

Trübungsmeßgeräte zur Typendifferenzierung und Empfindlichkeitsprüfung von Krankheitserregern: Erfahrungen und Vergleichsuntersuchungen

Ursula Kroening, J. Steffen

Krankenhaus Berlin-Spandau, örtl. Bereich Havelhöhe, Zentrallaboratorium (Chefarzt Dr. Steffen)

Zusammenfassung:

Die Firma Flow-Laboratories bietet eine Gerätekombination an, mit der Sensibilitätsprüfungen von Krankheitserregern und ihre Typisierung auf der Basis der fotometrischen Trübungsmessung bzw. Farbstoffentwicklung durchgeführt werden können. In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Vergleichsuntersuchung dieser Methoden mit den bisher üblichen konventionellen Methoden.

Es wurden insgesamt 155 Stämme aus der Gruppe der Enterobacteriaceae – isoliert aus dem in der Klinik anfallenden Einsendegut – mit beiden Methoden untersucht und die Ergebnisse verglichen.

Gefunden wurde eine gute Übereinstimmung von ca. 95%, wesentlich schnellere Befunderhebung mit der fotometrischen Methode und einfachere Handhabung im Vergleich zu anderen Gerätekombinationen wie z. B. Autobac und M 2000.

Schlüsselwörter:

Teilmechanisierte Typisierung und Sensibilitätsprüfung – Enterobacteriaceae – Trübungsmeßgeräte

Summary:

Flow Laboratories offers a combination of instruments which allow antimicrobial susceptibility tests and bacterial identification based on photometric measurement of turbidity or the development of pigments. This paper gives a comparison of these methods with conventional methods available to date.

Both methods were applied in a study of a total of 155 strains of the group of enterobacteriaceae – isolated from the shipments received by the clinic – and the results were compared.

The results showed identical findings in 95% of the cases, a much more rapid analysis using the photometric method and a more simple application compared to other combinations of instruments, such as, for instance, Autobac and M 2000.

Keywords:

Mechanized identification and susceptibility tests – Enterobacteriaceae – Turbidity measurements

Einleitung

Die Firma Flow Laboratories bietet eine Gerätekombination zur schnellen, teilmechanisierten Typisierung und Empfindlichkeitsprüfung von Krankheitserregern an.

In der vorliegenden Arbeit werden Erfahrungen und Vergleichsergebnisse mit herkömmlichen Methoden vorgelegt.

Material

155 Stämme aus der Gruppe der Enterobacteriaceae; es waren frische Isolate aus unserer Klinik.

Methoden

a) Typisierung

1. Titertek Enterobak, (Flow) 24 Std. Inkubation und visueller Ablesung und
2. Titertek Enterobac/RAS, (TTE/RAS) 5 Std. Inkubation, fotometrische Ablesung, Auswertung der Absorption mit Rechner und Ausdruck.

b) Empfindlichkeitsprüfung

1. Agardiffusionstest, 24 Std. Inkubation und visuelle Ablesung der Hemmhöhe mit laufenden Kontrollen gegen Testkeime.
2. Fotometrische Trübungsmessung, 5 Std. Inkubation, Auswertung durch Wachstumsvergleich Stamm ohne Medikament / Stamm mit Medikament.

Zu a) 1.: Die Typisierungsmethode „Titertek – Enterobak“ ist seit längerer Zeit auf dem Markt und dürfte den einschlägigen Laboratorien bekannt sein. Sie gleicht dem System „Api“ der Firma bio Mérieux.

Zu b) 1.: Der Agardiffusionstest ist noch immer die Standardmethode und braucht als solche nicht mehr beschrieben zu werden.

Zu a) 2. und b) 2.: Die Gerätekombination der Fa. Flow besteht aus:

- 1 Fotometer Multiscan MC 340 mit
- 8 Filtereinsätzen
- 1 IBM-Tischrechner Economic mit Monitor
- 1 IBM-Grafik-Drucker II

1 Inkubationshaube
mehrere Tischschüttler Titertek
Cat.-Nr. 77-470-00.

Es werden Mikrotiterplatten angeboten, die 1.) mit den chemischen Reagenzien zur Typisierung und 2.) mit je 12 Antibiotika in 2 oder mehr Konzentrationen nach DIN-Norm-Empfehlung zur Sensibilitätsbestimmung beschichtet sind. Es handelt sich um Lyophilysate; Aufbewahrung 4–8°C.

