

Schnellidentifizierung von *E. coli* durch Enzymnachweis

H. K. Geiss, Margit Zahran

Hygiene-Institut der Universität Heidelberg

Abteilung Hygiene und Medizinische Mikrobiologie (Direktor: Prof. Dr. med. H.-G. Sonntag)

Der Nachweis bestimmter Enzyme als Hilfsmittel der Diagnostik ist in der medizinischen Mikrobiologie seit langer Zeit bekannt. Der am meisten gebräuchliche Test ist der Nachweis der β -D-Galaktosidase über die Spaltung des O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG). Das Vorhandensein anderer bakterieller Glykosidasen ist vor allen Dingen bei größeren taxonomischen Studien von Interesse.

Im Jahr 1976 untersuchten Kilian und Bülow verschiedene Glykosidaseaktivitäten bei Enterobacteriaceae und Vibrionaceae. Hierbei fanden sie die β -Glucuronidase, ein Enzym, das β -D-Glucopyranosidsäuren spaltet, ausschließlich bei Stämmen der Escherichia-Shigella-Gruppe. Der Nachweis gelang bei 97% aller *E. coli* sowie bei allen untersuchten Shigella-sonnei-Stämmen, während bei den übrigen Shigella-Species lediglich ein Drittel β -Glucuronidase positiv waren.

Aufgrund dieser Untersuchungen schlugen die Autoren im Jahre 1979 den Einsatz dieses Enzyms zur Schnelldiagnose von *E. coli* in Urinproben vor. Sie entwickelten einen Selektivagar (PGUA-Agar), der die Isolierung von Bakterien mit β -Glucuronidase-Aktivität in Mischkulturen ermöglicht.

Im Jahr 1984 untersuchten Hansen und Yourassowsky zwei Schnelltests zum Nachweis der β -Glucuronidase mit Hilfe substratimprägnierter Testplättchen bzw. Substrat-tabletten. Von über 300 getesteten *E. coli* konnte bei 95% das Enzym nachgewiesen werden. Auch sie hatten bei weiteren laktosepositiven Enterobacteriaceae keine falsch-positiven Ergebnisse und schlußfolgerten, daß mit diesem Enzymnachweis eine sehr effektive Methode zur Schnellidentifizierung von *E. coli* vorliege.

Seit einiger Zeit ist nun mit dem *Bactident E. Coli* (Fa. Merck, Darmstadt) ein solcher Testkit auf dem Markt. Der Enzymnachweis erfolgt hier allerdings nicht über chromogene Substanzen, sondern durch den Nachweis einer hellblauen Fluoreszenz im UV-Licht durch Freisetzung von 4-Methylumbelliferyl-Phosphat. Ergänzend dient der Nachweis der Indolbildung aus Tryptophan mit Hilfe des Kovacs-Reagens zur Sicherung der Diagnose.

Das Testset besteht aus einer Küvette und einem mit Substrat imprägnierten Teststreifen. In das Reaktionsgefäß werden ca. 0,2 ml entionisiertes Wasser eingebracht, hierin wird eine Suspension mit dem zu untersuchenden Stamm mit einer Trübung entsprechend McFarland 2 hergestellt. Das Teststäbchen wird in diese Suspension gesteckt und beides für 30–120 min bei 37°C inkubiert.

Die Testauswertung erfolgt frühestens nach 30 min. Hierbei wird die blaue Fluoreszenz unter einer UV-Lampe (Anregungswellenlänge 320–380 nm) nachgewiesen. Der Test ist spätestens nach 2 Std. zu bewerten. Nach Zugabe eines Tropfens Kovacs-Indolreagenz kann der Tryptophanabbau durch eine Rotfärbung nachgewiesen werden.

In einem Zeitraum von 3 Monaten testeten wir insgesamt 416 Stämme aus der Gruppe der Enterobacteriaceae mit diesem System. Die getesteten Isolate stammten zum überwiegenden Teil aus klinischem Material aus den Varia-Labors des Hygiene-Instituts der Universität Heidelberg bzw. aus Trink- und Badewasserproben unserer Routine-Labors.

