
5 Diskussion

5.1 Diagnostik

5.1.1 Koagulase, anaerobe Mannitolvergärung und Acriflavinresistenz

Zur Abgrenzung kontagiöser *S. aureus* von anderen Staphylokokken wurden zahlreiche Methoden in verschiedenen Studien untersucht (Watts et al., 1991; Roberson et al., 1992; Ollis et al., 1995; Wallace et al., 1998; Capurro et al., 1999; Boerlin et al., 2003). Als eine Standard-Methode zur Identifikation von *S. aureus* aus bovinen Milchproben steht der Röhrchenkoagulasetest zur Verfügung (Blobel und Schliesser, 1994; Boerlin et al., 2003). Als alleiniger Test zur Identifikation von *S. aureus* ist er jedoch nicht geeignet, da die Möglichkeit falschpositiver Ergebnisse durch andere Koagulase positive Staphylokokken, wie *S. intermedius* und *S. hyicus subsp. hyicus*, besteht. Dies führte zu Spezifitäten von nur 33% (Roberson et al., 1996). Die Sensitivität dieses Tests lag in verschiedenen Untersuchungen jedoch sehr hoch, nur sehr wenig *S. aureus* Stämme weisen eine negative Koagulasereaktion auf (Watts et al., 1984; Fox et al., 1996; Roberson et al., 1996).

Ergänzt wurde der Koagulasetest in der vorliegenden Studie mit der anaeroben Mannitolvergärung und einem mit Acriflavin supplementierten Agar. Von den Koagulase positiven Staphylokokken kann unter anaeroben Bedingungen ausschließlich *S. aureus* Mannitol abbauen (Watts et al., 1984; Roberson et al., 1992). In einer Studie waren nur 1% der untersuchten *S. aureus* Isolate nicht dazu in der Lage (Roberson et al., 1992). Auch eine Resistenz gegenüber Acriflavin, die zum Wachstum auf acriflavinhaltigem Agar führt, ist ausschließlich bei *S. aureus* zu beobachten (Harmon et al., 1991; Roberson et al., 1992; Capurro et al., 1999).

Nach diesen Aussagen wurde *S. aureus* in der vorliegenden Untersuchung definiert als Staphylokokken mit positiver Koagulasereaktion, die in der Lage sind, unter anaeroben Bedingungen Mannitol abzubauen und auf acriflavinhaltigem Agar Wachstum zeigen. Alle drei Verfahren waren rasch und einfach durchzuführen und nicht kostenintensiv. In verschiedenen Studien hatte sich das Ablesen der Koagulasereaktion nach 24 Stunden gegenüber dem Ablesen nach 4 Stunden als deutlich günstiger erwiesen. Bis zu 50% der *S.*

aureus Isolate bewirkten in den Untersuchungen erst nach 24 Stunden eine Gerinnung von Kaninchenplasma (Hogan et al., 1986; Boerlin et al., 2003). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Hier zeigten 97% der Isolate, die nach 24 Stunden eine Koagulation bewirkten, bereits nach 4 Stunden ein positives Testergebnis. Bei nur 1,1% der gesamten untersuchten Isolate (6 Isolate) führte das Ablesen nach 24 Stunden zu einem anderen Ergebnis als nach 4 Stunden. Zwei dieser sechs Isolate ließen sich in weiteren Untersuchungen nicht eindeutig als *S. aureus* identifizieren; sie waren nicht in der Lage, Mannitol unter anaeroben Bedingungen abzubauen.

