

4 Methoden

4.1 Probenentnahmen

Entnahme von Nasentupferproben bei Hunden

Nasentupfer von Hunden wurden durch leichtes Drehen eines Wattetupfers (MAST-Tupfersystem) im anterioren Nasenvorhof beider Nasenausgänge gewonnen. Dabei wurde der Kopf des Tieres durch den Probennehmer fachgerecht und ohne Einsatz von Hilfsmitteln ruhig gehalten.

Entnahme von Nasentupferproben bei Menschen

Das Klinikpersonal hat unter Anleitung einen Abstrich beider Nasenvorhöfe (MAST-Tupfersystem) vorgenommen.

Tupferproben von Gegenständen

Gegenstände wurden durch Abstreichen mit einem angefeuchteten Tupfer (MAST-Tupfersystem) beprobt.

4.2 Lagerung und Kultivierung

Die Anzucht und anschließende Subkultivierung der Staphylokokken aus klinischen Proben oder aus eingesandten Stämmen erfolgte auf Hammelblut-Agarplatten bei 37°C (ü.N.).

Um Bakterienstämme zu konservieren, wurden in einem Reagenzröhrchen in 5ml LB-Medium jeweils eine Kolonie einer ü.N. bebrüteten LB-Agarplatte angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Bakterienkultur wurden 1,3ml entnommen, mit 0,5 ml Glycerin (Rotipuran®, Glycerol, Roth GmbH & Co., Karlsruhe) vermischt und in einem 2ml Cryo-Röhrchen bei -70°C gelagert.

4.3 Phänotypische Identifizierung von *S. aureus* und *S. intermedius* sowie koagulasenegative *Staphylococcus spp.*

Staphylokokken-verdächtige Kolonien (runde, grau-weiße bis gelbliche, klein- bis mittelgroße Einzelkolonien) mit unterschiedlichen Hämolyseformen (keine, unvollständige, vollständige oder doppelzonige Hämolyse) wurden zunächst subkultiviert und einer Gram-Färbung unterzogen. Mit allen grampositiven Kokken wurde anschließend ein Katalasetest durchgeführt. Katalase- und grampositive Kokken wurden als Staphylokokken eingestuft und hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Koagulation von Kaninchen-Citratplasma sowie zur anaeroben Verwertung von Mannit (53) geprüft (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Ausgesuchte phänotypische Merkmale von *Staphylococcus* spp.

Spezies	Katalase	Koagulase	Anaerobe Mannitverwertung	Hämolyse
Koagulase-negative <i>Staphylococcus</i> spp. (KONS)	+	-	unterschiedlich	variabel
<i>S. aureus</i>	+	+	+	variabel*
<i>S. intermedius</i>	+	+	-	doppelzonig
<i>S. hyicus</i>	+	variabel	-	keine

* schwache, verzögerte, starke und doppelzonige Hämolyseformen möglich

Tabellarische Darstellung: nach Burkhardt 1992: Mikrobiologische Diagnostik (4).

4.4 Evaluierung von Identifizierungsmöglichkeiten für MRSA in der Veterinärmedizin

4.4.1 Agardiffusionsverfahren mit Oxacillin und Cefoxitin

Grundlage dieser häufig angewendeten Methode ist die zeitabhängige Diffusion eines antiinfektiven Wirkstoffes aus einem Filterplättchen in einem halbfestes Kulturmedium, auf welchem zuvor eine bestimmte Menge an Bakterien durch dreimaliges versetztes Ausstreichen eines in einer Standard-Verdünnung (McFarland 0,5) getränkten Wattetupfers aufgetragen wurde. Nach einer definierten Bebrütungsdauer bei einer standardisierten Temperatur erfolgt dann die Auswertung durch Bestimmung von Hemmhofdurchmessern, die im Regelfall nach den Normen der NCCLS (142) bewertet werden.

