite der Hesse genommen. Die Oberflächentupfer befanden sich in 1 ml NaCl-Peptonwasser und wurden bei 4° C in einer elektrischen Kühlbox zur weiteren Untersuchung transportiert.

Auf verschiedenen deutschen Geflügelschlachthöfen wurden nicht eviszerierte Tierkörper vom Schlachtband entnommen und gekühlt bei 4° C transportiert. Erst im Labor wurden die eigentlichen Proben, ein Teil des Caecum und ein Halshautstück vom Tierkörper, gewonnen.

## **Probenaufarbeitung:**

### Jungrind, Kalb, Mastschwein:

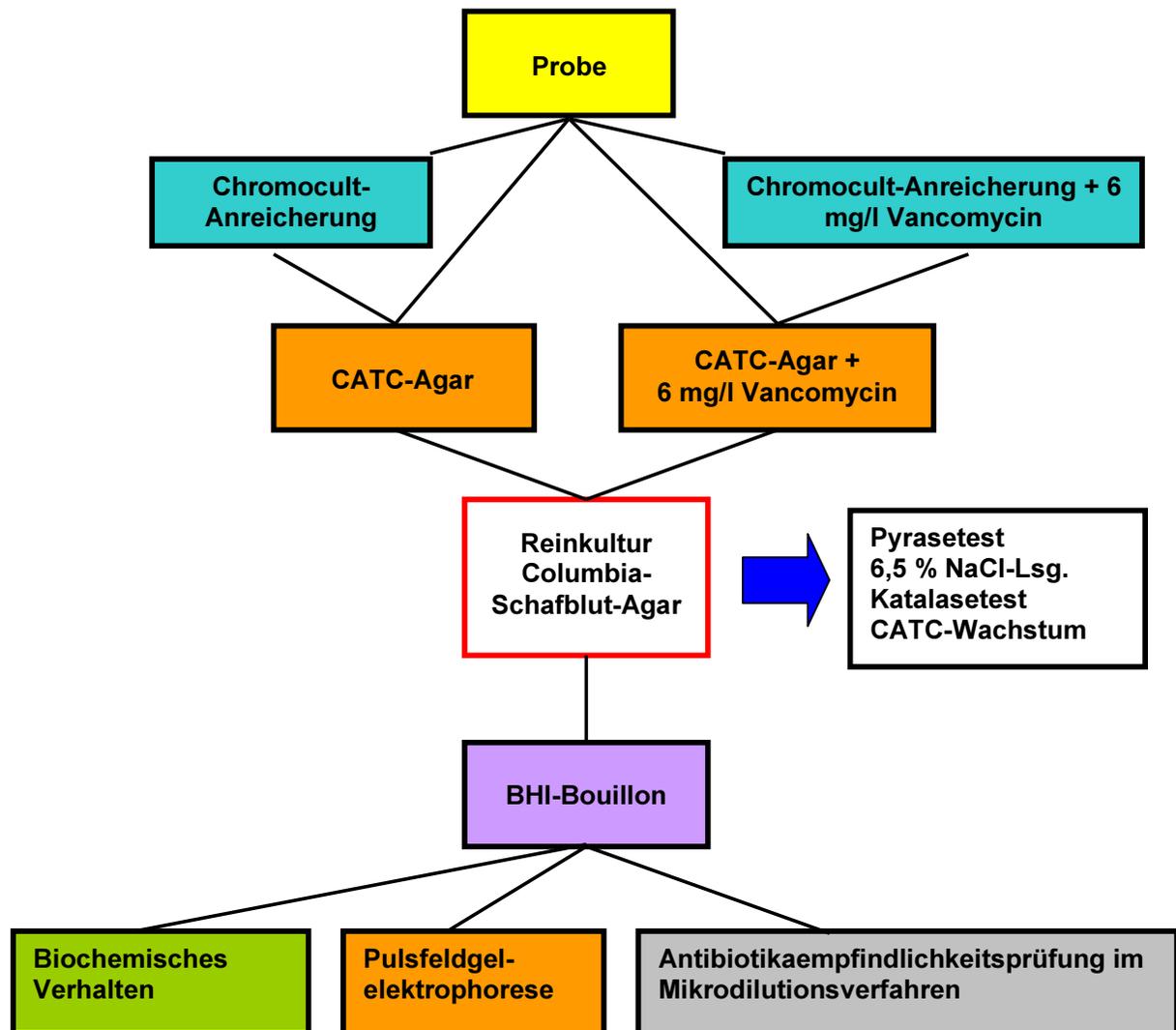
Die Oberflächentupferproben von Rindern und Mastschweinen befanden sich in Tupferröhrchen mit 1,0 ml 0,1 % NaCl-Peptonwasser. Den Rektumtupferproben wurde im Labor 1,0 ml 0,1 % NaCl-Peptonwasser zugesetzt. In dieser Flüssigkeit wurden die Tupfer 1 Minute geschüttelt, am Röhrchenrand ausgedrückt und dann wurden 100 µl der im Röhrchen verbliebenen Flüssigkeit auf CATC-Agar und CATC-Agar mit dem Zusatz von 6 mg/l Vancomycin mit einem Drigalskispatel verteilt. Der ausgedrückte Tupfer wurde in 3 ml Chromocultanreicherungsbouillon verbracht und 100 µl der im Röhrchen verbliebenen Flüssigkeit wurden in Chromocultanreicherungsbouillon (mit 6 mg/l Vancomycin) gegeben.

Mit 0,5 ml der verbliebenen Probenlösung wurde eine 1:10 Verdünnung mit 0,1 %igen NaCl-Peptonwasser hergestellt, die zur Gesamtkeimzahl- und Enterobakteriazeenzahlbestimmung mittels eines Spiralplaters diente.

### Geflügel:

Von den Tierkörpern wurden jeweils ein 10 g schweres, mehrmals geschnittenes Stück Caecum und ein 10 g schweres Stück von der Halshaut mit Hilfe einer abgeflamnten Schere und Pinzette entnommen. Das Probestück wurde in einen Stomacherbeutel verbracht und 90 ml 0,1 %iges NaCl-Peptonwasser hinzugegeben, wodurch eine 1:10 Verdünnung entstand. Der so befüllte Stomacherbeutel wurde im Stomacher mit 1000 Arbeitstakten homogenisiert, was bei normaler Geschwindigkeit 30 sec dauerte. Das Vorgehen entspricht der Methode 06.00.16 nach § 35 LMBG. Von der Verdünnungsflüssigkeit wurden sofort 100 µl auf CATC-Agar und CATC-Agar supplementiert mit 6 mg/l Vancomycin ausgespatelt; weiterhin wurden 100 µl in Chromocultbouillon und in Chromocultbouillon mit 6 mg/l Vancomycin gegeben. Die Verdünnungsflüssigkeit diente der Gesamtkeimzahl- und Enterobakteriazeenzahlbestimmung mittels eines Spiralplaters.