5.1.2 Beurteilung des Hämolyseverhaltens

Die Vorteile der Untersuchung des Auftretens und der Art der Hämolyse sind eine hohe Sensitivität der Methode und die einfache und schnelle Durchführung. Während das Auftreten einer beta-Hämolyse eine Spezifität von 98,0-100% hat, liegt die Sensitivität nur in Bereichen von 71,6-100% (Lam et al., 1995; Aarestrup et al., 1999; Boerlin et al., 2003). Die schlechte Sensitivität erklärte man dadurch, dass das beta-Hämolysin Gen nicht immer exprimiert und somit sichtbar wurde (Aarestrup et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass 96% der untersuchten *S. aureus* Isolate boviner Herkunft das beta-Hämolysin Gen tragen, dieses jedoch nur bei 76% der untersuchten *S. aureus* Isolate phänotypisch ausgeprägt war. Es zeigten nur 75% der Isolate, die das beta-Hämolysin Gen trugen, auch phänotypisch eine beta-Hämolyse. Gleichzeitig trugen alle untersuchten *S. aureus* Isolate boviner Herkunft das alpha-Hämolysin Gen, es war aber nur bei 37% phänotypisch ausgeprägt (Aarestrup et al., 1999). Zudem variierten in einer weiteren Studie Vorkommen und Art der Hämolyse in verschiedenen Regionen (Larsen et al., 2002).

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen nahe, dass das Auftreten und die Art einer Hämolyse nicht als eindeutiges Kriterium für *S. aureus* zu bewerten sind. Zwar ließen sich 99,3% der Isolate, die eine doppelzonige Hämolyse aufwiesen, *S. aureus* zuordnen, es zeigten aber nur 76,7% der als *S. aureus* definierten Isolate eine doppelzonige Hämolyse.

Von den untersuchten *S. aureus* Isolaten zeigten 98,4% eine doppelzonige oder vollständige Hämolyse. Dies war bei 22,2% der als KNS identifizierten Isolate ebenfalls der Fall. Im Hin-

blick auf die Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Hämolyseformen ergab sich folgendes: Die Sensitivität der doppelzonigen Hämolyse war mit 76,7% niedrig, die Spezifität hingegen hoch (98,7%). Die Sensitivität der beta-Hämolyse (vollständige Hämolyse, entweder allein oder mit zusätzlicher alpha-Hämolyse als doppelzonige Hämolyse) lag zwar bei 98,4%, die Spezifität aber nur bei 77,8%. Als Konsequenz daraus kann gefolgert werden, dass es sich bei Isolaten, die eine doppelzonige Hämolyse aufweisen, sehr wahrscheinlich um *S. aureus* handelt. Bei Isolaten, die keine oder eine vergrünende Hämolyse bewirken, handelt es sich wahrscheinlich nicht um *S. aureus*. Bei Isolaten, die eine vollständige Hämolyse (ohne doppelzonige Hämolyse) bewirken, ist die Durchführung des Koagulasetests zur sicheren Identifizierung von *S. aureus* zwingend erforderlich. Als sicheres Kriterium können Auftreten und Art einer Hämolyse allein nicht dienen.

5.1.3 Beurteilung der Schnell-Agglutinationstests

Verschiedene Schnell-Agglutinationstests zur Identifizierung von *S. aureus* wurden entwickelt und bewertet. Untersuchungen ergaben für die Diagnostik bei Mastitiden eine hohe Spezifität, jedoch eine niedrige Sensitivität für den im Handel erhältlichen Slidex Staph Plus® (SSP) (Boerlin et al., 2003).

Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Die Sensitivität der beiden kommerziell erhältlichen Schnell-Agglutinationstests lag mit 92,2% bzw. 96,4% eher hoch. Dagegen war die Spezifität der Tests mit 81,6% bzw. 69,7% niedrig.

Als großes Problem erwies sich, wie in der Untersuchung von Boerlin und Mitarbeitern (2003), die große Anzahl nicht interpretierbarer Ergebnisse. Dieser Fall trat ein, wenn sowohl Test- als auch Kontrollsubstanz durch das geprüfte Isolat agglutinierten.

Mittels Staphylase-Test® (CF) lieferten 6,7%, mittels SSP 7,1% der untersuchten Staphylokokken nicht auswertbare Ergebnisse. Auffällig ist hierbei, dass der SSP deutlich häufiger keine Aussage treffen konnte, wenn es sich um KNS handelte, als bei *S. aureus*. So konnten die Ergebnisse bei 23,3% der KNS, aber nur bei 1,0% der *S. aureus* Isolate nicht interpretiert

werden. Im Gegensatz dazu konnte mittels CF bei nur 5,7 % der KNS und bei 9,7% der *S. aureus* keine Aussage getroffen werden.