Für den in dieser Arbeit eingesetzten vergleichenden Agardiffusionstest zur Identifikation von MRSA auf Müller-Hinton-Agar (35°C, 24h) wurden sowohl Oxacillin 1µg (Resistenz ≤ 13mm Hemmhofdurchmesser) Oxacillin 5µg (Resistenz ≤ 20mm Hemmhofdurchmesser) sowie Cefoxitin 30µg (Resistenz ≤ 20mm Hemmhofdurchmesser bzw. Resistenz ≤ 23mm) eingesetzt (46; 142). Zur Qualitätskontrolle wurde der Referenzstamm DSMZ 4910 herangezogen (Tabelle 3).

116 *S. aureus*-Isolate (davon 21 MRSA) des Gesamtkollektives aus der klinischen Diagnostik (von November 2002 bis Februar 2004) des Institutes für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin haben in diese Untersuchung Eingang gefunden.

4.4.2 Oxacillin-Screening-Agar

Mit dem Oxacillin-Screening-Agar sollen alle MRSA, auch Kulturen mit einer variablen phänotypischen Merkmalsexpression, erfasst werden. Als positiv bewertet wird jegliches Wachstum nach 18h. In diesem Zusammenhang wird auch eine mögliche Temperaturabhängigkeit der Expression des *mecA*-Gens überprüft. Zu diesem Zweck werden die Oxacillinplatten bei 37°C und bei 30°C inkubiert (83).

4.4.3 Validierung der phänotypischen Tests durch Abgleich mit PCR

Die Ergebnisse des Agardiffusionsverfahrens und des Oxacillin-Screening-Agars wurden mit den PCR-Resultaten der untersuchten *S. aureus*-Isolate verglichen. Zum Einsatz gelangte hier eine Triplex-PCR zum Nachweis von *S. aureus*, MRSA und *S. intermedius* (siehe auch 4.6). Ein speziesspezifisches Amplifikat (*nuc*, 367bp) und der Nachweis des *mecA*-Gens (*mecA*, 533bp) galt hierbei als sicherer MRSA-Nachweis (83).

4.4.4 Auswertung der diagnostischen Tests

Medizinische Testverfahren aller Art sind grundsätzlich mit zwei potentiellen Fehlerquellen belastet:

1. Erkrankte werden als gesund (erniedrigt die **Sensitivität**)
2. Gesunde als krank eingestuft (erniedrigt die **Spezifität**)

Häufig wird der erste Fall indirekt durch die Angabe der prozentualen Sicherheit für das Erkennen eines Krankheitsfalles umschrieben (z.B. 90%). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass 10% der Kranken nicht als krank erkannt werden.

Neben dem eigentlichen Testergebnis ist somit die wahrscheinliche Richtigkeit für dieses Ergebnis für die Effizienz und die Anwendbarkeit der Testmethode entscheidend.

Deshalb erfolgt die Auswertung der diagnostischen Testergebnisse zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität unter Zuhilfenahme einer Vier-Felder-Tafel (12), diese erlaubt evidenzbasierte Aussagen. Anschließend wurde die Wahrscheinlichkeit für einen positiven oder negativen Vorhersagewert (engl.: positive predictive value (ppv); negative predictive value (npv)) berechnet (14).

4.5 Phänotypische Resistenzbestimmungen

Resistogramme von MRSA-Isolaten (Filterplättchendiffusionstest)

Die Antibiogramme der MRSA-Isolate wurden mit der Agar-Disc-Methode (Filterplättchendiffusionstest) ermittelt, dabei ist Koloniematerial des zu prüfenden Stammes in MH-Bouillon bis zu einer Standard-Trübung (0,5 McFarland) suspendiert worden. Diese Suspension diente als Inoculum für eine Müller-Hinton-Agar-Platte, auf welcher die Bakterienlösung mit einem Wattestäbchen durch dreimaliges versetztes Ausstreichen aufgebracht wurde. Nach einer Trocknungszeit von ca. 5min. bei Zimmertemperatur wurden Standard-Filterplättchen (Becton/Dickinson, Heidelberg) des zu testenden Hemmstoffes aufgelegt.