Abbildung 2: Isolierungs-, Identifizierungs- und Prüfschema für Enterokokken



### Beschreibung der Verfahrensweise

Im Anschluß an die Probennahme und Probenaufarbeitung wurden nach der in Abbildung 2 dargestellten Verfahrensweise jeweils 100 µl der Verdünnungsflüssigkeit auf CATC-Agar und auf CATC-Agar mit 6 mg/l Vancomycin aufgebracht und mit dem Drigalskispatel gleichmäßig verteilt. Der ausgedrückte Tupfer wurde in Chromocultbouillon und 100 µl Probenflüssigkeit in Chromocultbouillon mit 6 mg/l Vancomycin gegeben. Die Bebrütung erfolgte 24 h – 48 h bei 37° C unter aeroben Bedingungen. Die mit Hilfe des Spiralplaters beimpften Plate-count-Platten zur Gesamtkeimzahlbestimmung wurden 48 h bei 30° C bebrütet und die VRBG-Platten anaerob mit Hilfe eines Gaspaksystems bei 30° C 48 h bebrütet. Die Auswertung der Gesamtkeimzahl und Enterobakteriazeenzahl erfolgte mittels einer zum Spiralplater

gehörenden Schablone und Auszähltechnik. Pinpoints auf den VRBG-Platten wurden nicht mitgezählt.

Von den CATC- und 6 mg/l Vancomycinhaltigen CATC-Platten wurden jeweils bis zu fünf möglichst morphologisch unterschiedliche Kolonien einzeln auf Columbiablutplatten mit 5 % Schafblut überimpft, um eine Reinkultur zu erhalten. Die Blutplatten wurden 24 h bei 37° C aerob bebrütet.

Auf den CATC- und 6 mg/l Vancomycinhaltigen CATC-Platten wurden sämtliche gewachsenen Kolonien ausgezählt, nachdem sie noch einen Tag bei Raumtemperatur gestanden hatten, um die Kolonien besser erkennen zu können. Für jede Charge vancomycinhaltiger CATC-Platten wurde eine Kontrolle mit den vancomycinsensiblen Enterokokkenstämmen *E. faecalis* ATCC 29212 und *E. faecium* ATCC 6057 sowie den vancomycinresistenten Stämmen *E. faecalis* 1528 und *E. faecium* 70/90 durchgeführt.

Die Anzahl der auf der CATC-Platte und der CATC-Platte mit 6 mg/l Vancomycin gewachsenen Kolonien wurde festgehalten und in Relation zur Gesamtkeimzahl und Enterobakteriazeenzahl gesetzt. Für den Fall, daß aus einer Probe durch direktes Ausspateln keine Enterokokken gewonnen werden konnten, wurden jeweils 100 µl der bebrüteten Chromocultbouillon auf CATC-Agar und CATC-Agar mit 6 mg/l Vancomycin ausgespatelt und anschließend bebrütet. Alle hieraus gewonnenen Stämme wurden mit einem zusätzlichen „C“ bei der Kennzeichnung zur Lagerung vor ihrer sonstigen Stammnummer versehen, um sie als aus Chromocultanreicherung gewonnene Stämme zu kennzeichnen.

Die bewachsenen Columbiablutplatten wurden auf Reinheit der Kulturen geprüft, weiterhin wurde das Hämolyseverhalten untersucht und die Farbe der Kolonien wurde durch Aufnahmen auf die Impföse festgestellt. Morphologisch auffällige Stämme wurden zusätzlich auf ihr Katalaseverhalten getestet und bei katalasenegativem Verhalten wurde von diesen Stämmen eine Gramfärbung angefertigt. Alle Isolate wurden mit dem Pyrasetest (Oxoid) auf das Vorhandensein der mit Ausnahme der Spezies *E. cecorum*, *E. columbae* und *E. saccharolyticus* immer bei Enterokokken vorhandenen Pyrrolidonylarylamidase getestet. Als Positivkontrolle wurde *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 verwendet, als Negativkontrolle *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 mitgeführt, wie in der Anleitung des Hersteller empfohlen. Pyrasetest-negative Stämme wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

Von der Blutplatte wurden 1 - 3 Kolonien in BHI-Bouillon mit Zusatz von 6,5 % NaCl überimpft, dieses wurde 24 - 48 h bei 37° C bebrütet. Zur Funktionskontrolle der BHI-Bouillon mit 6,5 % NaCl-Zusatz wurde überprüft, ob eine mit *Streptococcus bovis* und *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 beimpfte Bouillon unbewachsen blieb. Es wurde jeweils eine Kolonie

von der Blutplatte auf den CATC-Agar überimpft und von den auf vancomycinhaltigem CATC-Agar isolierten Kolonien von der Blutplatte auf vancomycinhaltigen CATC-Agar und CATC-Agar überimpft. Diese Nährböden wurden 24 h bei 37° C bebrütet. Es wurde eine BHI-Bouillon von der Blutplatte mit einer Kolonie beimpft und 24 h bei 37° C bebrütet. Von dieser BHI-Bouillon wurde jeweils 1 Tropfen aus der 1-ml-Glaspipette in die 1 %igen Zucker Mannitol, L-Arabinose,  $\alpha$ -D-Methylglucopyranosid und D-Raffinose (Lösung in BARSICOW-Grundmedium) mit Bromthymolblau als Indikator gegeben. Als Kontrolle wurden jeweils der Stamm *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 6057 und *E. casseliflavus* Gent mitgeführt. Die Ablesung der Reaktion erfolgte nach 3 - 4 tägiger Bebrütung bei 37° C. Die Auswertung des Farbumschlages von blaugrün nach gelb bedeutete eine Zuckerverwertung und wurde somit als positiv betrachtet. Im Gegensatz dazu blieb bei einer Unfähigkeit, diesen Zucker abzubauen, die Farbe bei blaugrün und die Reaktion wurde als negativ gewertet.

Für Enterokokken ist ein Wachstum in 6,5 %iger NaCl-BHI-Bouillon typisch, wobei sich spätestens nach 48 h eine getrübe Nährlösung mit einem auf dem Röhrchengrund befindlichen Schleimzopf zeigte. Stämme, die sich in 6,5 %iger NaCl-BHI-Bouillon nicht vermehrten, wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen, da von den Enterokokken nur *E. cecorum*, *E. columbae* und zum Teil Mitgliedern der *E. avium*-Gruppe diese Eigenschaft fehlt. Ebenfalls wurde die Vermehrung der Enterokokken auf dem CATC-Nährböden geprüft. Kam es zu keinem Wachstum, wurde der Stamm von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

Bewachsene CATC-Nährböden wurden auf die Ausbildung einer dunkelroten Färbung der Kolonien hin untersucht, welche eine Tetrazoliumreduktion anzeigt, die besonders bei *E. faecalis* auftritt, aber auch bei *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* vorkommt.

