

# Klassische und moderne Methoden der bakteriellen Meningitis-Diagnostik aus klinisch-mikrobiologischer Sicht

Classic and Modern Methods for the Diagnosis of Bacterial Meningitis from a Clinical-Microbiological View

A. Kaufhold

Institut für Medizinische Mikrobiologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule, Aachen

## Zusammenfassung:

Für eine optimale Diagnostik und Therapie des akuten Meningitis-Syndroms ist eine enge Kommunikation von behandelndem Arzt und klinischem Mikrobiologen notwendig, um die vorhandenen Labormethoden differenziert einzusetzen und Resultate richtig zu bewerten. Es werden ausgewählte Aspekte zur Probenverarbeitung sowie zu mikroskopischen, kulturellen und immunologischen (Antigennachweis-)Untersuchungsverfahren beschrieben, und der klinische Stellenwert einzelner Methoden wird kritisch beurteilt. Obgleich traditionelle Arbeitsverfahren zu Diagnostik und Epidemiologie nach wie vor ganz im Vordergrund stehen, haben Methoden der Molekularbiologie (Einsatz von Gen-Proben und des „DNA-fingerprintings“) in Teilbereichen bereits zu Ergänzungen und Verbesserungen der diagnostischen Möglichkeiten geführt.

## Schlüsselwörter:

Bakterielle Meningitis – bakteriologische Liquoruntersuchung – Antigennachweis – molekulare Epidemiologie – Gen-Proben

## Summary:

The optimal diagnosis and therapy of the acute meningitis syndrome requires a close communication between the clinician and the clinical microbiologist in order to apply the available laboratory methods adequately and to assess the results correctly. Selected aspects of the processing of specimens and of microscopic, cultural, and immunological (antigen detection) procedures are described, and the clinical value of the different methods is critically appraised. Although traditional procedures for the diagnosis of bacterial meningitis and for epidemiological investigations are still predominant, molecular biology methods (application of gene probes and DNA fingerprinting) have already supplemented and improved the diagnostic possibilities to some extent.

## Keywords:

Bacterial meningitis – bacteriologic examination of cerebrospinal fluid – antigen detection – molecular epidemiology – gene probes

## Einleitung

Trotz bedeutender Fortschritte auf dem Gebiet der antimikrobiellen Chemotherapie ist die bakterielle Meningitis ein schwerwiegendes Krankheitsbild mit nahezu unverändert hoher Mortalität und Morbidität geblieben (5). Die Gründe für die relativ schlechte Prognose von Infektionen des Zentralen Nervensystems verglichen mit Infektionen anderer Lokalisation sind komplex, jedoch stellen Verzögerungen oder Unzulänglichkeiten in der Diagnostik und Therapie wesentliche Faktoren dar.

In der vorliegenden Übersicht sollen etablierte Methoden zur bakteriologischen Liquordiagnostik genannt sowie bewertet werden hinsichtlich methodischer Probleme und klinisch-praktischer Relevanz. Daneben werden kurz moderne, molekularbiologische Verfahren erläutert, die für epidemiologische und diagnostische Fragestellungen an Bedeutung gewinnen. Auf die Diskussion unspezifischer Tests (z. B. Bestimmung des C-reaktiven Proteins oder der Laktatkonzentration im Liquor, Endotoxinachweis [Limulustest]) wird verzichtet.

## Ätiologie

Häufiger zu erwartende nicht-virale Meningitis-Erreger sind in Tabelle 1 aufgeführt. Außer den genannten Mikroorganismen stellen Mykobakterien, Leptospiren, *Borrelia burgdorferi*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Naegleria*- und *Acanthamoeba*-Spezies weitere typische Ursachen zentralnervöser Infektionen dar, die – neben seltenen nicht-infektiösen Ursachen des Meningitis-Syndroms – in die Differentialdiagnose einzubeziehen sind und deren Labordiagnostik in der Regel spezialisierten Instituten vorbehalten ist. Beispielsweise kann bei dem Verdacht auf eine Neuro-Borreliose die kulturelle Anzucht von *B. burgdorferi* in speziellen Nährmedien (modifiziertes Kelly-Medium) versucht werden, vor allem ist die serologische Diagnostik einschließlich des Nachweises intrathekal gebildeter Antikörper anzustreben, deren technische Durchführung und Befundinterpretation aber besondere Kenntnisse und Erfahrung verlangt (25).