Es gibt 2 Versionen des Testprogramms:

- Ablesung nach 5 Std. Inkubation
- Ablesung nach 18–24 Std. Inkubation.

Wir haben uns für die Ablesung nach 5 Std. entschieden, was organisatorisch unter Nutzung der verschobenen Tagesarbeitszeit problemlos durchführbar ist.

Vorarbeiten

Herstellung der Suspension und Einfüllen in die Mikrotiterplatten ist einfach und schnell durchführbar. Die mitunter wachstumsverzögernde lag-Phase der Bakterienstämme kann dadurch verkürzt werden, daß die unimpften Bouillonröhrchen (entgegen der Vorschrift) über Nacht bei 37°C vorgewärmt werden (1). Dies hat noch den Vorteil, daß verunreinigte Röhrchen ausgeschieden werden können.

Wir haben die Enterobacteriaceae direkt von der Endoplate abgeimpft, so daß sich die Einführung eines anderen Selektivnährbodens erübrigte. Bei etwa 20 Stämmen wurden Parallelbestimmungen von Endo- und Brillantgrün-Nährböden durchgeführt, ohne daß Schwierigkeiten bei der Typisierung entstanden wären.

Tab. 1: Keimdifferenzierung mit TTE/RAS und Titertek Flow aufgegliedert nach Gruppen der Enterobacteriaceae

Keimart	n =	Übereinstimmung teilweise mit Zusatzreaktionen wie Serologie, Motilität etc.	Abweichung		
			Ergebnis Titertek	Ergebnis TTE RAS	Abweichende Einzelreaktionen
Klebsiella-Gruppe	21	21			
Enterobacter-Gruppe	15	15			
Proteus-Gruppe	28	26	2 a) Prot. mirab. b) Prot. mirab.	Prot. vulg. 90,7% Prot. mirab. 9% Serr. liquef. 97,6% Sal. arizona 1,8%	– LDC Citrat
E. coli	61	59	2 a) Klyvera spez. b) E. coli	E. coli 100% Klebs. ozenae 98% E. coli 2%	Citrat Indol
Sonstige	7	6	1 Klebs. pneum.	Serr. liquef. 97,6% Klebs. pneum. 1,2%	H ₂ S Citr. Mal
E. coli	23	23	Vergleich mit Enterotube		
Gesamtzahl	155	150 = 96,7%	5 = 3,3%		

Tab. 2: Ergebnisse der Sensibilitätsprüfung mit TTE/RAS (Flow) und Agardiffusionstest mit (ADT) 11 Antibiotika und aufgegliedert

Stamm	Ergebnis	Ampicillin		Mezlocillin		Piperacillin		Cefotaxin		Lamoxactam		Cephazolin		Cotrimoxazol	
		RAS	ADT	RAS	ADT	RAS	ADT	RAS	ADT	RAS	ADT	RAS	ADT	RAS	ADT
E. coli		n = 60		n = 39		n = 60		n = 60		n = 30		n = 52		n = 37	
	S	47	47	32	32	47	47	57	60	30	30	51	45	23	22
	MS	–	–	3	2	9	6	3	–	–	–	1	3	–	1
	R	13	13	4	5	4	7	–	–	–	–	–	4	4	4
Proteus-Gruppe		n = 29		n = 20		n = 19		n = 28		n = 12		n = 24		n = 13	
	S	14	18	19	19	18	18	24	27	12	12	11	9	12	9
	MS	3	–	–	–	–	–	2	–	–	–	4	4	–	1
	R	12	11	1	1	1	1	2	1	–	–	9	11	1	3
Enterobacter-Gruppe		n = 25		n = 13		n = 23		n = 25		n = 11		n = 24		n = 12	
	S	5	6	9	8	15	12	19	21	9	9	8	9	12	10
	MS	7	2	1	2	6	3	4	2	1	1	2	2	–	1
	R	13	17	3	3	2	8	2	2	1	1	14	13	–	1
Klebsiella-Gruppe		n = 21		n = 7		n = 21		n = 21		n = 7		n = 21		n = 14	
	S	2	2	6	5	17	18	18	17	7	7	14	14	14	11
	MS	6	2	–	1	2	–	1	–	–	–	4	2	–	3
	R	13	17	1	1	2	3	2	4	–	–	3	5	–	–

(S = sensibel; MS = mäßig sensibel; R = resistent).