Von der Blutplatte ausgehend wurde zusätzlich eine frische BHI-Bouillon angesetzt und 24 h bei 37° C bebrütet. Die bewachsene BHI-Bouillon wurde mit 10 % (99,5 %igem) Glycerin versetzt und davon 200  $\mu$ l in ein Glasröhrchen mit 15 Glasperlen gegeben, geschüttelt und bei -80° C für die Stammsammlung und für spätere weitere Untersuchungen eingefroren.

Zusätzlich zur Bestimmung der Zuckerreaktion im Röhrchen wurden mittels der Mikrotiterplatten zur Antibiotikabestimmung weitere biochemischen Reaktionen getestet. Dazu gehörten die Arginindihydrolaseaktivität und die Verstoffwechslung der 1 %igen Zucker Mannitol, L-Arabinose,  $\alpha$ -D-Methylglucopyranosid und D-Raffinose, D-Xylose, Melibiose, Sorbitol, L-Sorbose, Melezitose und Ribose. Die Beimpfung blieb für die gesamte Mikrotiterplatte gleich. Die Auswertung der biochemischen Reaktion erfolgte nach 48 h Bebrütung bei 36° C. Zur Speziesidentifizierung wurden nicht nur die Reaktionen in der Mikrotiterplatte verwandt, sondern auch die Ergebnisse aus der Voruntersuchung berücksichtigt, dies erfolgte nach der Tabelle 20.

**Tabelle 20: Zusammenstellung der Stoffwechseleigenschaften der verschiedenen Enterokokkenspezies nach MANERO und BLANCH (1999); DEVRIESE und POT (1995); CARVALHO et al. (1998); DE VAUX et al. (1998); CHEN et al. (2000); DEVRIESE et al. (1993); DEVRIESE et al. (1996b); FACKLAM and COLLINS (1989)**

| Spezies                   | Pyrrolidonyl-<br>arylamidase | 6,5%<br>NaCl | 0,01%<br>Tetrazolium | gelbes<br>Pigment | Arginin-<br>dihydrolase | L-Arabi-<br>nose | Methyl- $\alpha$ -D-<br>glucopyranoside | D-Raffi-<br>nose | Mannitol | D-Xylose | Melebiose | Sorbitol | L-Sorbose | Melzitose | Ribose | Beweglichkeit |
|---------------------------|------------------------------|--------------|----------------------|-------------------|-------------------------|------------------|---|------------------|----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|--------|---------------|
| <i>E. asini</i>           | +                            | -            | ND                   | -                 | -                       | -                | -                                       | -                | -        | +        | -         | -        | -         | -         | -      | -             |
| <i>E. avium</i>           | +                            | D            | ND                   | -                 | -                       | +                | D                                       | -                | +        | D-       | -         | +        | +         | +         | +      | -             |
| <i>E. casseliflavus</i>   | +                            | +            | D+                   | D+                | +                       | +                | +                                       | D+               | +        | +        | +         | D-       | -         | D-        | +      | +             |
| <i>E. durans</i>          | +                            | +            | -                    | -                 | +                       | -                | -                                       | -                | -        | -        | -         | -        | -         | -         | +      | -             |
| <i>E. faecalis</i>        | +                            | +            | +                    | -                 | +                       | -                | -                                       | -                | +        | -        | -         | D+       | -         | D+        | +      | -             |
| <i>E. faecium</i>         | +                            | +            | -                    | -                 | +                       | +                | -                                       | a -              | D+       | D-       | D+        | -        | -         | -         | +      | -             |
| <i>E. gallinarum</i>      | +                            | +            | +                    | -                 | +                       | +                | +                                       | D+               | +        | +        | D+        | D        | -         | D-        | +      | +             |
| <i>E. hirae</i>           | +                            | +            | ND                   | -                 | +                       | -                | -                                       | -                | -        | -        | +         | -        | -         | -         | +      | -             |
| <i>E. malodoratus</i>     | +                            | D            | ND                   | -                 | D                       | -                | -                                       | +                | +        | -        | +         | +        | +         | -         | +      | -             |
| <i>E. mundtii</i>         | +                            | +            | ND                   | +                 | D                       | +                | D                                       | D+               | +        | +        | +         | D        | -         | -         | +      | -             |
| <i>E. pseudoavium</i>     | +                            | D            | ND                   | -                 | -                       | -                | +                                       | -                | +        | D-       | -         | +        | +         | -         | +      | -             |
| <i>E. solitarius</i>      | +                            | +            | ND                   | -                 | +                       | -                | +                                       | -                | +        | -        | D-        | ND       | ND        | +         | -      | -             |
| <i>E. raffinosus</i>      | +                            | D            | ND                   | -                 | -                       | +                | D                                       | +                | +        | D-       | +         | +        | +         | D+        | +      | -             |
| <i>E. cecorum</i>         | -                            | -            | ND                   | -                 | -                       | -                | -                                       | +                | D-       | -        | +         | D-       | -         | D+        | +      | -             |
| <i>E. dispar</i>          | +                            | +            | ND                   | -                 | +                       | -                | +                                       | +                | -        | -        | ND        | -        | -         | -         | +      | -             |
| <i>E. saccharolyticus</i> | -                            | +            | ND                   | -                 | -                       | -                | +                                       | +                | +        | -        | +         | +        | -         | +         | ND     | -             |
| <i>E. sulfureus</i>       | +                            | +            | ND                   | +                 | -                       | -                | +                                       | +                | -        | -        | +         | -        | ND        | +         | +      | -             |
| <i>E. columbae</i>        | -                            | -            | ND                   | -                 | -                       | D+               | D                                       | +                | +        | +        | +         | +        | -         | D-        | +      | -             |
| <i>E. flavescens</i>      | +                            | ND           | D+                   | +                 | +                       | +                | +                                       | +                | +        | +        | +         | -        | -         | D-        | -      | +             |

**Erklärung der Zeichen:**

+ = positive Reaktion; D+ = gewöhnlich positiv; D = variabel; D- = gewöhnlich negativ; - = negative Reaktion; ND = keine Daten;  
a Bei *E. faecium*-Stämmen isoliert aus Geflügel kann es nach DEVRIESE und POT (1995) zu einer positiven Reaktion für D-Raffinose kommen.

### 3.3 Ermittlung des Antibiotikaresistenzverhaltens der isolierten Enterokokken gegenüber 23 ausgewählten Antibiotika

#### Grundlagen für die Auswahl der getesteten Antibiotika

Aus einer Gruppe von 38 veterinärmedizinischen Testsubstanzen, die TROLLDENIER (1999) zusammengestellt hatte, wurden die in der Tabelle 21 aufgeführten Antibiotika ausgewählt. Weil die Enterokokken zur Gruppe der grampositiven Bakterien gehören, wurden alle Antibiotika, die ihr Wirkungsspektrum ausschließlich im gramnegativen Bereich haben, von der Untersuchung ausgeschlossen. Ferner wurde die Herkunft der Proben aus dem Darm insoweit berücksichtigt, als hauptsächlich oral aufzunehmende Antibiotika Eingang in die Untersuchung fanden. Des Weiteren wurde versucht, möglichst Antibiotika, die für die drei untersuchten Nutztierarten zugelassen sind, einzubeziehen.