## Liquorgewinnung und Transport

Liquor cerebrospinalis zur mikrobiologischen Untersuchung wird unter strengster Asepsis entnommen. Einerseits muß die Gefahr einer Keimeinschleppung in den Liquorraum mit nachfolgender iatrogenen Infektion vermieden werden, andererseits kann eine Kontamination der Untersuchungsprobe durch Mikroorganismen der normalen Hautflora (z. B. *S. epidermidis* oder *Corynebakterien*) zu Interpretationsschwierigkeiten führen. Gewöhnlich reicht für einen bakteriologischen Untersuchungsgang eine Liquormenge von ca. 5 ml aus. Es ist jedoch zu beachten, daß bei dem Verdacht auf eine Pilzmeningitis der Nachweis der Pilze gelegentlich erst gelingt, wenn größere (40 ml) Volumina und/oder wiederholt Liquorproben untersucht werden (15).

Wenn eine unmittelbare kulturelle Liquorverarbeitung nicht durchgeführt werden kann, so empfiehlt es sich, 1–2 ml des Liquors in eine spezielle Liquorkulturflasche zu spritzen (z. B. Micrognost®-Liquorflasche, Biotest-Serum-Institut GmbH, Offenbach), die eine Erregervermehrung auch ohne zusätzliche Blut-supplementierung ermöglicht.

## Probenverarbeitung

Nach makroskopischer Beurteilung des Liquors wird die Untersuchungsprobe 15 Minuten lang bei 1500 x g zentrifugiert (16).

## Mikroskopische Untersuchungsverfahren

Ein Tropfen des Sediments wird jeweils auf einen sauberen Objektträger gegeben; nach Lufttrocknung und Hitzefixierung sollten immer eine Gram- und eine Methylenblau-Färbung durchgeführt werden. Andere Färbeverfahren (Äuramin-, Ziehl-Neelsen-, Tusche- und ggf. weitere Spezialfärbungen) werden nach klinischer Fragestellung zusätzlich durchgeführt. Der mikroskopische Direktnachweis stellt im Rahmen der Liquordiagnostik eine klassische unverzichtbare Schnellmethode zum Erregernachweis dar. Bei der (nicht-tuberkulösen) bakteriellen Meningitis kann das gramgefärbte Präparat in 65 bis 85% der Fälle die richtige Diagnose stellen. Falsch-negative Ergebnisse können bei einer zu geringen Keimdichte ( $\leq 10^3$ – $10^4$  Bakterien/ml) auftreten. Eine antibiotische Vorbehandlung des Patienten, mit der Literaturberichten zufolge in bis zu 50% der Fälle gerechnet werden muß (3, 5), ist häufig für falsch-negative Präparate verantwortlich und kann darüber hinaus zu atypischer Morphologie sowie atypischem Färbeverhalten der Mikroorganismen führen, so daß besondere Vorsicht bei der Interpretation des Präparates geboten ist.

Zusätzliche Hilfe für eine direkte mikroskopische Identifizierung der Bakterien im Präparat können Kapselquellungsreaktionen geben, die dann sichtbar werden, wenn *S. pneumoniae*- oder *H. influenzae*-haltiges Liquorsediment mit spezifischen Antiseren

auf einem Objektträger zur Reaktion gebracht wird (13). Die klinischen Angaben (auch das Alter des Patienten, s. Tab. 1) können für die Bewertung von mikroskopischen Präparaten außerordentlich hilfreich sein. Beispielsweise ist bei einem immunsupprimierten Patienten nach Nierentransplantation das Auftreten von typischen kurzen grampositiven Stäbchen mit abgerundeten Enden im eitrigen Liquor ein sehr guter Hinweis auf das Vorliegen einer *Listeria monocytogenes*-Meningitis; diesem Befund ist bei der antibakteriellen Therapie unmittelbar Rechnung zu tragen.

Beim klinischen Verdacht auf eine Kryptokokkose kann ein Tuschepräparat einfach die Diagnose stellen. Dieses Verfahren scheint angesichts der geringen Sensitivität (< 50%) allerdings entbehrlich, vielmehr muß – neben der Kultur – der serologische Antigennachweis durchgeführt werden (15).