Für die Resistogramme wurden folgende Antiinfektiva herangezogen:

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten beschichteten Filterplättchen

Antibiotikum	Abkürzung	Beschickung (μg)
Ampicillin	Amp.	10
Cefquinom	Ceq.	10
Ceftiofur	Cef.	30
Chloramphenicol	C.	30
Doxycyclin	Dox.	30
Erythromycin	Ery.	15
Gentamycin	Gm.	10
Marbofloxacin	Mar.	5
Penicillin	P.	10U
Streptomycin	S.	10
Sulfonamid/ Thrimetoprim	SxT.	23,75/1,25 (25)
Tetrazyclin	Tet.	30

Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) von Nicht- β -Lactamantiinfektiva

Für ausgewählte MRSA-Isolate ist die minimale Hemmkonzentration (MHK) der Wirkstoffe Erythromycin, Gentamycin, Clindamycin, Chloramphenicol, Enrofloxacin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol, Tetrazycline, Neomycin gemäß M31-A2 (142) bestimmt worden.

4.6 Molekulargenetische Methoden

Gewinnung genomischer DNS für die Staphylokokken-Typisierung

Zur Isolierung genomischer DNS wurden Einzelkolonien von Subkulturen in 50 μl Lysostaphin (0,1mg/ml) resuspendiert und bei 37°C 10min inkubiert. Anschließend wurden 150 μl TE- Puffer und Proteinase K (0,1mg/ml) zugegeben. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 20min wurde die enzymatische Aktivität durch Hitze (>95°C, 5min) unterbrochen.

Gewinnung genomischer DNS für die MLST- Analyse

Um möglichst reine genomische DNS für die MLST-Analyse zu erhalten, wurde 1/8 einer über Nacht mit einem geschlossenen Bakterienrasen bewachsenen Hammelblutplatte in 400 μl MLST-Lysispuffer resuspendiert. Es schloss sich eine 30minütige Inkubation bei 37°C an, die durch Erhitzen auf 95°C für weitere 10min beendet wurde.

Nach Platzierung der Proben auf Eis wurde jeweils 1ml Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol zugegeben und invertiert.

Es folgte eine Zentrifugation (gekühlt, 4°C, 10.000x g) für 20min. Die wässrige Phase des Gemisches wurde schließlich mittels Pipette in ein frisches Reaktionsröhrchen überführt und 1ml Ethanol (rein) zugegeben. Eine weitere Kühlphase auf Eis (15min) sowie ein weiterer Zentrifugationsschritt (10.000 x g, 20min, 4°C) schlossen sich an.

Abschließend wurde der Überstand abpipetiert und das DNS-haltige Pellet mit 50 μl dH₂O resuspendiert (www.mlst.net).

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird eingesetzt um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNS-Stranges zu vervielfältigen. Dabei kann es sich um ein Gen oder auch nur um einen Teil eines Gens handeln. Im Gegensatz zu lebenden Zellen kann der PCR-Prozess nur kurze DNS-Abschnitte bis zu ca. 10.000 Basenpaaren kopieren und exponentiell amplifizieren.

Als Ausgangs-DNS wurde chromosomale DNS verwendet, die je nach Erforderlichkeit durch die oben beschriebenen Bedingungen gewonnen wurde. Die PCR startet mit einer thermischen Denaturierung der Ausgangs-DNS, wobei die DNS-Doppelhelixstruktur in komplementäre Einzelstränge aufgespalten wird. Anschließend binden kurze synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) bei entsprechenden Annealingtemperaturen an die DNS-Einzelstrangbereiche. Die Annealingtemperatur leitet sich aus der Schmelztemperatur der verwendeten Primer ab. Durch eine temperaturabhängige DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) findet dann die Elongation statt, wobei die Länge des Amplifikates dem Abstand der beiden Primer auf dem Genom entspricht. Da jedes Amplifikat als neue Matrizen-DNS fungiert, werden bis zu 2²³ Kopien (bei 25 Zyklen) der ursprünglichen DNS synthetisiert.