Darüber hinaus wurden alle Antibiotika unter den 38 veterinärmedizinischen Testsubstanzen, die nicht für lebensmittelliefernde Tiere zugelassen sind, aus dem Versuchsdesign herausgenommen. Es wurden auch die bei Antibiotika vorliegenden Kreuzresistenzen berücksichtigt und aus solchen Antibiotikasubstanzklassen möglichst nur ein Vertreter ausgewählt.

Da Enterokokken über natürliche Resistenzen gegen Cephalosporine, Aminoglykoside, Polymyxine, Lincomycin und Clindamycin verfügen, wurden diese Antibiotikasubstanzklassen nicht in die Untersuchungen einbezogen. Die ausgewählten veterinärmedizinischen Testsubstanzen wurden zusätzlich um gebräuchliche Antibiotika aus der Humanmedizin ergänzt und mit den zur Resistenztestung für Enterokokken vorgeschlagenen Antibiotika der verschiedenen Organisationen abgeglichen (Tabelle 21).

**Tabelle 21: Vergleich der ausgewählten Antibiotika zur Testung bei Enterokokken im Mikodilutionsverfahren zu den von größeren Organisationen für Enterokokken zur Testung vorgeschlagenen Antibiotika**

Vet. med. Testsubstanzen MAASTRICHT PAUL-EHRLICH-GES. 95 DANMAP97 NCCLS97

|                            |   |   |   |   |
|----------------------------|---|---|---|---|
| Penicillin                 |   |   | X | X |
| Ampicillin                 | X | X | X | X |
| Amoxicillin/ Clavulansäure |   | X |   |   |
| Enrofloxacin               |   |   | X |   |
| Streptomycin               | X |   | X | X |

|                           |   |   |   |   |
|---------------------------|---|---|---|---|
| Gentamicin                | X | X | X | X |
| Tetracyclin               | X |   | X | X |
| Erythromycin              | X | X | X |   |
| Tylosin                   |   |   |   |   |
| Sulfonamid/Trimethoprim   | A | X | X |   |
| Chloramphenicol           | X |   | X |   |
| Tiamulin                  |   |   |   |   |
| <u>Leistungsförderer:</u> |   |   |   |   |
| Avilamycin                | X |   |   | X |
| Flavophospholipol         |   |   |   | X |
| Bacitracin                |   |   |   | X |
| Salinomycin               |   |   |   | X |
| Monensin                  |   |   |   | X |
| Virginiamycin             | X |   |   | X |
| Tylosin s.o.              |   |   |   | X |
| Spiramycin                |   |   |   | X |
| Avoparcin                 |   |   |   | X |
| <u>Glykopeptide:</u>      |   |   |   |   |
| Vancomycin                | X | X | X | X |
| Teicoplanin               |   | X |   |   |
| Avoparcin s. o.           |   |   |   |   |
| <u>Streptogamine:</u>     |   |   |   |   |
| Virginiamycin s. o.       |   |   |   |   |
| Quinupristin/Dalfopristin | X |   |   |   |

Es fehlen: keine Ciprofloxacin Apramycin Ciprofloxacin  
 Doxycyclin Ceftiofur Norfloxacin  
 Imipenem Neomycin Nitrofurantin

X = in der Untersuchung enthalten

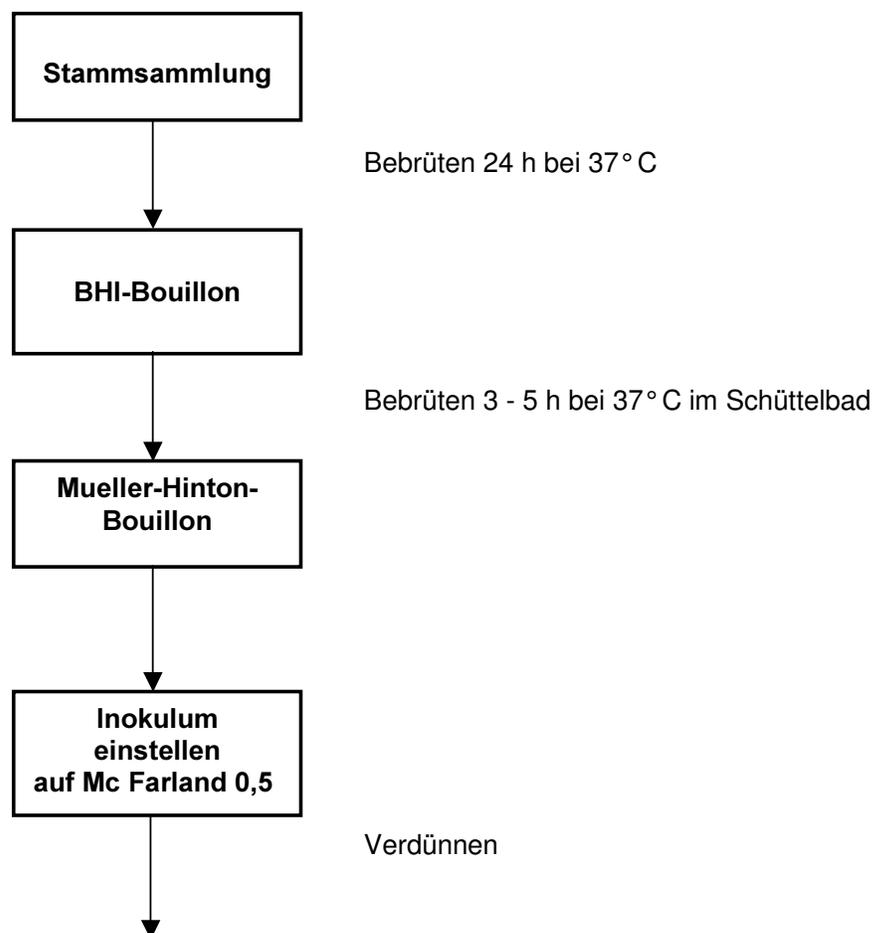
s. o. = siehe oben

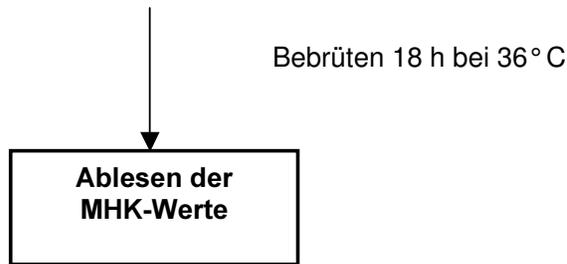
A = andere Verbindung aus derselben Antibiotikaklasse

Die Kombination Quinupristin/Dalfopristin stellt ein neu entwickeltes Therapeutikum gegen Enterokokkeninfektionen in der Humanmedizin dar und wurde in die Untersuchung einbezogen. Von Bedeutung ist hierbei die Zugehörigkeit zur Gruppe der Streptogramine, zu denen auch Virginiamycin aus der Gruppe der Leistungsförderer gehört.