5.2 Typisierung

5.2.1 Vorkommen unterschiedlicher *Staphylococcus aureus* Stämme

In der Literatur wird *S. aureus* im allgemeinen den kontagiösen Mastitiserregern zugeordnet (Schukken et al., 1989b; Hallberg et al., 1994; Barkema et al., 1998; Roberson et al., 1998). Dies bedeutet, dass als primäres Reservoir die infizierte bovine Milchdrüse angesehen wird und das Risiko einer Übertragung von Viertel zu Viertel und von Tier zu Tier vor allem während der Melkzeit besteht (Bramley, 1985; Roberson et al., 1994b; Smith und Hogan, 1995; Hoedemaker, 2001).

Die Wege der Ausbreitung und die Reservoirs eines kontagiösen Erregers können mittels geno- und phänotypischer Verfahren verfolgt werden. Hierzu wurden viele verschiedene Typisierungsverfahren angewandt, und es konnte immer ein bestimmter Stamm eines kontagiösen Erregers ermittelt werden, der für den größten Teil der intramammären Infektionen innerhalb einer Herde oder eines Betriebs verantwortlich war (Thörne und Wallmark, 1960; Lipman et al., 1996; Bassegio et al., 1997; Raimundo et al., 1999; Wang et al., 1999; Merl et al., 2003).

Diese Aussage konnte in dieser Untersuchung bestätigt werden. In den sechs Betrieben konnte mittels RAPD-PCR jeweils ein dominierender *S. aureus* Stamm zum Zeitpunkt der Untersuchung ermittelt werden. Dieser Stamm machte zwischen 54,5 und 95,5% der untersuchten *S. aureus* Isolate aus. In Betrieb 2, in dem der Anteil des dominierenden Stamms bei nur 54,5% lag, waren weitere 27,3% der untersuchten Isolate nur mittels eines Primers durch eine Bande von dem dominierenden Stamm zu unterscheiden. Dieser Stamm scheint mit dem dominierenden zumindest eng verwandt zu sein. In einer Studie, die die Auswertung mittels Pulsfeldgelelektrophorese erstellter Bandenmuster beschreibt, wurden Isolate, deren Bandenmuster sich in 2-3 Banden unterschieden, als eng miteinander verwandt eingestuft. Erst

Stämme, deren Muster sich in 7 oder mehr Banden unterschieden, wurden als deutlich verschiedene, nicht verwandte Stämme angesehen (Tenover et al., 1995).

Roberson und Mitarbeiter (1994a) definierten eine niedrige *S. aureus* Herdenprävalenz mit Werten bis 5%, eine hohe mit Werten über 10%.

Die sechs Betriebe der vorliegenden Untersuchung hatten mit Werten zwischen 22,7 und 32,8% eine sehr hohe Viertelprävalenz von *S. aureus*.

In einer Untersuchung war ein deutlicher Unterschied zwischen Betrieben mit niedriger und hoher *S. aureus* Herdenprävalenz festgestellt worden. Hier konnte in Betrieben mit hoher *S. aureus* Prävalenz jeweils ein dominierender *S. aureus* Stamm identifiziert werden, während in den Betrieben mit niedriger *S. aureus* Prävalenz stets eine große Variabilität der *S. aureus* Stämme bestand (Sommerhäuser et al., 2003). Diese Aussage konnte in der vorliegenden Untersuchung insofern bestätigt werden, dass auch hier in Betrieben mit hoher *S. aureus* Prävalenz jeweils ein dominierender Stamm gefunden werden konnte.

5.2.2 Verbreitungstendenz unterschiedlicher *Staphylococcus aureus* Stämme

Insgesamt konnten in den unterschiedlichen Betrieben mittels RAPD-PCR jeweils 2 bis 6 verschiedene *S. aureus* Genotypen ermittelt werden. Dieses Ergebnis stimmt ebenfalls mit Ergebnissen anderer Untersuchungen überein, in denen je Herde oder untersuchtem Betrieb nur eine geringe Anzahl verschiedener *S. aureus* Stämme gefunden werden konnte (Baumgartner et al., 1984; Mackie et al., 1987; Matthews et al., 1992, Matthews et al., 1994; Lam et al., 1996; Myllys et al., 1997; Rivas et al., 1997; Annemüller et al., 1999).