Die Ergebnisse sind im folgenden aufgelistet:

Gesamtzahl getesteter Stämme 416

E. coli: 373, davon

β -Glucuronidase positiv	349 (93,1%)
β -Glucuronidase negativ	24 (6,9%)

Nicht-E. coli: 43, davon

β -Glucuronidase positiv	0
β -Glucuronidase negativ	43

Bei der Gruppe „Nicht-*E. coli*“ handelt es sich um:

Klebsiella oxytoca (n = 9), Klebsiella pneumoniae (n = 8), Citrobacter freundii (n = 8), Proteus vulgaris (n = 5), Citrobacter diversus (n = 4), Morganella morgani (n = 4), Proteus mirabilis (n = 3), Enterobacter cloacae (n = 2).

Die Bebrütungsdauer bis zum positiven Testausfall erwies sich als stark substratabhängig. So zeigte sich bei Anzucht auf Blutagar in ca. 70% aller von uns untersuchten β -Glucuronidase-positiven *E. coli* eine Fluoreszenz nach 30 min Inkubation, während bei Verwendung vom Keimmaterial von McConkey-Agar generell eine Bebrütung von mindestens 90 min zu empfehlen ist.

Ebenso ist zu beachten, daß ein positiver Indoltest nur nach Anzucht der Bakterien auf tryptophanhaltigen Nährmedien möglich ist. Somit scheidet z.B. Müller-Hinton-Agar als Isolierungsmedium für diesen Test aus.

Aufgrund unserer Untersuchungen erwies sich *Bactident E. coli* als durchaus praktikable Methode zur Schnellidentifizierung von *E. coli*. Das System besticht durch seine sehr einfache Handhabung, lediglich die Ablesung erfordert am Anfang eine gewisse Übung, besonders bei schwach-positivem Reaktionsausfall. Es empfiehlt sich deshalb – zumindest für die Dauer der Einarbeitungsphase – einen positiven Kontrollstamm mitzuführen.

Der Einsatz besonders in der Urindiagnostik ist discussionwürdig. Voraussetzung ist allerdings die Verwendung von Reinkulturen, da dieses System auf die Aussage *E. coli* Ja/Nein beschränkt ist und damit nur in die Hand eines erfahrenen medizinischen Mikrobiologen gehört, da ein Testergebnis immer nur in Verbindung mit den übrigen bakteriologischen Parametern sinnvoll beurteilt werden kann.

Eine interessante Möglichkeit ist die Verwendung in der Wasserbakteriologie, wo eine Beimpfung direkt aus der positiven Laktosebouillon in die Küvette einen vielversprechenderen Ansatz darstellt. Allerdings sollten vor der routinemäßigen Anwendung noch größere Testreihen über das Verhalten z. B. von Laktose vergärenden aeroben Sporenbildner durchgeführt werden.

Schrifttum:

HANSEN, W., YOURASSOWSKY, E.: Detection of β -Glucuronidase in Lactose-Fermenting Members of the Family Enterobacteriaceae and Its Presence in Bacterial Urine Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 20, 1177-1179 (1984).

KILIAN, M., BULOW, P.: Rapid Identification of Enterobacteriaceae. I. Detection of Bacterial Glycosidases. *Acta path. microbiol. scand. B*, 84, 245-251 (1976). II. Use of a β -Glucuronidase Detecting Agar Medium (PGUA Agar) for the Identification of *E. coli* in Primary Cultures of Urine Samples. *Acta path. microbiol. scand. B*, 87, 271-276 (1979).

Anschrift für die Verfasser:

Dr. med. Heinrich K. Geiss
Im Neuenheimer Feld 324
6900 Heidelberg

□

INSTAND-Mitteilungen

INSTAND-Ringversuche Klinische Chemie 1987

Unser Institut bietet im Jahre 1987 sechs Ringversuche auf dem Gebiet der „Klinischen Chemie“ an.

In der Gruppe „Klinische Chemie“ sind alle Analyte enthalten, die in den neuen Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung im medizinischen Laboratorium gefordert werden. Die neuen Richtlinien beinhalten darüber hinaus die Immunglobuline (IgG, IgA, IgM), die Antiepileptika, Theophyllin, Digoxin, Gesamtthyroxin sowie einige Steroidhormone (Aldosteron, Cortisol, Östradiol, Progesteron, Testosteron). Diese Analyte sind in anderen Gruppen, nämlich in Plasmaproteine I, Pharmaka I und II sowie in der Hormongruppe II enthalten.