#### Kulturelle Untersuchungsverfahren

Eine kulturelle Untersuchung des Liquorsedimentes ist in allen Fällen erforderlich, auch um die Antibiotikaempfindlichkeit angezüchteter Bakterien bestimmen zu können. Routinemäßig reicht es aus, eine Blutagarplatte mit 5% defibriertem Schafblut (ein nach dem Antrocknen des Inokulums aufgetragener *S. aureus*-Impfstich zum Nachweis des „Ammenphänomens“ von *H. influenzae* ist hilfreich), eine Kochblutagarplatte sowie ein flüssiges Nährmedium (z. B. Tryptic soy broth) in üblicher mikrobiologischer Technik zu beimpfen. Die Medien werden aerob in 5% CO<sub>2</sub> 48 h lang bei 35 °C bebrütet. Nur bei dem Verdacht auf eine (seltene) durch Anaerobier bedingte Meningitis (z. B. bei otogener oder von den Nasennebenhöhlen ausgehender Meningitis) werden zusätzlich in der Anaerobier-Bakteriologie üblicherweise verwendete Nährmedien beimpft und 14 Tage lang anaerob bebrütet. Bei Verdacht auf eine Pilzmeningitis werden zusätzlich zwei Sabouraud-Agarplatten (bebrütet bei 25 °C und 30 °C) sowie eine Sabouraud-Bouillon (bebrütet bei 30 °C) inokuliert. Eine Bebrütungsdauer von einer Woche ist in aller Regel ausreichend, nur bei dem Verdacht auf eine Meningitis durch dimorphe Pilze (v. a. *Coccidioides immitis*), mit der aber nur bei Patienten aus Endemiegebieten gerechnet werden muß, ist die Bebrütungsperiode auf vier Wochen auszudehnen.

Alle angezüchteten Mikroorganismen sollten bis zur Speziesebene nach anerkannten Verfahren differenziert werden (13), wobei nach Möglichkeit Schnellmethoden einzusetzen sind. Dafür

besonders geeignet erscheinen Methoden, die auf dem Schnellnachweis mikrobieller Enzyme mit chromogenen oder fluorogenen Substraten beruhen (10). Nach diesem Prinzip erfolgt auch der Schnellnachweis einer möglichen  $\beta$ -Lactamase-Bildung von *H. influenzae* (die Cephalosporinsubstrate Nitrocefin und PADAC sind hierfür geeignet), der bei diesem Bakterium durchgeführt werden sollte. Auch der Schnellnachweis der Chloramphenicol-Acetyltransferase von *H. influenzae* und *S. pneumoniae* ist mit einem kommerziellen Test möglich (14).

Die Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit muß nach standardisierten Verfahren entweder als Agardiffusionstest oder als Reihenverdünnungstest durchgeführt werden (13, 17). Das letztere Verfahren wird in jüngerer Zeit durch die Einführung kommerzieller Testsysteme auch im Routinelabor verfügbar und ist wegen der Möglichkeit, exakte minimale Hemmkonzentrationen zu bestimmen, grundsätzlich wünschenswert.

#### Immunologische Untersuchungsverfahren (Antigennachweis)

Der Antigennachweis im Liquorüberstand stellt eine wertvolle Ergänzung der genannten Methoden dar. Die Literatur zu diesem Thema ist umfangreich, ausgewählte Übersichtsartikel und Originalarbeiten sind im Schrifttum aufgeführt (1, 2, 4, 7, 8, 9, 11, 13, 19, 20, 23, 26). Folgende Techniken werden in unterschiedlichen Modifikationen genutzt:

Methode	Empfindlichkeit, kleinste nachweisbare Antigen-Konzentration/ml	Zeitbedarf
Latexagglutination	0,5–5 ng	10 Min.
Koagglutination	0,01–0,05 $\mu$ g	10 Min.
Gegenstrom-elektrophorese	0,01–0,05 $\mu$ g	30–60 Min.
Enzymimmunoassay	0,1–0,5 ng	mehrere Stunden (zum Teil auch schneller)

Bei den häufigsten Meningitiserregern handelt es sich um Mikroorganismen, die von einer Polysaccharid-Kapsel umgeben sind, wobei die Kapseln in ihren Mono- bzw. Disaccharidkomponenten bzw. in der Struktur ihrer antigendeterminanten Gruppen differieren.

Antisera gegen die Polysaccharid-Antigene der häufigsten Meningitiserreger sind kommerziell erhältlich.