Die in der Futtermittelverordnung vom 8. April 1981 in Anlage 3 unter Punkt 1.1 Antibiotika Stand 1994 genannten Antibiotika wurden komplett in der Untersuchung berücksichtigt, denn diese Daten von Fütterungsantibiotika können die Ergebnisse ergänzen, wie sie im Rahmen der von der FEDESA durchgeführten Studie II Initial Antibacterial Sensitivity Surveillance of Bacterial Isolates from Farm Animals in six European countries II anfielen. Weiterhin kann ein Vergleich mit den dänischen Studien (DANMAP) stattfinden.

**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Antibiotika-resistenzbestimmung**





### **Beschreibung der Verfahrensweise**

Die Prüfung der Empfindlichkeit für Antibiotika und Ionophore erfolgte im Mikrodilutionsverfahren nach DIN 58940 Teil 8, dargestellt in Abbildung 3. Die antimikrobiellen Wirkstoffe waren als Reinsubstanzen vorhanden, die benötigte Menge wurde anhand der Aktivität des Wirkstoffes ermittelt und mit einer Analysenwaage abgewogen. Die Stammlösung besaß mindestens einen Wirkstoffgehalt von 1000 µg/ml. In einer geometrischen Verdünnungsreihe wurden pro Wirkstoff 12 Wirkstoffkonzentrationen hergestellt. Die Lösung der Antibiotika und Leistungsförderer erfolgte nach den Angaben der Hersteller und nach der NCCLS-Empfehlung für die Lösung bestimmter Antibiotika, ansonsten wurden die Substanzen in dest. Wasser gelöst. Die 96 U-förmigen Näpfchen der Mikrotiterplatte wurden maschinell mit jeweils 100 µl der Mueller-Hinton-Bouillon und dem darin gelösten Antibiotikum befüllt. Es wurden 3 verschiedene Mikrotiterplattensätze hergestellt. Sie wurden bei -20° C gelagert und innerhalb von 12 Wochen verbraucht.

Zur MHK-Bestimmung wurden die isolierten Enterokokkenstämme aus der Stammsammlung entnommen. Dazu wurde eine mit dem Enterokokkenstamm beschichtete Glasperle in eine Brain-Heart-Infusion-Bouillon gegeben und 18 h bei 36° C bebrütet, so daß in der Bouillon mit einer Keimzahl von ca.  $10^9$  KbE/ml zu rechnen war. Ein Aliquot dieser Bouillon (200 µl) wurde entnommen und in einen mit 5 ml Mueller-Hinton-Bouillon gefüllten Erlenmeyerkolben eingebracht. Dieses Kölbchen wurde dann in einem Wasserbad für 3 - 5 h bei 36° C inkubiert. Die Dichte der Bakteriensuspension wurde mit Hilfe von physiologischer Kochsalzlösung auf einen 0,5 Mc Farland-Standard mittels eines Densimats eingestellt. Nach der Dichteeinstellung wurden 25 ml dieser verdünnten Bakteriensuspension in eine Plastikschaale gegeben und mit weiteren 25 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Jede der drei Mikrotiterplatte wurde mittels des Boekel-Inokulators mit 1 µl pro Näpfchen beimpft. Zwischen der Beimpfung jeder Mikrotiterplatte wurde der Inokulator mit Alkohol über dem Bunsenbrenner abgeflammt. Auf diese Weise lag eine Keimzahl von  $5 \times 10^5$ /ml in jedem Mikrotiterplattennäpfchen vor, wobei die Verdünnung des Inokulums durch die 100 µl Inhalt im Näpfchen eingerechnet ist. Aufgrund der Bedeutung der korrekten Keimzahleinstellung wurden zusätzlich jeweils 10 µl des Inokulums auf eine Columbiablutplatte mit 5 % Schafblut

überimpft. Diese dienten zugleich zur Überprüfung der Keimzahl in der Mikrotiterplatte, zur Reinheitskontrolle des Inokulums und zur nochmaligen Kontrolle der Pigmentbildung. Die aerobe Bebrütung der Mikrotiterplatten erfolgte 18 h bei 36° C, ausgewertet wurde über einem Spiegel. Die minimale Hemmstoffkonzentration wurde im Vergleich zur Wachstumskontrolle als erstes unbewachsenes Nöpfchen für alle getesteten Antibiotika für jeden Stamm ermittelt, weshalb auf allen der drei pro Stamm verwendeten Mikrotiterplatten eine Wachstumskontrolle mitgeführt wurde. Für jeden Tagesdurchlauf wurden die Kontrollstämme *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 und *E. coli* ATCC 25922 eingesetzt. Sie dienten als Qualitätskriterium für die MHK-Wertbestimmung; bei einer Abweichung von nur einer MHK-Stufe wurde der gesamte Tagesdurchlauf wiederholt. Die Kontrollstämme wurden auf TSA-Agar bei 4° C gehalten und wöchentlich überimpft. Einmal pro Monat wurden sie von der bei -80° C gelagerten Stammsammlung neu auf TSA-Agar angelegt. Für diese Untersuchung wurde eine Charge von Mikrotiterplatten verwandt. Eine Sterilitätskontrolle, bei der sich kein Wachstum zeigen durfte, wurde dreifach durchgeführt,.

### **Fertigung der Mikrotiterplatten zur Antibiotikaresistenzbestimmung im Mikrodilutionsverfahren**

Die Einwaageformel gemäß NCCLS 1997 lautet:

$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{Volume (ml)} \times \text{Concentration } (\mu\text{g/ml})}{\text{Assay Potency } (\mu\text{g/mg})}$$

Gemäß dieser Gleichung wurde unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität eines Antibiotikum in der jeweils vorliegenden Charge die Einwaagemenge errechnet.

Die Formel wurde auf ein Volumen von 150 ml bezogen, da die Ausgangslösung aus technischen Gründen gleich im ersten Arbeitsschritt mit 149 ml Aqua dest. verdünnt wurde. Die zu erstellende Stammlösung I wurde mit einer Konzentration von 512 µg/ml angesetzt, weil die erste Verdünnungsstufe und somit die erste Wirkstoffstufe in der Mikrotiterplatte 256 µg Wirkstoff/ml betrug. Somit lautete die konkret angewandte Einwaageformel:

$$\text{Weight (mg)} = \frac{150 \text{ ml} \times 512 \mu\text{g/ml}}{\text{Assay Potency } (\mu\text{g/mg})}$$

Lediglich für Penicillin, Bacitracin und Avilamycin wurde die Einwaage für die Stammlösung I mit der Konzentration von 256 µg Wirkstoff/ml angesetzt. Aus der Tabelle 22 sind Antibiotika, Aktivität der Charge, Einwaagemenge sowie das angewandte Lösungsmittel ersichtlich.