Die anfänglichen Schwierigkeiten mit Teilen des Testprogramms konnten in Zusammenarbeit mit der Firma Flow überwunden werden. Die deutsche Fassung der Programmbeschreibung ließ einige Zeit auf sich warten und ist leider auch nicht sehr übersichtlich. Die anglo-amerikanischen Beschreibungen haben eher den Charakter eines Romans, so daß wir eine Führung durch das Programm für unsere individuellen Zwecke selbst hergestellt haben.

Ergebnisse

Typisierung

Die Ergebnisse sind aus der Tab. 1 ersichtlich.

Bei den 5 Stämmen (3,3%) mit nicht übereinstimmenden Ergebnissen kann nicht geklärt werden, welche Methode versagt hat.

23 Stämme E. coli wurden mit Enterotube-Roche verglichen und stimmten ausnahmslos überein.

Die Reproduzierbarkeit wurde 15mal mit dem E. coli-ATCC-Laborstamm und 10mal mit wahllos herausgegriffenen Stämmen überprüft.

Es ergibt sich eine Übereinstimmung der Typisierung der Enterobacteriaceen-Stämme von 96,7%.

Empfindlichkeitsprüfung

Die Ergebnisse wurden in Tab. 2 zusammengestellt.

Es stehen verschiedene Antibiotika-Kombinationen zur Verfügung. Die Firma Flow ist auch bereit, individuelle Wünsche zu berücksichtigen.

Wie haben teilweise die Zusammenstellung „TTS SIR/U“ für Enterobacteriaceae aus dem Urin und zum anderen „TTS SIR/N“ für Enterobacteriaceae aus anderem Material benutzt. Daraus resultierten die unterschiedlichen Fallzahlen. Größere Abweichungen fanden wir nur bei

den Medikamenten Amikacin, Cephazolin und Doxycyclin.

Mit Amikacin wurden bereits von Krasemann umfangreiche Vergleichsuntersuchungen durchgeführt zwischen Agar-Diffusions-Test (ADT) und Bouillonverdünnungstest, von dem die Trübungsmessung hergeleitet ist. Es wurde festgestellt, daß bei diesem Medikament der Korrelationskoeffizient der Hemmhöfe mit der minimalen Hemmkonzentration so gering ist, daß der ADT keine verlässliche Aussage ergibt.

Außerdem fällt auf, daß bei Klebsiellen volle Übereinstimmung beider Methoden erzielt wurde, während bei E. coli die längere Einwirkungszeit beim ADT höhere Resistenzraten bewirkte.

Es ist anzunehmen, daß der enzymatische Abbau des Medikaments durch bestimmte Keime eine Rolle spielt.

Ähnlich, aber nicht ganz so ausgeprägt, verhält es sich bei Doxycyclin und Cephazolin.

Diskussion

Die Gerätekombination der Fa. Flow mit vorbeschichteten lyophilisierten Mikrotiterplatten und objektiver fotometrischer Trübungsmessung ist praktisch gut zu handhaben und erlaubt daher Identifizierung und Empfindlichkeitsprüfung von Krankheitskeimen innerhalb von 5 Std. nach Anzüchtung.

Dadurch erhält die Klinik die Ergebnisse 24 Std. früher, so daß Blindtherapie mit unwirksamen Antibiotika mindestens verkürzt oder ganz vermieden wird.

Die Methode der Trübungsmessung ist nicht neu, sondern wurde bereits seit längerer Zeit untersucht und für gut befunden (1). Neu ist nur die Einführung technischer Hilfsmittel, um sie als Routinemethode einsetzen zu können (2-6).

Der bisher übliche Agardiffusionstest ist in zahlreichen Untersuchungen als bestenfalls halbquantitativer Test bezeichnet worden (7, 9).