Obwohl das Verhalten von *S. aureus* in der Literatur generell als kontagiös bezeichnet wird (Klastrup, 1963; Bramley und Dodd, 1984; Fox und Gay, 1993), zeigten verschiedene Untersuchungen, dass es unterschiedliche Stämme von *S. aureus* gibt, die sich in ihrer Verbreitungstendenz, ihrer Virulenz und Pathogenität voneinander unterscheiden (Smith et al., 1998; Larsen et al., 2000; Sommerhäuser et al., 2003; Reppel et al., 2005).

Hierauf geben auch die Ergebnisse dieser Studie Hinweise. In den einzelnen Betrieben findet sich zwar immer ein Stamm, der zahlenmäßig weit verbreitet ist, es gibt jedoch auch immer

(außer in Betrieb 3) weitere *S. aureus* Stämme, die in deutlich geringerer Anzahl isoliert werden konnten. Diese Stämme sind scheinbar nicht in der Lage, sich auf gleiche Weise zu verbreiten wie der jeweils dominierende Stamm des Betriebes. Der dominierende Stamm kann in seinem epidemiologischen Verhalten als kontagiös eingestuft werden, wohingegen das Verhalten der Stämme, die in kleiner Zahl vorkommen, eher dem umweltassoziierten Erreger entspricht.

Ein Kontrollprogramm, welches Hygienemaßnahmen zur Verminderung der Neuinfektionsrate kontagiöser Erreger beinhaltet, konnte in einer Untersuchung die Verbreitung von *S. aureus* nur in bestimmten Betrieben verhindern. Durch Typisierungsergebnisse konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* Stämme, die sich wie kontagiöse Erreger verhielten, durch das Programm kontrollieren ließen. Auf *S. aureus* Stämme, deren Verhalten demjenigen umweltassoziierten Erreger entsprach, hatte das Kontrollprogramm keine Auswirkungen (Sommerhäuser et al., 2003).

Bei Betrachtung der Hygienemaßnahmen in den Betrieben der vorliegenden Studie fällt auf, dass nicht alle zur Minimierung von *S. aureus* nötigen Vorkehrungen sorgfältig durchgeführt wurden (s. Material und Methoden). Das Zitzendippen nach dem Melken wurde in zwei Betrieben, eine Zwischendesinfektion des Melkzeugs zwischen einzelnen Tieren wurde in einem Betrieb nicht regelmäßig durchgeführt. In zwei Betrieben war eine Zwischendesinfektion nur nach klinisch auffälligen Tieren vorgesehen. Eine räumliche Trennung kranker und gesunder Tiere fand nur in drei Betrieben regelmäßig statt, das generelle Trockenstellen aller Tiere unter Antibiotikumschutz ebenfalls.

In den untersuchten Betrieben sind also nicht alle Maßnahmen zur Verhinderung der Verbreitung von *S. aureus* getroffen worden. Die sorgfältige Einhaltung von Hygienemaßnahmen beim Melken, die Trennung kranker Tiere und das Trockenstellen mit einem geeigneten Antibiotikum könnten in den untersuchten Betrieben ein guter Ansatz zur Kontrolle von intramammären Infektionen mit *S. aureus* sein.

5.2.3 Vergleich der von Erstkalbinnen und multiparen Tieren isolierten *Staphylococcus aureus* Stämme

In einer Untersuchung konnte festgestellt werden, dass sich in einem Betrieb die *S. aureus* Isolate, die bei Erstkalbinnen und Färsen gefunden wurden, von denen unterschieden, die aus Milchproben multiparer Tiere gewonnen werden konnten (Gillespie et al., 1999). Im Gegensatz dazu konnten in einer weiteren Studie keine Unterschiede zwischen den *S. aureus* Isolat von Kühen und Erstkalbinnen zum Abkalbezeitpunkt festgestellt werden (Reppel et al., 2005).