**Tabelle 22: Fertigung der Mikrotiterplatten zur Mikrodilution mit Angabe der verwendeten Antibiotika, ihrer Einwaagemenge und dem Lösungsmittel**

| <b>Antibiotika</b>                                 | <b>Aktivität</b>                                  | <b>Einwaage</b>  | <b>Lösungsmittel</b>                     |
|--|---|------------------|--|
| Penicillin-G<br>(Benzylpenicillin)<br>Natrium Salt | 1690 U/mg   | 38,4 mg          | Aqua dest.                               |
| Ampicillin<br>Natriumsalz                          | > 98,5 %  | 78,37 mg         | 1ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 8            |
| Augmentan  | 3,2 mg /1,6 mg                                    | 76,8 mg = 24 St. | ADATAB                                   |
| Enrofloxacin                                       | 99,3 %  | 77,34 mg         | 1ml n/10 NaOH                            |
| Gentamicin Sulfate                                 | 638 µg/ml   | 120,38mg         | 1ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 8            |
| Tetracyclin<br>Hydrochloride                       | 999 µg/ml   | 76,88 mg         | Aqua dest.                               |
| Erythromycin                                       | 98 %  | 78,37 mg         | 1 ml 96 % Ethanol                        |
| Cotrimoxazole                                      | 6,4 mg/0,32mg                                     | 76,8 mg =12 St.  | ADATAB                                   |
| Chloramphenicol                                    | 100 %   | 76,8 mg          | 1ml 96 % Ethanol                         |
| Avilamycin   | 1206 U/mg   | 31,84mg          | 10 ml 99,5 % Methanol                    |
| Flavomycin   | 990 µg/ml   | 77,58 mg         | Aqua dest.                               |
| Monensin sodium                                    | 971 mcg/mg  | 79,09 mg         | 3 ml 96 % Ethanol                        |
| Salinomycin-Sodium                                 | 980 µg/ml   | 78,37 mg         | 5 ml 96 % Ethanol                        |
| Spiramycin   | 1230 µg/ml  | 62,44 mg         | 1 ml 96 % Ethanol                        |
| Tylosin Tartrate                                   | 884 µg/ml   | 86,88 mg         | 3 ml 96 % Ethanol                        |
| Virginiamycin                                      | 222 %   | 34,59 mg         | 4 ml 96 % Ethanol                        |
| Bacitracin   | 66.000 U/g  | 581,82 mg        | 1,1 ml 0,1n HCL und 0,1 ml<br>Aqua dest. |
| Avoparcin  | 93,2 mg<br>Analytischer<br>Standard pro<br>100 mg | 82,4mg           | Aqua dest.                               |
| Vancomycin<br>Hydrochloride                        | 1058 µg/mg  | 72,59 mg         | Aqua dest.                               |
| Teicoplanin  | 104,4 %   | 73,56 mg         | Aqua dest.                               |
| Quinupristin/<br>Dalfopristin                      | 98 %  | 78,37 mg         | Aqua dest.                               |
| Streptomycinsulfat                                 | 761 E/mg  | 100,93 mg        | 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH<br>8,0      |
| Tiamulin fumarate<br>vet                           | 100,2 %   | 76,65 mg         | 1 ml 99,5 % Methanol                     |

Die errechnete Einwaagemenge (Tabelle 22) wurde zuerst in 1 ml Aqua dest. gelöst, ehe die 149 ml Aqua dest. hinzugefügt wurden. Die sich ergebenden 150 ml bildeten die Stammlösung I. Mußte das Antibiotikum in größeren Mengen Lösungsmittel, was ebenfalls aus der Tabelle 22 ersichtlich ist, gelöst werden, wurde dafür der 149 ml Aqua dest. Anteil reduziert. Die Mueller-Hinton-II-Bouillon wurde in doppelt konzentrierter Form zugefügt, weil sie im ersten Verdünnungsschritt immer mit 50 ml Stammlösung versetzt wurde, die hauptsächlich aus Aqua dest. besteht und trotzdem optimale Wachstumsbedingungen

garantieren sollte. Jede Mikrotiterplatte besaß als Wachstumskontrolle ein mit 100 µl einfach konzentrierter Mueller-Hinton-II-Bouillon gefülltes Näpfchen.

**Tabelle 23: Schema der Verdünnungsreihe für die Wirkstoffkonzentrationen im Mikrodilutionsverfahren gemäß NCCLS 1997**

| Konzentration | Stamm-lösung | Volumen-teile | Lösung | Volumen-teile | Bouillon | Aqua dest. | Volumen insgesamt | Erreichte Konzentration | MHK-Platte-Näpfchen |
|---------------|--------------|---------------|--------|---------------|----------|------------|-------------------|-------------------------|---------------------|
| µg/ml         |              |               | ml     |               | ml       | ml         | ml                | µg/ml                   |                     |
| 512           | I            |               |        |               |          |            |                   |                         |                     |
| 512           | I            | 1             | 50     | 1             | 50       |            | 100               | 256                     | 12                  |
| 512           | I            | 1             | 25     | 3             | 50       | 25         | 100               | 128                     | 11                  |
| 512           | I            | 1             | 12,5   | 7             | 50       | 37,5       | 100               | 64                      | 10                  |
| 512           | I            | 1             | 25     | 7             |          | 175        | 200               | 64                      | II                  |
| 64            | II           | 1             | 50     | 1             | 50       |            | 100               | 32                      | 9                   |
| 64            | II           | 1             | 25     | 3             | 50       | 25         | 100               | 16                      | 8                   |
| 64            | II           | 1             | 12,5   | 7             | 50       | 37,5       | 100               | 8                       | 7                   |
| 64            | II           | 1             | 25     | 7             |          | 175        | 200               | 8                       | III                 |
| 8             | III          | 1             | 50     | 1             | 50       |            | 100               | 4                       | 6                   |
| 8             | III          | 1             | 25     | 3             | 50       | 25         | 100               | 2                       | 5                   |
| 8             | III          | 1             | 12,5   | 7             | 50       | 37,5       | 100               | 1                       | 4                   |
| 8             | III          | 1             | 25     | 7             |          | 175        | 200               | 1                       | IV                  |
| 1             | IV           | 1             | 50     | 1             | 50       |            | 100               | 0,5                     | 3                   |
| 1             | IV           | 1             | 25     | 3             | 50       | 25         | 100               | 0,25                    | 2                   |
| 1             | IV           | 1             | 12,5   | 7             | 50       | 37,5       | 100               | 0,125                   | 1                   |

Um Verdünnungsfehler zu reduzieren, wurden nach NCCLS immer aus einer Stammlösung 3 Wirkstoffkonzentrationen hergestellt. Aus Stammlösung I entstanden die Wirkstoffkonzentrationen 256 µg/ml, 128 µg/ml und 64 µg/ml. Aus der dritten Verdünnungsstufe entstand gleichzeitig die Stammlösung II mit 64 µg/ml. Tabelle 23 erläutert noch einmal das Verdünnungsschema, während Tabelle 24 die Belegung der Mikrotiterplatten und mit den Antibiotika präsentiert.