Bei der Gegenstromelektrophorese (1, 8, 11, 23) handelt es sich um ein Präzipitationsverfahren, das in der Vergangenheit eine weitverbreitete Methode zum raschen Antigennachweis war, die aber hinsichtlich der Sensitivität nicht befriedigend sowie technisch relativ aufwendig ist, so daß diese Methodik für Routinezwecke weitgehend zugunsten von Agglutinationsverfahren verlassen worden ist.

Agglutinationsverfahren sind zwar einfach durchzuführen, die Bewertung von Reaktionsausfällen erfordert aber die Kenntnis von Fehlerquellen- und Störfaktoren.

Homogen suspendierbare Trägerpartikel werden mit poly- oder monoklonalen Antikörpern beladen; bei Reaktion mit dem homologen Antigen kommt es durch die Teilchenvergrößerung zu einer makroskopisch sichtbaren Agglutination. Als Trägerpartikel werden besonders Polystyrol-Latexpartikel von 0,81  $\mu$ m Durchmesser (Latexagglutination) oder Zellen bestimmter *Staphylococcus aureus*-Stämme (Koagglutination) benutzt.

Zur Erkennung falsch-positiver Reaktionen verursacht durch Immunglobuline mit Rheumafaktoraktivität werden mit normalem  $\gamma$ -Globulin beschichtete Trägerpartikel als Kontrollen mitgeführt. Diese und durch Komplementfaktoren oder andere Proteine bedingte unspezifische Reaktionen können durch 3- bis 5minütiges Kochen des Liquorüberstandes im Wasserbad und anschließendes Zentrifugieren eliminiert werden. Zum Nachweis der hitzelablen (besonders bei Gruppe B) Meningokokken-Antigene darf der Liquorüberstand aber nicht durch Kochen vorbehandelt werden.

Weiterhin können unspezifische Latexagglutinationen hervorgerufen werden durch die Kontamination der Untersuchungsprobe mit Bakterien (vor allem *Staphylococcus aureus*), deren Zelloberflächenproteine in der Lage sind, über die Bindung an die Fc-Stücke die IgG-beschichteten Latexpartikel zu aggregieren.

Tab. 1: Wichtige Meningitiserreger (außer Viren)

Mikroorganismus	bevorzugtes Lebensalter bzw. Prädispositionsfaktoren
<b>Bakterien:</b>	
<i>Streptococcus agalactiae</i> (Gruppe B-Streptokokken)	Neugeborene
<i>Escherichia coli</i> und andere Enterobakterien	Neugeborene
<i>Listeria monocytogenes</i>	Neugeborene, ältere Patienten, bei Immunsuppression, Alkoholabusus
<i>Haemophilus influenzae</i> (fast ausschließlich Kapselantigen-Typ b)	Kleinkinder unter 5 Jahren
<i>Neisseria meningitidis</i> (Meningokokken)	Schulkinder und Erwachsene, rezidivierend bei Komplementdefekten
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Pneumokokken)	Schulkinder und Erwachsene, häufigster Meningitiserreger bei Patienten über 40 Jahren nach Splenektomie
Staphylokokken (vor allem koagulase-negative Staphylokokken)	nach neurochirurgischen Operationen, bei Patienten mit Liquor-Ableitungssystemen
<b>Pilze:</b>	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	bei Immunsuppression, AIDS
<i>Coccidioides immitis</i>	nur in Endemiegebieten

Die publizierten Untersuchungen zeigen für die Koagglutination im Vergleich zur Latexagglutination alles in allem eine etwas geringere Sensitivität, auch das Auftreten von unspezifischen Agglutinationen kommt häufiger vor.

Der Antigennachweis von *C. neoformans* ist eine Methode mit sehr hoher Spezifität und Sensitivität; bei wiederholter Liquoruntersuchung ist in ca. 90 % der kulturell gesicherten Meningitiden mit einem positiven Ergebnis zu rechnen, so daß dieser Test zum unverzichtbaren Repertoire des mikrobiologischen Labors gehört (15, 26).

Die Nachweisraten bei bakterieller Meningitis mit Agglutinationsverfahren werden in der Literatur etwas unterschiedlich angegeben, was unter anderem auf die Qualität der benutzten Antiseren zurückzuführen ist, auch die zugrunde gelegte Referenzmethode ist für die Bewertung zu berücksichtigen.