Das entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung. Hier wurden aus Milchproben von Erstkalbinnen und multiparen Tieren *S. aureus* Stämme mit identischen mittels RAPD-PCR erstellten Bandenmustern isoliert.

Der in dem jeweiligen Betrieb dominierende Stamm konnte bei Tieren mit unterschiedlichen Laktationsnummern und in unterschiedlichen Laktationsstadien gefunden werden.

Die in geringer Zahl vorkommenden Stämme wurden vermehrt aus Milchproben von multiparen Tieren gewonnen. Von 17 Isolaten, die nur ein oder zweimal gefunden werden konnten, wurden 14 (82,4%) aus Milchproben multiparer Tiere und nur 3 (17,6%) aus Milchproben von Erstkalbinnen gewonnen. Zu den Stämmen, die nur ein oder zweimal gefunden wurden, zählten 20,6% (7 von 34) bzw. 17,1% (7 von 41) aller *S. aureus* Isolate, die in den Tiergruppen 3 bzw. 4 gefunden wurden, und 5,6% (1 von 18) bzw. 5,4% (2 von 37) der in den Tiergruppen 1 bzw. 2 gefundenen Isolate.

Es kann also von einer größeren Variabilität der Stämme bei multiparen Tieren gesprochen werden. Gegensätzliches berichteten Gillespie und Mitarbeiter (1999), die bei den *S. aureus* Isolaten, die bei Färsen gefunden wurden, eine größere Variabilität feststellten als bei denen älterer Tiere.

5.2.4 Infektionen mit *Staphylococcus aureus* bei Färsen

Da bei kontagiösen Erregern das Risiko einer Übertragung von Tier zu Tier und von Viertel zu Viertel vor allem während des Melkens besteht, stellt sich die Frage, wie sich Färsen bis

zum Zeitpunkt der Abkalbung mit *S. aureus* infizieren (Bramley, 1985; Smith und Hogan, 1995; Hoedemaker, 2001). Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass zwischen 7,6 und 15,4% der Viertel von Färsen zum Zeitpunkt der Abkalbung mit *S. aureus* infiziert waren. Man kann davon ausgehen, dass bei etwa 4 % der Färsen zum Zeitpunkt der Abkalbung eine intramammäre Infektion mit *S. aureus* nachzuweisen ist. Hierbei kann der Erreger nicht beim Melkprozess übertragen worden sein (Pankey et al., 1991; Matthews et al., 1992a; Roberson et al., 1994a; Hoedemaker, 1995; Hoedemaker, 2001; Owens et al., 2001). Als Reservoir für intramammäre Infektionen mit *S. aureus* bei Erstkalbinnen kamen die Besiedlung der Zitzen und anderer Körperstellen in Betracht. Auch von Fliegen konnten identische *S. aureus* Stämme isoliert werden wie aus Proben von Färsen (Hoedemaker, 1995; Roberson et al., 1998; Gillespie et al., 1999; Hoedemaker, 2001).

Insgesamt muss bei der Bewertung der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bedacht werden, dass die Milchproben der Erstkalbinnen nicht zum Abkalbezeitpunkt (Reppel et al., 2005) oder sogar davor (Gillespie et al., 1999) genommen wurden, sondern von Tieren bis zum 50. oder ab dem 250. Tag der Laktation. Bis zu diesem Zeitpunkt war das Risiko intramammärer Infektionen mit *S. aureus* auf den untersuchten Betrieben hoch, da der Erreger in den Herden weit verbreitet war und Maßnahmen zur Kontrolle kontagiöser Erreger auf keinem der Betriebe sorgfältig eingehalten wurden.