Die Dokumentation aller PCR-Ergebnisse in dieser Arbeit erfolgte durch Fotografieren der Gele unter UV-Licht (Transilluminator TI, Biometra, Wiesbaden; Photo-Kamera Polaroid MP4+ Instant Camera System).

Agarose-Gelelektrophorese

Die Methode der Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNS-Fragmenten (z.B. PCR-Amplifikaten), die in Abhängigkeit ihrer molekularen Größe ein halbfestes Medium (Agarosegel) unterschiedlich schnell passieren. Eine Platzierung des Gels in einer Gelkammer mit einem angeschlossenen elektrischen Feld veranlasst die polaren Stränge in größenabhängiger Geschwindigkeit das Medium zu passieren. Mittels eines DNS-Markers (Lambda Hind3 Marker) kann nach Abschluss der Elektrophorese und Färbung des Gels mit Ethidiumbromid die Größe der einzelnen Amplifikatfraktionen unter UV-Licht bestimmt werden. Die Dokumentation erfolgte genauso wie für PCR-Ergebnisse beschrieben.

1,2g Agarose wurde durch Aufkochen in 100ml 1 x TBE gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 55°C und Zugabe von 1,3µl einer Ethidiumbromidlösung (1%-ig) wurde die flüssige Agarose in eine Gelkammer gegossen, in der sich ein Probenaschenkamm mit 13 bis 24 Taschen befand. Nach dem Erhärten wurde das Gel in die entsprechende, mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gelegt. Nachdem 7µl des jeweiligen PCR-Produktes mit 3µl der Stop-Lösung vermischt und neben einem 100bp DNS Marker (Life TechnologiesTM, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) in die einzelnen Probenaschen pipettiert worden sind, wurde ein elektrisches Feld von 90V für 45min an die Elektrophorese-Kammer angelegt.

Triplex-PCR zum Nachweis von *S. aureus*, *S. intermedius* und MRSA

Die für diese Arbeit entwickelte Triplex-PCR diente zum gleichzeitigen Nachweis des *mecA*-Gens sowie von speziesspezifischen Gensequenzen für *S. aureus* und *S. intermedius* (101). Hierbei wurde von mir eine in der Humanmedizin angewendete Methode, die als Goldstandard der MRSA-Diagnostik gilt (102), durch Integration des *S. intermedius*-Nachweises (101) für den Einsatz in der Veterinärmedizin modifiziert. Der sichere *S. intermedius*-Nachweis mittels dieser 16S RNA-Sequenz setzt allerdings lt. (101) einen positiven Test auf Plasmakoagulase voraus.

Die zur Etablierung und Evaluierung dieser Methode benötigten MRSA-Stämme wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Witte (RKI Wernigerode, Nationales Referenzlabor für Staphylokokken) zur Verfügung gestellt.

Der auf Eis pipettierte Reaktionsansatz für die Triplex-PCR zum Nachweis von *S. aureus*, *S. intermedius* und MRSA setzte sich wie folgt zusammen:

2,5µl	10 x PCR Puffer
0,8µl	MgCl ₂ (50mM)
0,6µl	dNTPs (10mM jeweils)
1,25µl	6 x Reaktionsprimer (10pM jeder)
0,2µl	TaqDNA-Polymerase 5 U/µl
5µl	Template DNS
ad 25 µl	A. bidest.

Der Reaktionsansatz wurde nach dem Mischen im letzten Pipettierschritt kurz hochtourig zentrifugiert und umgehend in den Thermocycler (Touch-down; Hybaid) gestellt. Die Annealingtemperatur wurde schrittweise um ein Grad erniedrigt, ausgehend von 57°C. Die endgültigen Bedingungen der PCR waren eine initiale Denaturierung bei 94°C für 5min, gefolgt von 25 Zyklen, wobei t₁ 94°C für 1min, t₂ 54°C für 1min und t₃ 72°C für 30sec betragen. Abschließend fand die Endelongation bei 72°C für 7min statt.