*H. influenzae* Typ b und Streptokokken der serologischen Gruppe B werden am sichersten nachgewiesen, in aller Regel bei 90 bis 100 % der kulturpositiven Fälle. Pneumokokken-Antigene werden insgesamt schlechter nachgewiesen: Verschiedene Untersucher fanden, auch in Abhängigkeit davon, ob nur polyvalente oder auch monovalente Antiseren benutzt wurden, Antigennachweisraten von 60 bis 90%; ähnliche Zahlen finden sich für den Nachweis von *N. meningitidis* der serologischen Gruppen A, C, Y und W135. Mit Abstand am schlechtesten läßt sich das Antigen von Meningokokken der serologischen Gruppe B erfassen. Für den Nachweis dieses schwachen Immunogens werden neuerdings mit monoklonalen Antikörpern beschichtete Latex-Partikel verwendet (enthalten in den Testkits der Firmen Wellcome und Becton Dickinson), die möglicherweise zu besseren Ergebnissen führen können. Wichtig zu wissen ist, daß die Kapselpolysaccharide von Meningokokken der Serogruppe B und *E. coli* K1 identische Antigen-Determinanten besitzen. Eine positive Reaktion im Neugeborenenliquor spricht also eher für eine *E. coli*-Meningitis, während bei älteren Patienten eine Meningokokken-Meningitis wahrscheinlicher ist.

Die Spezifität der Agglutinationsverfahren beträgt insgesamt rund 95 %, es sind aber eine Vielzahl von Kreuzreaktionen mit Stämmen verschiedenster Spezies beobachtet worden (9, 13).

Enzymimmunoassays zum Antigennachweis im Liquor sind von verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt worden, die zum Teil die Agglutinationsverfahren an Sensitivität und Spezifität noch übertreffen (8, 19). Mittlerweile wird ein erster kommerzieller Test vertrieben (Pharmacia Meningitis EIA®), der im Röhrchen nach dem Prinzip der Sandwich-Technik durchgeführt wird und nach einer Stunde visuell ablesbar ist. Erste Erfahrungen mit diesem Testsystem sind publiziert (20), eine umfassende Bewertung ist aber noch nicht möglich.

Der Nachweis mikrobieller Antigene im Liquorüberstand hat neben der Schnelligkeit im Einzelfall weitere Vorteile:

- mikroskopisch gestellte Diagnosen können bestätigt und abgesichert werden (die Sensitivität aller Antigennachweisverfahren übertrifft die Empfindlichkeit des Grampräparates),
- der Antigennachweis ist bei antibiotischer Vorbehandlung des Patienten und negativem Kulturergebnis häufig die einzige Möglichkeit einer ätiologischen Diagnostik,
- der Antigennachweis kann bei quantitativer Antigenbestimmung oder bei Antigenpersistenz prognostisch und zur Therapiekontrolle genutzt werden.

Obgleich der Antigennachweis im Liquor eine insgesamt wertvolle Methode ist, haben Studien gezeigt, daß das Ergebnis eines raschen Antigennachweises häufig keinen Einfluß auf therapeutische Entscheidungen hat (6). Der klinische Wert ist vor allem bei Populationen mit niedriger Prävalenz bakterieller Meningitiden gering, zudem ist das potentielle Risiko eines Irrtums bei einer lebensbedrohlichen Erkrankung für den verantwortlichen Arzt nicht akzeptabel. Der Antigennachweis im Liquor ist also immer nur eine ergänzende Labormethode, die ihre Bedeutung in der individuellen klinischen Situation hat.

#### Molekularbiologische Methoden

In jüngerer Zeit haben molekularbiologische Methoden vermehrt Anwendungen in der Diagnostik von bakteriellen Infektionen und bei epidemiologischen Untersuchungen gefunden. Zur Lösung epidemiologischer Fragestellungen haben sich Verfahren des „DNA-fingerprintings“ bewährt und stellen eine wert-