Es wird daher empfohlen, daß die Teilnehmer zumindest diese Analyte im Laufe des Jahres 1987 in die regelmäßigen Ringversuche einbeziehen, damit bei Inkrafttreten der neuen Richtlinien die erforderlichen Vorübungen bei der externen Qualitätskontrolle dieser Analyte vorliegen.

Da die neuen Richtlinien der Bundesärztekammer nur zwei Ringversuche pro Jahr vorschreiben, werden wir am Ende des Jahres 1987 sorgfältig prüfen, ob auch im Jahre 1988 sechs Ringversuchstermine vorgesehen werden.

Bei der Bewertung des ersten Ringversuches 1987 auf dem Gebiet der „Klinischen Chemie“ wurden die Zielwerte – wie bisher – durch die Referenzlaboratorien, entsprechend den geltenden Richtlinien der Bundesärztekammer vorgegeben, die Bewertungsbereiche auf der Grundlage der bisherigen Erfahrungen und den medizinischen Erfordernissen festgelegt. Obgleich häufig die Zielwerte für mehrere Methoden identisch sind, ist dennoch eine Aufteilung der Teilnehmer nach methodischen Gesichtspunkten erfolgt. Diese methodenabhängige Aufteilung gibt Hinweise auch auf die Größe der Kollektive und die Bestehensquoten.

Aus den Ringversuchsergebnissen möchte ich nur wenige Analyte hervorheben. Die Probe 12 überrascht dadurch, daß für alle Eisenbestimmungsmethoden der Zielwert 26,0 $\mu\text{mol/l}$ gewählt werden konnte. Offensichtlich gibt es Matrices, die die methodenabhängige Bewertung der Eisenanalysen nicht erfordern. Auch bei Bilirubin konnten wieder einmal einheitliche Zielwerte für alle Methoden festgesetzt werden.

Problematische Analyte sind immer noch die Eisenbindungskapazität und Kreatinin sowie die extreme Methodenabhängigkeit bei der Bestimmung der Amylaseaktivität. Hervorheben muß ich noch die Aktivitätsmessung der sauren Phosphatase und der Prostataphosphatase: Die Aktivität beider Enzyme wird bei 25°, 30° und 37°C gemessen. Betrachtet man die Histogramme, so wird deutlich, daß ein Teil der Ringversuchsteilnehmer bei der Angabe der Methoden unvollständige oder falsche Angaben macht, wodurch die Analysenwerte den falschen Temperaturen zugeordnet werden. Die Folge ist, daß richtige Analysenwerte durch die falsche Methodenangabe außerhalb des Bewertungsbereiches fallen können. Eine sorgfältige Überprüfung der Methodenangaben in den Vorfeldern wird dringend empfohlen.

Erfreulicherweise ist festzustellen, daß die Zahl der unter „anderen Methoden“ zusammengefaßten Teilnehmern bei fast allen Analyten rückläufig ist. Es bleibt zu hoffen, daß sich diese Tendenz fortsetzt. Für die Bewertung der „anderen Methoden“ sehen die neuen Richtlinien der Bundesärztekammer vor, daß als Zielwert das arithmetische Mittel der vorhandenen Zielwerte eines Analyten zu setzen ist.

Im Januar-Ringversuch 1987 haben wir erstmalig versucht, auch CK-MB in den Ringversuchsproben zu analysieren. Dieser Versuch ist fehlgeschlagen, wobei von den Ringversuchsteilnehmern stark divergente Ergebnisse ermittelt wurden. Ohne auf Details einzugehen, bleibt festzustellen, daß die derzeit vorhandenen Ringversuchsproben eine externe Qualitätskontrolle der CK-MB-Analyse nicht erlauben.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß die Kosten der externen Qualitätskontrolle, verglichen mit denjenigen der internen Qualitätskontrolle, gering sind. Zudem bietet eine engmaschige Überwachung der Laboranalysen durch Ringversuche eine Sicherung und ggf. Korrektur der Analysenqualität. Das primäre und erklärte Ziel der externen Qualitätskontrolle sollte die Erbringung von richtigen und vergleichbaren Analysen im medizinischen Laboratorium sein, nicht aber die Jagd nach dem gültigen Zertifikat.

H. Reinauer