Zur Ermittlung und Identifizierung der Fragmentgrößen wurde anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Multiplex-PCR für die SCC_{mec}-Typisierung

Die Multiplex-PCR für die Typisierung der SCC_{mec}-Genkassetten wurde durchgeführt wie von Oliveria et al. (99) beschrieben. Im Falle unklarer Ergebnisse aufgrund der relativen Nähe der erzielten DNS-Banden wurde die PCR als "Single-Locus"-Variante unter den gleichen Versuchsbedingungen wiederholt.

PCR für den Nachweis des Panton-Valentine-Leukozidin Faktors (PVL)

Der auf Eis pipettierte Reaktionsansatz für den Nachweis von PVL- Genen setzte sich wie folgt zusammen:

2,5µl	10 x PCR Puffer
0,8µl	MgCl ₂ (50mM)
0,6µl	dNTPs (10mM jeweils)
1,25µl	2 x Reaktionsprimer (10pM jeder)
0,2µl	TaqDNA-Polymerase 5 U/µl
5µl	Template DNS
ad 25 µl	A. bidest.

Die PCR-Bedingungen waren eine initiale Denaturierung bei 94°C für 5min, gefolgt von 25 Zyklen, wobei t1 94°C für 1min, t2 54°C für 1min und t3 72°C für 30sec betragen. Abschließend fand die Endelongation bei 72°C für 7 min statt.

Spa-Typisierung

Das *Spa*-Gen, welches die genetische Information für das *S. aureus* Protein A enthält, zeichnet sich durch eine polymorphe Region X (Repeat-Region) aus, welche mit entsprechenden Primern zuverlässig amplifiziert werden kann. Die DNS-Sequenz der Amplifikate wird anschließend durch Sequenzanalyse ermittelt. Die Anzahl der Repeats schwankt zwischen 1 und 20 und diese weisen jeweils eine Länge von ca. 24 Basenpaaren auf. Durch visuellen oder automatischen Abgleich der Sequenzen mit einer Datenbank kann der *Spa*-Typ bestimmt werden. Die Benennung der *Spa*-Typen erfolgt auf alpha-numerischer Grundlage (72).

Die *Spa*-Typisierung von Pferde-Isolaten aus dieser Arbeit wurde in Kooperation mit und unter Leitung von Dr. A. W. Friedrich in Institut für Hygiene des UHK Münster vorgenommen.

PCR zur Amplifizierung der Allelfragmente für die MLST- Analyse

Die Multilocus-Sequenz-Typisierung ist ein Verfahren, welches auf der Sequenzanalyse genau definierter DNS-Abschnitte von sieben konservativen Haushaltsgenen (engl.: house-keeping) in *S. aureus* beruht. Die für die MLST- Analyse benötigten Amplifizierungen der sieben house-keeping Gene wurden mittels des folgenden Reaktionsansatzes hergestellt:

2,5µl	10 x PCR Puffer
1,5µl	MgCl ₂ (50mM)
1,0µl	dNTPs (10mM jeweils)
4 µl (2 µl F /2 µl R)	2 x Reaktionsprimer (10pM jeder)
0,4µl	TaqDNA-Polymerase 5 U/µl
1µl	Template DNS
ad 50 µl	A. bidest.

Die Bedingungen der PCR waren eine initiale Denaturierung bei 94 °C für 5min, gefolgt von 30 Zyklen, wobei t1 94°C für 1min, t2 56,3°C für 30 sec und t3 72°C für 1min. betragen hat. Abschließend erfolgte die Endelongation bei 72°C für 5min. Abweichend hierzu wurde die t2 für die Amplifizierung von *arcE* auf 55°C gesenkt.