Dennoch konnten wir bei unseren Vergleichsuntersuchungen feststellen, daß nur bei wenigen Medikamenten schlechte Übereinstimmung zu erzielen war, die außerdem noch von der Keimart und deren schneller oder langsamer Enzymproduktion abhängig ist (8, 10, 11).

Der Vergleich beider Methoden sollte also nicht dazu führen, daß man einen weitgehend quantitativen Test mit objektiver Ablesung ablehnt, weil er mit einem halbquantitativen Test nicht völlig übereinstimmt (12).

Außerdem darf auf keinen Fall außer acht gelassen werden, daß die Einwirkungszeit von 5 Std. weit eher den pharmakokinetischen Gegebenheiten in vivo entspricht als die von 24 Std.

Nach Stille ist die Wirkung in den ersten 3-5 Std. nach Gabe des Antibiotikums ausschlaggebend für den Erfolg der Behandlung (13).

nach Gruppen der Enterobacteriaceae

Pipemid-säure		Gentamicin		Amicacin		Doxycyclin	
RAS	ADT	RAS	ADT	RAS	ADT	RAS	ADT
n = 26		n = 61		n = 54		n = 62	
25	23	61	61	54	36	49	39
-	1	-	-	-	13	6	7
1	2	-	-	-	5	7	16
n = 10		n = 28		n = 25		n = 27	
10	9	28	28	22	18	8	3
-	-	-	-	3	4	6	4
-	1	-	-	-	3	13	20
n = 12		n = 25		n = 24		n = 25	
11	12	23	23	23	19	21	12
-	-	2	1	1	3	3	9
1	-	-	1	-	2	1	4
n = 14		n = 21		n = 20		n = 20	
14	14	19	20	19	19	14	11
-	-	1	1	1	1	3	6
-	-	1	-	-	-	3	3

Schrifttum:

1. OBERZILL, W.: Mikrobiologische Analytik (1967).
2. ISRAEL, K. S. et al.: Pharmacology of LY 127935 in Man. (Abstract 1969) Programm und Abstracts, 11th International Congress of Chemotherapy and 19th Inter-science Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Boston, Mass., Oct. 1-5 (1979).
3. BAARS, B., OPFERKUCH, W.: Resistenzbestimmung mit dem Autobac-System. Immunität und Infektion 6, 270-273 (1978).

4. SHAH, P. M., RACKY, K., STILLE, W.: in vitro-Untersuchungen zum Dosierungsintervall von Cefoperazon. *Arzneim. Forsch.* 31, 482-485 (1981).
5. KROENING, U., WUNDSCHOCK, M., HUSSELS, H.: Schnelle fotometrische Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien. *Lab.med.* Nr. 11, 240-242 (1982).
6. BRINKMANN, G.: Die quantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration sowie der biochemischen Differenzierung *Labor-Praxis in der Medizin* (1981).
7. KRASEMANN, C.: Mikrobiologische Untersuchungen zu aktuellen Problemen der Chemotherapie, S. 122 (1981).
8. KRASEMANN, C.: Mikrobiologische Untersuchungen zu aktuellen Problemen der Chemotherapie S. 123 (1981).
9. LAMPE, M. F., AITKEN, C. L., DENNIS, P. G., FORSYTHE, P. S., PATRICK, K. E., SCHOENKNECHT, F. D., SHERRIS, J. C.: Relationship of early readings of minimal inhibitory concentration to the results of overnight test; *Antimicrob. Agents Chemother.* 8, 429-433 (1976).
10. GREENWOOD, D., O'GRADY, F.: Comparison of the Responses of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* to seven β -Laktam Antibiotics. *J. of Inf. Diseases*, Vol. 128, No. 2 (1973).
11. GREENWOOD, D., CHAN-TEOH, C. H., O'GRADY, F.: Activity of Cefazolin Against Dense Populations of Enterobacteria *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 191-195 (1975).
12. GREENWOOD, D.: The Alteration of Mikrobial Growth Curves by Antibiotics *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology* (1984).
13. SIMON, C., STILLE, W.: Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis. Schattauer S. 6 (1981).