Jedes Nöpfchen auf der 96er Mikrotiterplatte wurde mit jeweils 100 µl durch den Automaten MIC-2000 Plus befüllt. Die gegossenen Mikrotiterplatten wurden in 15er Stapeln mit einer Abdeckplatte versehen, in Plastikfolien verpackt und sofort bei – 20° C eingefroren. Sie wurden innerhalb von 3 Monaten verbraucht.

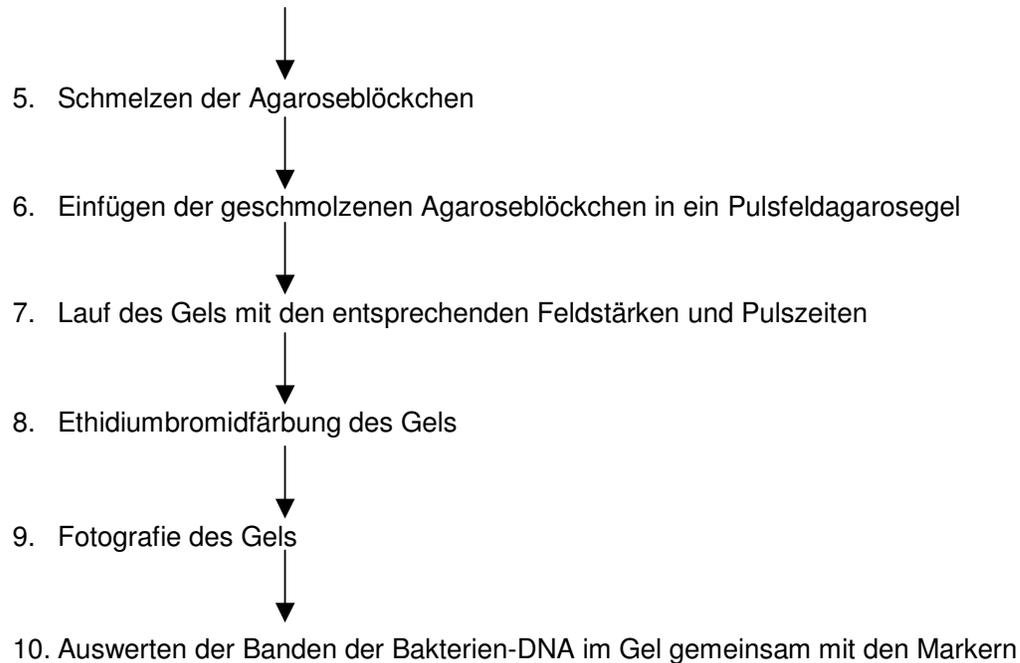
**Tabelle 24: Belegung der Mikrotiterplattennöpfchen mit den Wirkstoffen in den unterschiedlichen Verdünnungsstufen**

| Wirkstoff in                  | µg/ml |      |     |    |    |    |   |   |   |     |      |       |       |        |
|-------------------------------|-------|------|-----|----|----|----|---|---|---|-----|------|-------|-------|--------|
| Ampicillin                    | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Augmentan                     | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Enrofloxacin                  | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Erythromycin                  | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Tetracyclin                   | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Gentamicin                    | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Vancomycin                    | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Teicoplanin                   | Leer  | >128 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Chloramphenicol               | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Flavophospholipol             | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Salinomycin                   | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Monensin                      | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Quinupristin/<br>Dalfopristin | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Virginiamycin                 | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Tylosin                       | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Spiramycin                    | Leer  | >128 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Cotrimoxazol                  | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Penicillin                    | >128  | 128  | 64  | 32 | 16 | 8  | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,06  | <0,06  |
| Streptomycin                  | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Avilamycin                    | >128  | 128  | 64  | 32 | 16 | 8  | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,06  | <0,06  |
| Avoparcin                     | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |
| Bacitracin                    | >128  | 128  | 64  | 32 | 16 | 8  | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,06  | <0,06  |
| Tiamulin                      | >256  | 256  | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1   | 0,5  | 0,25  | 0,125 | <0,125 |

### 3.4 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Pulsfeldgelelektrophorese umfasste folgende Arbeitsschritte:

1. Einschluß der aufbereiteten Bakterienzellen in Agaroseblöckchen
- ↓
2. Lysis der Zellmembran und einiger Proteine mit Hilfe von Lysozym
- ↓
3. Proteolytische Spaltung der Proteine des Chromatins mit Proteinase K
- ↓
4. Zerschneidung der Bakterien-DNA durch Restriktionsendonuclease



Die hier angewandte Labormethode lehnte sich an die Verfahren nach EISENACH (1992), KLARE und WITTE (1997) sowie LEMCKE und BÜLTE (2000) an.

**Zu 1.** Zur Untersuchung der Enterokokken erfolgte die Anzucht aus einer Kolonie in 20 ml Tryptic Soy Broth. Es wurde bei 37° C im Schüttelinkubator 18 – 20 h bebrütet, danach die Tryptic Soy Broth innerhalb von 30 min auf 4° C abgekühlt und im kühlen Zustand in Zentrifugenröhrchen eingefüllt, um 10 min bei 5.000 rpm in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde abgegossen und das Sediment in 5 ml gekühltem (4° C) TE-Puffer resuspendiert. Danach wurde nochmals 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und in 250 µl gekühlten TE-Puffer resuspendiert.

Mit Hilfe eines Photometers wurde die Dichte der Bakterienmenge eingestellt, um eine Transmission der Bakteriensuspension von 2 – 3 % bei 620 nm zu erreichen. Hierfür wurde der Blindwert, d. h. 100 %ige Transmission, mit Hilfe einer mit TE-Puffer gefüllten Küvette bei 620 nm eingestellt und immer wieder zwischen den Messungen darauf geeicht. Die Küvetten wurden mit 250 µl TE-Puffer gefüllt und jeweils tropfenweise die Bakteriensuspension zugesetzt. Mehrmaliges Aufziehen in der Eppendorfpipette erzeugte eine gleichmäßige Durchmischung. Die eingestellten Suspensionen wurden anschließend in Eppendorfgefäße pipettiert.

Pro Enterokokkenstamm wurden drei Blöckchen gegossen. Dazu wurden InCert-Agarose 1,0 %ig in TE-Puffer angesetzt und in der Mikrowelle bis zur Lösung erhitzt. Sie wurde anschließend in ungefähr 15 min im Thermomixer zur Abkühlung auf 56° C gebracht. Gleichzeitig wurde die Bakteriensuspension in einem Wasserbad auf 56° C angewärmt.