Die resultierenden Amplifikate wurden von AGOWA (Gesellschaft für molekularbiologische Technologie mbH, Berlin) doppelsträngig sequenziert und mittels der EDV-Programme DNA-Star (Meg Align) sowie MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, USA) bearbeitet. Die resultierenden Sequenzen wurden mit den bestehenden Einträgen in der Online-Datenbank unter www.mlst.net verglichen.

Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE)

Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, mit welchem größere DNS-Fragmente (0,1kb – 20Mb) aufgetrennt werden können. Auf diese Weise können Bakterienstämme anhand eines mittels Restriktionsendonukleasen generierten Fragmentlängenmusters einfach bewertet und unterhalb der Speziesebene subtypisiert werden (112). Ein von der HARMONY-Gruppe (66) erarbeitetes europäisches Standardprotokoll zur Typisierung von MRSA durch PFGE sowie

ein kanadisches Standard-Protokoll (116) ist als Arbeitsgrundlage in das nachfolgende Protokoll eingeflossen.

Eine Einzelkolonie von *mecA*-positiven *S. aureus* wurde in 3ml MH-Bouillon suspendiert und 16-18h (37°C, Schüttelinkubator, leichte Bewegung) inkubiert. 150µl dieser Bakterienlösung (Dichte: McFarland Standard 3; ca. 9×10^8 cfu/ml) wurden in 1,5ml- Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) überführt und durch Zentrifugation bei 18.000 x g für 1min pelletiert. Mit 150µl Zellsuspensionspuffer wurde das Bakterienkonglomerat resuspendiert. 1% PFGE-Agarose (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad, München) wurde nach Herstellerangaben mit deionisiertem, destilliertem Wasser hergestellt und bei ca. 50°C flüssig gehalten. Die Reaktionsgefäße mit den Bakterienlösungen wurden bei ca. 45°C in einem Thermomixer vorgewärmt. Jeweils 2µl Lysostaphin (1mg/ml) wurden der Bakterienlösung zugegeben und mit 150µl flüssiger Agarose durch vorsichtiges Aufziehen gemischt. Die Bildung von Blasen galt es dabei unbedingt zu vermeiden. Mit dem zügigen Befüllen der Gießformen für Agaroseblöckchen (ca. 100µl / Mulde; 2x) nach entsprechender Kennzeichnung wurde dieser Arbeitsschritt abgeschlossen. Nach ca. 15min waren die Blöckchen erstarrt und konnten in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt werden.

Durch Zugabe von 500µl Lysispuffer mit anschließender Inkubation bei 37°C (leichtes Schwenken) für 1 Stunde wurde die Zellwand der Staphylokokken zerstört. Nach dem Abpipettieren des Lysispuffers wurde den Blöckchen je 500µl PK-PK Puffer zugesetzt (PK-Puffer mit 500µg Proteinase K/ml, frisch zugesetzt) und weitere 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Blöckchen 3 x 30min mit Waschpuffer behandelt.

Nach dem letzten Waschschrift wurde der verbleibende Puffer dekantiert und möglichst vollständig entfernt, ohne die empfindlichen Blöckchen zu beschädigen. 1/3 eines Blöckchens wurde auf einer glatten Unterlage, die zuvor mit Alkohol und dest. Wasser gereinigt worden ist, mit einem scharfen Skalpell in einem geraden Schnitt abgetrennt und in ein neues 0,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Die verbleibenden Reserveblöckchen konnten mit Waschpuffer bedeckt bei 4°C aufbewahrt werden.

Durch Zugabe von 300µl Restriktionspuffer wurden die Blöckchen auf Eis 30min equilibriert, der Puffer anschließend entfernt und 100µl frischer Puffer mit 20U *SmaI* zugefügt. Der enzymatische Verdau erfolgte bei 25°C unter leichtem Schütteln für 4h.