volle Ergänzung herkömmlicher Methoden (u. a. Bio- und Phagentypisierung, serologische Typisierung) dar. Die molekulare Epidemiologie bedient sich der Ermittlung von Plasmidprofilen sowie der Anwendung von Restriktionsendonucleasen zur Verdauung von Plasmid-DNA oder chromosomaler DNA. Die DNA-Fragmente werden elektrophoretisch getrennt, um die so gewonnenen Bandenmuster visuell oder densitometrisch zu analysieren. Darüber hinaus können die DNA-Fragmente auf Membranfilter transferiert und mit spezifischen Gen-Proben hybridisiert werden (Southern Blot). Die genannten Verfahren sind mittlerweile für viele Bakterienpezies eingesetzt worden (18, 24). Vom Autor wurden diese Methoden zur Charakterisierung von klinischen *S. aureus*-Isolaten und von mehrfach antibiotikaresistenten Enterokokken erfolgreich genutzt (unveröffentlichte Daten). Der Nucleinsäure-Nachweis mit Hilfe von Hybridisierungsverfahren kann zum Direktnachweis bakterieller Erreger im Untersuchungsmaterial oder auch zur schnellen und sehr spezifischen Identifizierung angezüchteter Mikroorganismen verwendet werden (22). Für die bakteriologische Routinediagnostik wird diese Technologie durch den Einsatz nicht-radioaktiv markierter und kommerziell erhältlicher DNA-Proben (u. a. von Gen-Probe, San Diego, USA) nun verstärkt an Bedeutung gewinnen und konventionelle Isolierungs- und Identifizierungsverfahren bei bestimmten Indikationen teilweise ersetzen (z. B. Chlamydien- und Mykobakteriendiagnostik).

Der Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen direkt im Untersuchungsmaterial oder nach der kulturellen Anzüchtung hat eine Reihe von theoretischen und praktischen Problemen (21, 22). In noch unveröffentlichten Arbeiten hat der Autor in Kolonie-Hybridisierungsexperimenten mit Enterokokken-Isolaten den Nachweis der genetischen Determinante für ein Aminoglykosid-modifizierendes Enzym mit einer nicht-radioaktiv markierten DNA-Probe zeigen können.

Molekulargenetische Untersuchungen hinsichtlich des Direktnachweises von wichtigen bakteriellen Meningitis-Erregern aus dem Liquor befinden sich momentan im Stadium grundlegender Forschung. Vorläufige Ergebnisse weisen aber darauf hin, daß beispielsweise die Amplifikation mittels Polymerase Chain-Reaction (PCR) von spezifischen IgA-ase Gen-Sequenzen von *H. influenzae* Typ b und *N. meningitidis* zur empfindlichen Detektion dieser Bakterien genutzt werden kann (12).

#### *Danksagung*

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. R. Lütticken für die kritische Durchsicht sowie Frau W. Bollmann für das Schreiben des Manuskriptes.

#### *Schrifttum:*

1. ANHALT, J. P., KENNY, G. E., RYTEL, M. W.: Detection of microbial antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Cumitech 8. American Society for Microbiology*, Washington, D. C. (1978).
2. BAKER, C. J., RENCH, M. A.: Commercial latex agglutination for detection of group B streptococcal antigen in body fluids. *J. Pediatr.* **102**, 393-395 (1983).
3. DALTON, H. P., ALLISON, M. J.: Modification of laboratory results by partial treatment of bacterial meningitis. *Am. J. Clin. Pathol.* **49**, 410-413 (1968).
4. DROW, D. L., WELCH, D. F., HENSEL, D., EISENACH, K., LONG, E., SLIFKEN, M.: Evaluation of the Phadebact CSF test for detection of the four most common causes of bacterial meningitis. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 1359-1361 (1983).
5. GEISELER, R. J., NELSON, K. E., LEVIN, S., REDDI, K. T., MOSES, V. K.: Community - acquired purulent meningitis: a review of 1316 cases during the antibiotic era, 1954-1976. *Rev. Infect. Dis.* **2**, 725-745 (1980).
6. GRANOFF, D. M., MURPHY, T. V., INGRAM, D. L., CATES, K. L.: Use of rapidly generated results in patient management. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **4**, 157-166 (1986).
7. INGRAM, D. L., PEARSON, A. W., OCCHIUTI, A. R.: Detection of bacterial antigens in body fluids with the WellcoGen Haemophilus influenzae b, Streptococcus pneumoniae, and Neisseria meningitidis (ACYW135) latex agglutination tests. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 1119-1121 (1983).
8. KAPLAN, S. L.: Antigen detection in cerebrospinal fluid - pros and cons. *Am. J. Med.* **75** (Suppl. 1 B), 109-118 (1983).
9. KAUFHOLD, A., LÜTTICKEN, R.: Serologische Verfahren des direkten Erregernachweises (Antigennachweis). In: Burkhardt, F. (Hrsg.): *Mikrobiologische Diagnostik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (im Druck).
10. KAUFHOLD, A., LÜTTICKEN, R., SCHWIEN, U.: Few-minutes tests for the identification of group A streptococci and enterococci with chromogenic substrates. *Zbl. Bakt.* **272**, 191-195 (1989).
11. KOHLER, R. B., WHEAT, L. J., WHITE, A.: Rapid diagnosis by the detection of microbial antigens. In: Eason, C. S. F., Jeljaszewicz, J. (Hrsg.), *Medical Microbiology*, Volume 1, Academic Press, London (1982).
12. KURITZA, A., RYS, P.: Genetic amplification for detecting agents of bacterial meningitis. *Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.* **D 193**, 112 (1990).
13. LENETTE, E. H., BALOWS, A., HAUSLER JR., W. J., SHADOMY, H. J. (Hrsg.): *Manual of Clinical Microbiology*, Fourth edition, American Society for Microbiology, Washington, D. C. (1985).