5.2.5 Methode Agardiffusionstest und RAPD-PCR

In verschiedenen Studien zur Untersuchung der Epidemiologie von *S. aureus* wurden diverse Typisierungsverfahren genutzt (Gillespie et al., 1999; Lange et al., 1999; Raimundo et al., 1999; Joo et al., 2001; Zadoks et al., 2002; Sommerhäuser et al., 2003; Sabour et al., 2004; Smith et al., 2005). Hierbei fanden Verfahren sowohl der Phänotypisierung als auch der Genotypisierung Anwendung. Folgende Anforderungen an epidemiologische Verfahren sollten erfüllt werden: Zum einen sind dies die Typisierbarkeit der zu untersuchenden Erreger, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Differenzierungskraft der Methode. Zum anderen

sollten die Interpretierbarkeit der Ergebnisse, die Praktikabilität, die Kosteneffektivität und die mögliche Automatisierung der Verfahren gegeben sein (Wichelhaus et al., 2000).

Die Erstellung von Resistenzprofilen (Antibiogrammtypisierung) ist zur Unterscheidung von Bakterien nur bedingt geeignet. Die Typisierbarkeit ist zwar bei jedem Bakterium gegeben, die Reproduzierbarkeit ist gut bis sehr gut und die Durchführung und Interpretation aufgrund standardisierter Protokolle einfach. Die Differenzierungskraft ist jedoch stark schwankend und abhängig von den zu untersuchenden Bakterien und Wirkstoffen (Wichelhaus et al., 2000). Ursachen hierfür liegen in der Mobilität vieler Resistenzgene, die mobile genetische Elemente enthalten können. Abhängig vom Erwerb oder Verlust solcher Elemente ändert sich dann das Resistenzprofil. Der Diskriminatorische Index von Resistenzprofilen für *S. aureus* konnte in einer Studie mit 0,72 beziffert werden (Lange et al., 1999). Andere Untersuchungen bezifferten den Diskriminatorischen Index der Antibiogrammtypisierung von *S. aureus* mit Werten von 0,327 und 0,312 und bezeichneten den Aussagewert dieser Methode als begrenzt (Matthews et al., 1992; Aarestrup et al., 1995; Sommerhäuser, 2001).

In der vorliegenden Studie ließen sich diese Aussagen bestätigen. In drei der sechs Betriebe hatten alle *S. aureus* Isolate ein identisches Resistenzprofil. In zwei weiteren Betrieben ließen sich die Isolate zwei bzw. drei Resistenzprofilen zuordnen. Nur ein Betrieb wies fünf unterschiedliche Resistenzprofile auf. Diese Resistenzprofile stimmten jedoch nicht mit der Typisierung anhand der RAPD-PCR überein.

Die RAPD-PCR ist in der Lage, alle Bakterien zu typisieren. Die Methode ist schnell und einfach durchzuführen. Die Unterscheidungskraft ist abhängig von den zu untersuchenden Erregern und dem verwendeten Primer (Wichelhaus et al., 2000). In einer Untersuchung wurde der Diskriminatorische Index (D) der RAPD-PCR für *S. aureus* unter Verwendung eines Primers mit 0,898 beziffert (Fitzgerald et al., 1997). Dies bedeutet, dass diese Methode mit einer Wahrscheinlichkeit von 89,8% zwei zufällig aus der Testpopulation entnommene Isolate zwei unterschiedlichen Typen zuordnen kann. Gillespie und Mitarbeiter (1999) schlossen aus den Ergebnissen ihrer Untersuchung, dass die RAPD-PCR zur Unterscheidung verschiedener Subtypen von *S. aureus* durchaus zweckmäßig ist. Auch in anderen Untersuchungen hat sich die RAPD-PCR zur Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks von *S. aureus* als erfolgreich erwiesen. Sie war schnell und hatte eine gute Unterscheidungskraft (van Belkum et al., 1994; Matthews et al., 1994; van Belkum, 1995).