150 µl der Enterokokkensuspension und 150 µl der InCert-Agarose wurden dann im Eppendorfgefäß gemischt und sofort in den Gießblock mit der Eppendorfpipette eingefüllt. Drei Hohlräume im Gießblock wurden pro Bakterienstamm komplett gefüllt. Der befüllte und abgedeckte Gießblock wurde innerhalb von 15 - 30 min im Kühlschrank auf 4° C abgekühlt, bis die Agarose vollständig erstarrt war. Das Gießen der Blöckchen dient dem Schutz der Bakterien-DNA, die sie umschließende Agarose verhindert ein spontanes Zerfallen der DNA, ist aber gleichzeitig permeabel für Puffer und Enzyme.

**Zu 2.** Die fertigen Agaroseblöckchen wurden aus dem Gießblock mittels Glashaken gelöst und je 3 Stück vom selben Enterokokkenstamm in ein Reagenzglas gefüllt. Es wurden vorher 600 µl Lysispuffer, in dem bereits 3 mg Lysosym gelöst waren, in das Reagenzglas gefüllt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37° C im Wasserbad. Hierbei wurden die Zellmembran der Bakterien sowie einige Bakterienproteine enzymatisch aufgelöst.

**Zu 3.** Sämtliche Proteine der ehemaligen Bakterienzelle wurden enzymatisch mit Hilfe von 15 µl Proteinase K pro Reagenzglas verdaut. Aufgrund des Aktivitätsoptimums des Enzyms bei 56° C wurde das Reagenzglas in ein Wasserbad mit dieser Temperatur gestellt und 12 - 18 h inkubiert. Die Blöckchen müssen danach durchsichtig und farblos sein. Mittels Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) wurde dann die Proteinase K inaktiviert.

Durch die nun folgenden Waschschrte wurden kleine Bakterienfragmente, die durch die beiden Enzyme entstanden waren, sowie die Proteinase K entfernt.

Es wurde möglichst die gesamte Flüssigkeit aus dem Reagenzglas mit Hilfe einer gestopften Pasteurpipette entfernt, nur die Blöckchen blieben unverletzt zurück. Es wurden 600µl TE-Puffer ins Reagenzglas gegeben, welches dann 30 min bei Raumtemperatur ruhte. Dieser Vorgang wurde anschließend wiederholt. Danach folgte ein weiterer Waschschrte, nur diesmal wurden den 600 µl TE-Puffer noch 6 µl PMSF zugegeben. Hier wurde dann 1 h bei 56° C im Wasserbad inkubiert. Auch dieser Vorgang wurde noch einmal durchgeführt. Nun schloß sich noch zweimal der erste Waschschrte wieder an.

**Zu 4.** Als Restriktionsendonuklease wurde für Enterokokken das Enzym Smal aus dem Bakterium *Serratia marcescens* verwendet, das die Basensequenz CCC GGG schneidet und sich daher gut für Enterokokken, die einen hohen Guanin- und Cytosin-Anteil besitzen, eignet.

Es wurden 40 Einheiten (U) Smal pro µl Stammlösung benötigt und in jedes Reagenzglas 200 µl eingefüllt und bei 25° C 24 h im Wasserbad inkubiert.

**Zu 5.** Das Pulsfeldagarosegel wurde hergestellt, indem 120 ml Agarose in 0,5 x TBE-Puffer gelöst wurden. Es entstand eine 1,1 %ige Agarose. Sie wurde in der Mikrowelle langsam

verflüssigt und auf 56° C temperiert 30 min im Wasserbad gehalten. Die 1,1 %ige Agarose wurde anschließend in einen Block auf dem Nivelliertisch gegossen und der Kamm mit einer Dicke von 0,75 mm und 15 Zacken in die Kammer gehängt. 30 - 45 min benötigte das Gel im Kühlschrank, um zu erkalten und fest zu werden.

**Zu 6.** Die Blöckchen wurden bei 68° C 10 min im Thermomixer geschmolzen. Anschließend wurden 30 µl der geschmolzenen Blöckchen mit einer Eppendorfpipette in die nach Herausnahme des Kamms entstandenen Slots gefüllt. In die Slots am Rande des Gels wurden zwei Marker (Sigma 0,1 - 200 kb und 50 - 1000 kb) eingesetzt und ein Kontrollstamm *E. faecium* 70/90 mitgeführt.

**Zu 7.** Die Pulsfeldgelelektrophoresekammer wurde mit TE-Puffer befüllt und der beschickte Block hineingesetzt. Das Pulsfeld wurde in zwei Blöcken erzeugt: Block I 1 - 13 s für 20 h und Block II 13 - 30 s für 5 h, bei einer permanenten Temperatur von 14° C und einer Voltstärke von 200 bei 6 Volt/cm.

**Zu 8.** Danach wurde das Gel in einem 0,05 %igem Ethidiumbromidbad unter dem Abzug auf einem Schüttelapparat 25 min. gefärbt und über Nacht im Wasserbad mit dest. Wasser kontinuierlich bewegt.

**Zu 9.** Ein Foto des Gels wurde mit einer festmontierten Kamera über einer 70 %igen UV-Lampe auf dem Polaroidfotopapier erstellt. Gleichzeitig wurde mittels des Bioprofilcomputerprogrammes und der angekoppelten Kamera eine Foto des Gels als Tif-Datei angelegt und gespeichert.

**Zu 10.** Die Auswertung der Gele zur Analyse der Verwandtschaften erfolgte zunächst visuell.

### **Methodik der Pulsfeldgelelektrophorese**

Die Auswertung der DNA-Banden erfolgte zuerst visuell, wobei jeder Locus sorgfältig auf die An- oder Abwesenheit eines Bandes untersucht wurde. Anhand mitgeführter Marker wurden die Kilobasengrößen der einzelnen Stämme ermittelt. Anschließend erfolgte eine Auswertung der Gele zur Analyse der Verwandtschaften mittels Gel-Compar-Software 4.2 (Applied Maths, Kortrijk, Belgien). Die DNA-Verwandtschaft wurde nach BERTRAND et al. (2000) mittels des Dice-Koeffizienten bei einer Positionstoleranz von 0,8 % und einer Optimierung von 0,8 % ermittelt. Die Stämme wurden anschließend mit Hilfe des UPGMA (unweighted pair group method by arithmetic averages)-Clustering-Algorithmus zu Stamm-

bäumen zusammengefaßt. Die Auswertung der PFGE-Banden geschah nach der Richtlinie von TENOVER et al. (1995), wie sie für einen Ausbruch einer Infektionskrankheit über einen bestimmten Zeitraum im Krankenhaus entwickelt wurde. Hiernach sind Isolate, die sich um 3 Banden oder mehr unterscheiden, nicht miteinander verwandt. Demnach sind Stämme mit einem Übereinstimmungsgrad von über 85 % als miteinander verwandt anzusehen.