14. MATTHEWS, H. W., BAKER, C. N., THORNSBERRY, C.: Relationship between in vitro susceptibility test results for chloramphenicol and production of chloramphenicol acetyltransferase by *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Aerococcus species*. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 2387-2390 (1988).
15. MCGINNIS, M. R.: Detection of fungi in cerebrospinal fluid. *Am. J. Med.* **75** (Suppl. 1 B), 129-138 (1983).
16. MURRAY, P. R., HAMPTON, C. M.: Recovery of pathogenic bacteria from cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **12**, 554-557 (1980).
17. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Second edition. Approved standard. NCCLS document M7-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA (1990).
18. OWEN, R. J.: Chromosomal DNA fingerprinting - a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens. *J. Med. Microbiol.* **30**, 89-99 (1989).
19. PEPPLE, J., MOXON, E. R., YOLKEN, R. H.: Indirect enzyme-linked immunosorbent assay or the quantitation of the type-specific antigen of *Haemophilus influenzae* b: a preliminary report. *J. Pediatr.* **97**, 233-237 (1980).
20. SALIH, M. A. M., AHMED, H. S., HOFVANDER, Y., DANIELSSON, D., OLCÉN, P.: Rapid diagnosis of bacterial meningitis by an enzyme immunoassay of cerebrospinal fluid. *Epidem. Inf.* **103**, 301-310 (1989).
21. TENOVER, F. C.: Studies of antimicrobial resistance genes using DNA probes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 721-725 (1986).
22. TENOVER, F. C.: Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 82-101 (1988).
23. TILTON, R. C., DIAS, F., RYAN, R.: Comparative evaluation of three commercial products and counterimmunoelectrophoresis for the detection of antigens in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 231-234 (1984).
24. WACHSMUTH, K.: Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks. *Rev. Infect. Dis.* **682-692** (1986).
25. WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V., FUCHS, R., SCHIERZ, G.: Diagnostik der Lyme-Borreliose. Labor und Diagnose, Laboratoriumsblätter **1**, 24-36 (1990).
26. WU, T. C., KOO, S. Y.: Comparison of three commercial cryptococcal latex kits for detection of cryptococcal antigen. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 1127-1130 (1983).

Anschrift des Verfassers:

Dr. A. Kaufhold  
 Institut für Medizinische Mikrobiologie  
 der Rhein-Westfälischen Technischen Hochschule  
 Pauwelsstraße 6  
 W-5100 Aachen

## Grenzen des manuellen und voll-mechanisierten Nachweises von Erreger-spezifischen Antigenen im Liquor cerebrospinalis

Limitations of Manual and Fully-Mechanized Detection of Bacterial and Fungal Antigens in Cerebrospinal Fluid (CSF)

T. O. Kleine\*, C. L. Cambiaso\*\*

\* Med. Zentrum für Nervenheilkunde (Funktionsbereich Neurochemie) der Universität Marburg/Lahn

\*\* Unit of Experimental Médecine, Université Catholique de Louvain, Bruxelles, Belgium