Andere genotypische Methoden, wie die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und das Multilocus Sequence Typing (MLST) haben sich ebenfalls in epidemiologischen Studien als sehr geeignet zur Unterscheidung verschiedener *S. aureus* Stämme erwiesen (Zadoks et al., 2002; Sabour et al., 2004; Smith et al., 2005). Diese Methoden zeichnen sich durch ein gegenüber der RAPD-PCR höheres Diskriminierungspotential aus, sind jedoch aufwendiger in der Durchführung und deutlich kostenintensiver als die RAPD-PCR (Wichelhaus et al., 2000; Smith et al., 2005). Für die Interpretation der vorliegenden Untersuchungsergebnisse ist daher zu beachten, dass die Ergebnisse der mittels RAPD-PCR erstellten Bandenmuster gegebenenfalls durch andere Methoden mit höherer Unterscheidungskraft weiter differenziert werden könnten. Aufgrund niedrigerer Zeit- und Kostenintensität wurde jedoch die Einteilung der *Staphylococcus aureus* Isolate in identische bzw. unterschiedliche Stämme allein auf Grundlage der mittels RAPD-PCR erstellten Bandenmuster vorgenommen.

Der größte Nachteil der RAPD-PCR liegt in der ausgesprochen schlechten Reproduzierbarkeit, die von vielen Variablen beeinflusst wird (Tyler et al., 1997). So konnte bei der Untersuchung eines identischen Stammes von *Salmonella* in einem Labor – unter Verwendung der gleichen DNA-Präparation sowie der gleichen für die PCR benötigten Materialien, jedoch in unterschiedlichen Thermocyclern – eine beträchtliche Variabilität der Bandenmuster gezeigt werden (Weide-Botjes et al., 1998).

In der hier vorliegenden Untersuchung wurde dieser Nachteil dadurch aufgehoben, dass ausschließlich in denselben Arbeitsschritten bearbeitete DNA miteinander verglichen wurde. Die PCR-Reaktion der zu vergleichenden *S. aureus* Isolate wurde im selben Thermocycler zur selben Zeit mit identischen Materialien durchgeführt. Die mittels RAPD-PCR erhaltenen Amplifikate wurden mittels Elektrophorese auf demselben Gel dargestellt. Die Bedingungen, unter denen die zu vergleichenden Isolate bearbeitet, vervielfältigt und sichtbar gemacht wurden, waren dementsprechend kaum Schwankungen unterworfen. Dadurch war es jedoch ausschließlich möglich, jeweils die 22 bzw. 20 Isolate eines Betriebs untereinander zu vergleichen, nicht aber mit den Isolaten der anderen Betriebe.

Als weiterer Nachteil ist das Auftreten starker und schwacher Banden und die daraus folgend individuellen Schwankungen unterlegene Interpretation zu werten. Eine Untersuchung wies darauf hin, dass durch eine visuelle Auswertung die unterschiedlichen Stärken der Banden besser erkannt werden können als bei computergestützter Auswertung. Diese war zwar objektiver und brachte eine größere Anzahl verschiedener Genotypen, unterschied aber auch durch

kleine Helligkeitsunterschiede Isolate, die als identisch betrachtet werden konnten (Saijonna-Koulumies et al., 2003).

5.2.6 Auswahl und Anzahl der Primer

Eine Verbesserung der Unterscheidungskraft wurde in der vorliegenden Studie dadurch erreicht, dass zwei verschiedene Primer genutzt wurden. In Betrieb 6 konnten anhand beider Primer die Isolate übereinstimmend in vier verschiedene Genotypen unterschieden werden. In den Betrieben 1, 2, 3 und 4 lieferte jeweils einer der Primer eine größere Anzahl verschiedener Bandenmuster, so dass eine weitere Unterscheidung der Isolate stattfinden konnte, die bei der Nutzung nur eines Primers übersehen worden wäre. Hierbei konnte Primer II in den Betrieben 1 und 4 und der Primer V in den Betrieben 2 und 3 eine größere Anzahl verschiedener Genotypen unterscheiden. In Betrieb 5 konnten 5 verschiedene Genotypen unterschieden werden, wobei Primer II drei Genotypen unterschied und Primer V vier.

Insgesamt konnten in den sechs Betrieben durch Nutzung der beiden Primer 25 Stämme unterschieden werden. Bei alleiniger Verwendung nur eines Primers konnten nur 20 (Primer II), bzw. 19 (Primer V) Stämme unterschieden werden.