Anschrift für die Verfasser:

Dr. med. Joachim Steffen
 Chefarzt des Zentrallaboratoriums des Krankenhauses Spandau
 Kladowerdamm 221
 1000 Berlin 22

□

Enzygnost®-Anti-HTLV III der Behringwerke mit gesetzlicher Zulassung

Der vom Paul-Ehrlich-Institut freigegebene Enzygnost®-Anti-HTLV III der Behringwerke bietet folgende Vorzüge:

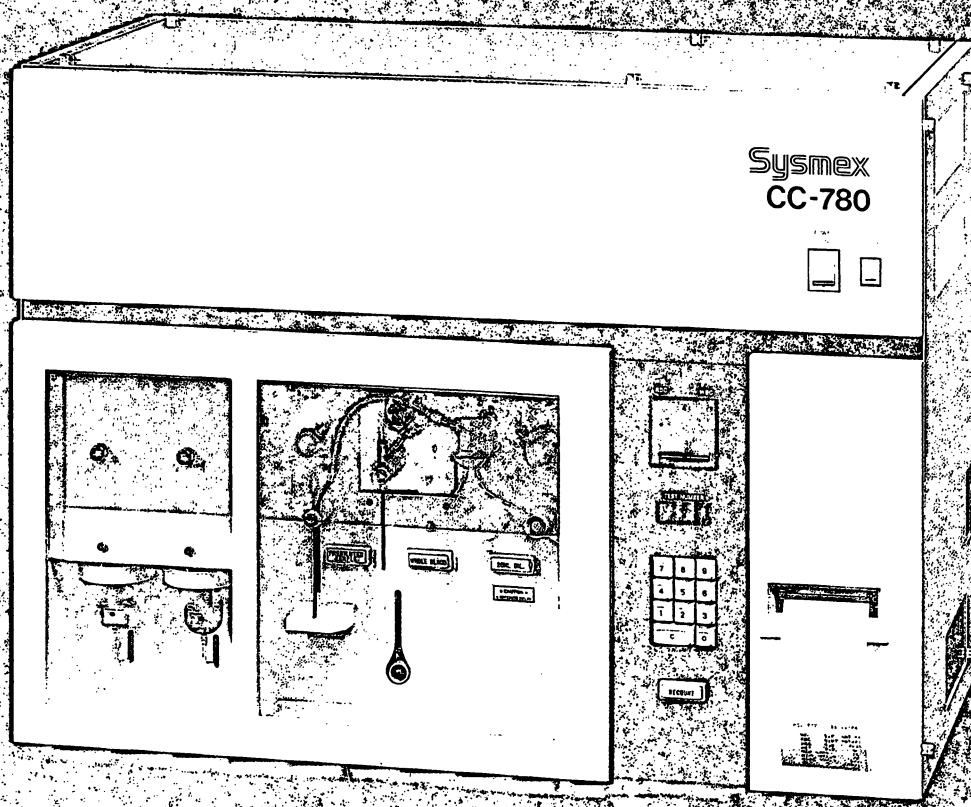
- hohe Sensitivität (99,6%),
- hohe Spezifität (99,2%),
- einfache Handhabung (ELISA-Technik in Mikrotitrationsplatten),
- kurze Gesamt-Inkubationszeit (90 min),
- Automatisierbarkeit durch Behring ELISA Processor II:

- kurze Testdauer (ca. 3,5 Std. für 480 Bestimmungen bei automatisierter Durchführung),
- große Flexibilität (teilbare Mikrotitrationsplatten, somit ökonomische Testdurchführung auch in kleineren Serienlängen),
- Möglichkeit der parallelen Bestimmung von weiteren Parametern (z. B. HBsAg mit Enzygnost®-HBsAg micro).

Für zahlreiche weitere Infektionen bieten die Enzymimmunoassays der Linie Enzygnost® die Möglichkeit der Frühdiagnose und der Immunitätsbestimmung: Hepatitis B, Mumps, Masern, Röteln, Cytomegalie, Herpes, Varicella/Zoster und Toxoplasmose. Hierbei kann der programmgesteuerte Behring ELISA Processor II die Arbeit wesentlich erleichtern.