### Zusammenfassung:

Die Sensitivität des Nachweises von 6 Bakterienantigenen (*H. influenzae* Typ b, *S. pneumoniae*, Streptokokken Gruppe B, *N. meningitidis* Gruppe A, C oder B/E, *coli* K1) wurde in 3 käuflichen Latex-Tests und einem Co-Agglutinationstest für Liquor cerebrospinalis vergleichend untersucht und mit der Empfindlichkeit von 3 käuflichen Enzymimmunoassays (EIA) und 6 Particle Counting Immunoassays (PACIA) verglichen. Bezogen auf testeigene positive Kontrollen, die 1+1 fortlaufend verdünnt worden waren, ergaben sich folgende abnehmende Sensitivitäten bei PACIA > EIA >> Latex-Tests > Co-Agglutinationstests. Die 3 Latex-Tests zeigten sich unterschiedlich empfindlich. Beim Vergleich eines käuflichen Candidiasis-Tests mit Liposomen-Detektor-Partikeln erwies sich PACIA als empfindlicher. Der Vergleich mit Bakterien-extrakten und *Candida*-Extrakten wies auf große Unterschiede in Konzentration und Empfindlichkeit von Antigenen und Antikörpern in den Tests hin, die dringend standardisiert werden sollten.

### Schlüsselwörter:

Bakterienantigene - *Candida*-Antigen - Latex-Tests - Co-Agglutinationstests - Enzymimmunoassay - Particle Counting Immunoassay - Sensitivität

### Summary:

The sensitivity of the detection of 6 bacterial antigens (*H. influenzae* type b, *S. pneumoniae*, streptococcus group B, *N. meningitidis* groups A, C, or B/E, *coli* K1) was determined with 3 latex tests and one co-agglutination test, all commercially available for cerebrospinal fluid (CSF) diagnosis; it was compared with the sensitivity of 3 enzyme immunoassays (EIA) and 6 Particle Counting Immunoassays (PACIA) for CSF. There were found decreased sensitivities in the order PACIA > EIA >> latex tests >

co-agglutination tests after analysing of positive controls of the assays in 1+1 dilutions. The 3 latex tests also showed different sensitivities. Investigating a new candidiasis assay using liposome detector particles, the assay proved to be less sensitive than PACIA. Comparison with pretreated extracts of cultured bacteria and *Candida* indicated considerable differences in antigen concentration and/or antibody sensitivity of the assays and tests studied here; therefore, their standardization appears to be imperative.

### Keywords:

bacterial antigen - *Candida* antigen - latex tests - co-agglutination tests - enzyme immunoassay - Particle Counting Immunoassay - sensitivity

### Einleitung:

Bei der Akut-Diagnostik einer bakteriellen Meningitis im Liquor cerebrospinalis mittels freigesetzter Bakterienantigene zeigten sich Latex-Tests gegenüber der Gegenstrom-Immunelektrophorese empfindlicher und weniger arbeitsaufwendig (1-3). Bereits nach kurzer Anbehandlung mit Antibiotika waren diese käuflichen Tests zur Meningitiddiagnostik in Liquorproben zu unempfindlich, auch nach einfachen Modifikationen wie Reduzierung der Testvolumina und Verlängerung der Inkubation (4, 5). Auch in Kombination mit dem Lactat-Test fiel die diagnostische Sensitivität der modifizierten Latex-Tests bei anbehandelten bakteriellen Meningitiden unter 50% (6). Dagegen konnte ihre Empfindlichkeit mit verdünntem Reagenz und Probe durch visuelle mikroskopische Beurteilung der Präzipitation um 3 bis 6 Titerstufen erhöht werden (5). Damit kann mit dem Latex-Test - nach Modifikationen - eine Sensitivität erreicht werden, die mit Enzymimmunoassays (EIAs) zum Nachweis von Bakterienantigenen vergleichbar ist (7).

Die Einführung der Particle Counting Immunoassays (PACIA)-Technik in die Diagnostik von freigesetzten Bakterienantigenen ist durch die Steigerung der Sensitivität ( $\mu\text{g/l}$  bis  $\text{ng/l}$ -Bereich,

### Abkürzungen:

DDT: Dithiothreitol; EIA: Enzymimmunoassay; ELISA: Enzyme linked Immunoabsorbent Assay; RIA: Radioimmunoassay; PACIA: Particle Counting Immunoassay.