In der Zwischenzeit wurden 120ml 1% Agarosegel aus 1,2g PFGE- Agarose und 0,5 x TBE Puffer hergestellt und auf 50°C abgekühlt. Mit einer 12 x 14cm großen PFGE-Agarosegelform wurde ein Gel gegossen und ein Kamm mit 15 Probestaschen eingehängt. Nach Beendigung der Makrorestriktion wurden die Blöckchen mit einem Spatel in das Gel überführt und mit Gelresten versiegelt. Als Referenz dienten DSMZ 4910 und ein Lambda Hind3 Marker (New England Biolabs; Schwalbach / Taunus).

Die elektrophoretische Auftrennung der restringierten DNS-Fragmente wurde in einer Contour-clamped homogeneous electric field-Kammer (CHEF DR III; BioRad, München) in 0,5 x TBE unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Laufzeit I: 10 h; Temperatur: 14°C; Winkel: 120°; Spannung: 6 V; Pulszeit: 5 - 15 sec, II: 13h; Temperatur: 14°C; Winkel: 120°; Spannung: 6V; Pulszeit: 15 - 60sec. Die Auswertung erfolgte nach 20-minütiger Färbung in einer Ethidiumbromidlösung (0,5%) mit anschließender Wässerung in A. bidest. Die Auswertung wurde visuell und mittels Gel-Compar II Version 2,5 (Applied Maths) mit 1-1,6% Positionstoleranz und Dice-Einstellung für den Koeffizienz-Vergleich durchgeführt. Auswertungsgrundlage ist hierbei das auf dem 1958 von Sokal und Mitchner entwickelten UPGMA-Algorithmus (23) basierende Clusterverfahren. Dieser distanzbasierte Algorithmus setzt die Annahme voraus, dass sich die Evolution der DNS-Sequenzen gemäß der Vorstellung einer "molekularen Uhr" verlaufen ist.

Interpretation der PFGE- Bandenmuster

Die von Tenover et al. (112) aufgestellten Richtlinien für den genetischen Vergleich und die epidemiologische Einordnung von PFGE-Bandenmustern wurde hier als Auswertungsgrundlage verwendet. Die Analyse der Bandenmuster in epidemiologischer Hinsicht erfordert unbedingt, dass die für den Vergleich herangezogenen Isolate in räumlichem und zeitlichem Zusammenhang stehen (112).

Ein einzelner genetischer Vorfall resultiert in einer Bandenvariation von bis zu drei Bandenpositionen. In diesem Fall sprechen Tenover et al. von einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine Subpopulation, die mit dem ursprünglichen Stamm nahe verwandt sein könnte. Eine Bandendifferenz von mehr als drei Positionen wird als möglicherweise verwandt, jedoch nicht so eng interpretiert. Analog der von Tenover et al. beschriebenen Vorgehensweise, Typenstämmen mit einem Großbuchstaben, (A; B; C etc.) und mögliche Vertreter von Subpopulationen numerisch (-1; -2; -3 usw.) zu kennzeichnen, wurden die Stämme und Subtypen dieser Arbeit benannt. Von diesem Schema wurde nur abgewichen, wenn das Bandenmuster eines Isolates mit einem bekannten Bandenmuster von einem humanen Epidemiestamm übereinstimmte (hier: Barnimer Epidemiestamm).

Computergestützte Analyse der MLST-Daten durch Erstellung eines Minimum Spanning Tree

Die genetische Beziehung der in dieser Arbeit beschriebenen STen wurde mit Hilfe der Software BioNumerics (Version 4.5; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) durch Verwendung des Minimum Spanning Tree-Algorithmus unter Anwendung eines kategorischen Koeffizienten ermittelt. Für STen, die nicht mehr Abweichungen als in 1-2 von 7 Allelen aufweisen, wird in Anlehnung an die Vorgaben bei der BURST-Analyse (79) ein gemeinsamer Vorfahre angenommen. Solche STen können in genetisch eng verwandten klonalen Komplexen (CC) zusammengefasst werden.