8-Parameter-Hämatologie-Analysator Sysmex CC-780

Der Mittelpunkt im hämatologischen Labor



- Thrombozyten + 7 hämatologische Werte aus Vollblut oder Kapillarblut
- Absolutzählung ohne Kalibrierfehler
(Laboratoriumsmedizin 3/1985, 98-103)
- Abgesicherte Werte aller Parameter im Normal- und pathologischen Bereich

Sysmex CC-780 – der rationelle Automat

Sysmex®

TOA MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD.
Kobe, Japan

Alleinvertretung für die
Bundesrepublik Deutschland
und Berlin (West):

Colora Messtechnik GmbH
Postfach 1240
7073 Lorch, Würt.
Telefon: (07172) 183-0
Telex: 7248886

Technische Büros
in Berlin, Düsseldorf,
Frankfurt, Hannover,
Lorch, München

colora

Analysentechnik
für Forschung, Medizin
und Umweltschutz

+ info + +

TTE-TTS/RAS Automation in der Mikrobiologie

TTE-TTS-RAS ist ein halb-automatisches System, zur Identifizierung von Gram-negativen Bakterien innerhalb von 5 Stunden. Die Verbindung von Multiskan MCC, einer Computereinlage und der TTE-TTS-RAS Software oder der EIA-Software ermöglicht eine breite Anwendung der Anlage auch in der Serologie und Immunologie.

Für die 5 Stunden-Identifizierung und die Resistenztestung stehen gebrauchsfertige Kits zur Verfügung, die nach 5 Stunden mit TTE-TTS-RAS-Anlage abgelesen und ausgewertet werden. Neben der Auswertung der Tests bietet die TTE-TTS-RAS-Software folgende Möglichkeiten:

- ▷ Eingabe und Speicherung aller Patientendaten während der Inkubationszeit.
- ▷ Automatischer Abruf dieser Daten bei Ablesung der Tests.
- ▷ Kombierter Ausdruck von Identifizierung und Resistenztest für die gleiche Referenznummer.
- ▷ Erstellung eines Berichtsbogens für den behandelnden Arzt.

Unter dem Stichwort TTE-TTS-RAS senden wir Ihnen gerne weitere Informationen zu. Selbstverständlich stehen wir auch für eine unverbindliche Vorführung in Ihrem Labor zur Verfügung.

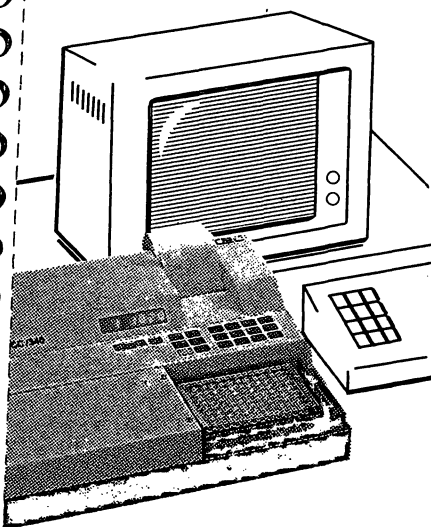
Flow Laboratories
Mühlgrabenstraße 10
5309 Meckenheim
Telefon: 0 22 25/8 80 50
Telefax: 8 869 334 a flo d

+ info + +

Rechner- unterstützte Testaus- wertung

- Enzym-Immuno-Assays
- klinische Chemie
- Mikrobiologie
- verschiedene Computersysteme
- unterschiedliche Komplexität

Berücksichtigung
spezieller
Fragestellungen
möglich.



Bitte fordern Sie
detailliertes
Informationsmaterial an.

Flow Laboratories
Mühlgrabenstraße 10
5309 Meckenheim
Telefon: 0 22 25/8 80 50
Telefax: 8 869 334 a flo d

Flow Laboratories
A Flow General Company

Flow Laboratories
A Flow General Company

Warum

BIOMED?

Weil bei **BIOMED**

- **Qualität** vor Mark beherrschung,
- **Flexibilität** vor Größe und
- **Entwicklung** vor Werbung steht.

BIOMED
Ihr Partner
im Labor.

Ihr Vorteil bei

BIOMED
○ optimales **Preis-Leistungs-Verhältnis.**

BIOMED
Einfacher. Sicherer.
Einfach sicher.

BIOMED
Labordiagnostik GmbH
Bruckmannring 28
8042 Oberschleißheim
bei München
Service-Telefon:
(089) 3151619