

Erfahrungen mit Isolierungen von Shigellen bei Tropenreisenden in einem Einsendelabor und einem Kliniklabor

Experiences in the isolation of *Shigella* from travellers to tropical regions at a private laboratory and a hospital laboratory

P.C. Döller¹, R. Seuffer²

Zusammenfassung

Bei Tropenreisenden sind Shigellen eine wichtige Ursache von Durchfallserkrankungen. Da Shigellen im Untersuchungsmaterial (Stuhl) schnell absterben, ist es wichtig, diese Untersuchungsproben so schnell wie möglich auf geeigneten Nährmedien anzusetzen. In dieser Mitteilung sollen unsere Erfahrungen mit dem Ansatz von frischen Untersuchungsproben im mikrobiologischen Krankenhauslaboratorium aufgezeigt werden. Die Isolierungsrate von Shigellen war 4,5mal höher als nach 11 km langem Transport in die vorher in Anspruch genommene Facharztpraxis für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie.

Schlüsselwörter

Shigellen – Isolierungsraten – Probentransport – Transportzeit – Präanalytische Phase – Transportmedien

Summary

Shigella are a major cause of diarrhoea in travellers to tropical regions. Since *Shigella* die quickly in sample material (stools), it is important to cultivate the samples as quickly as possible. The isolation rate of *Shigella* in fresh samples cultivated at our hospital was 4.5 times higher than that of samples formerly brought to a private laboratory located 11 kilometres away.

Key words

Shigella – isolation rates – specimen transport – transport time – preanalytic phase – transport media

Einleitung

In Deutschland werden jährlich ca. 2000 Fälle von Shigellenruhr gemeldet. Die Inzidenz blieb in den letzten 10 Jahren mit 2,4 bis 3,3 pro 100.000 Einwohner und Jahr relativ konstant [1]. Stuhlproben haben bis zur Beimpfung der Nährmedien meist lange Transportwege auf der Straße und Wartezeiten im Labor hinter sich. Trotz Kurierdiensten dauert diese Transport- und Wartephase immer noch einige Stunden. Seit langem kennt man das Problem geringer Ausbeuten bei der Shigellenkultur aus Frischmaterial wegen der extremen Empfindlichkeit der Shigellen gegenüber anderen Stuhlkeimen.

In der Tropenklinik Paul-Lechler-Krankenhaus Tübingen werden pro Jahr ca. 3400 Personen (ca. 1200 stationär und ca. 2200 ambulant) nach Tropenaufenthalt untersucht. Die häufigsten Beschwerden während und nach einem Tropenaufenthalt sind Durchfallserkrankungen. Häufige Erreger einer Dysenterie sind Shigellen. Zu dem bestehenden parasitologischen Laboratorium haben wir in der Tropenklinik auch ein bakteriologisches Labor eingerichtet, in welchem die Stuhlproben sofort nach der Abgabe auf Kulturmedien angesetzt und bebrütet werden. Das Labor hat am 01.03.1994 seine Tätigkeit aufgenommen. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden die Stuhlproben durch einen Transportdienst in eine 11 km entfernte Facharztpraxis für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie gefahren und dort angesetzt. Die Untersuchungsaufträge an diese Praxis waren auf den Nachweis von Salmonellen und Shigellen beschränkt. Dennoch wurde dort – unbezahlt – auch auf *Campylobacter* spp. untersucht.

Material und Methoden

Die bakteriologische Stuhluntersuchung in der Tropen- klinik erfolgte, wie in vielen Laboratorien üblich, auf kommerziellen, selektiven Fertignährmedien (Becton Dickinson, Heidelberg). Zur Untersuchung auf Salmonellen und Shigellen wurde je ein Mac Conkey- und Salmonella-Shigella-(SS)-Agar und eine Selenit-Bouillon mit Stuhl beimpft (Bebrütung bei 36° C). Die Able- sung erfolgte nach 24 und 48 Stunden. Die Aussaat aus der Selenit-Bouillon erfolgte nach 18 Stunden. Von ver-

¹ Korrespondenzadresse: Dr. med. Dr. rer. nat. Dipl. biol. P. C. Döller, Tropenklinik Paul-Lechler-Krankenhaus, Paul-Lechlerstraße 24, D-72076 Tübingen. Fax: x49-7071-22359

² Dr. med. Rudolf Seuffer GmbH, Ferdinand-Lassalle-Straße 40, D-72770 Reutlingen

dächtigen Kolonien wurde Kligler-Schrägagar beimpft. Für die Reinheitskontrollen wurden MacConkey und Blutagar verwandt. Die serologische Verdachtsdiagnose wurde biochemisch bestätigt (BBL-Crystal E/NF, Becton-Dickinson, Heidelberg). Für die Anzucht von *Aeromonas* und *Plesiomonas* spp. wurden keine zusätzlichen Nährmedien eingesetzt. Der Ansatz auf *Campylobacter* spp. erfolgte auf Campy BAP- und JC-Agar (Becton Dickinson, Heidelberg) und wurde mit Campy Pak-Plus in einem Gas Pak 100-Anaerobiertopf (Becton Dickinson, Heidelberg) bei 42° C bebrütet.

In der Facharztpraxis wurde die Stuhluntersuchung mit Nährmedien durchgeführt, die aus kommerziellen Trockenmedien in der eigenen Nährbodenküche hergestellt wurden (Desoxycholat-Citrat-Agar nach Hynes, CIN-Agar nach Schiemann, *Campylobacter*-Selektivagar [Blaser-Wang] (Unipath, Wesel), Endo-Agar, Columbia-5 % Schafsblutagar (BioMerieux, Nürtingen), Kligler-Agar, Tetrathionat-Kristallviolett-Anreicherungsbouillon nach Preuss, Selenit-Anreicherungsbouillon nach Leifson (Merck AG, Darmstadt), Api 20E (Bio Merieux, Nürtingen), Antisera von Behringwerke AG, Marburg, Sanofi Pasteur, Freiburg und vom Robert-Koch-Institut, Berlin.

Die ankommenden Stuhlproben wurden gegen 16 Uhr angesetzt. Die Anreicherungsbouillons wurden zwischen 8 und 9 Uhr am folgenden Tag ausgesät. Sämtliche halb-

festen Nährmedien wurden nach 24 und 48 h abgelesen. *Campylobacter*-platten wurden nach 48 h, *Yersinia*-platten nach 24 und 48 h sowie nach 5 Tagen abgelesen. *Campylobacter*-platten wurden in einer mittels *Campylobacter*-Gas-Generating-Kit (Unipath, Wesel) generierten Atmosphäre von 6 % Sauerstoff und 10 % Kohlendioxid bei 36° C bebrütet. Reinheitskontrollen wurden auf Endo-Agar, für *Yersinia* spp. auf Blutplatten durchgeführt.

Eine Untersuchung auf EHEC wurde in keinem der beiden Laboratorien durchgeführt.

Ergebnisse

Im Zeitraum vom 01.03.–31.12.1994 wurden in der Tropenlinik 2144 Stuhlproben untersucht. Daraus wurden folgende pathogene Keime isoliert (in Klammern die jährlichen Durchschnittszahlen aus den Jahren 1981–1993): *Salmonella* spp. 27 (26,4), *Shigella* spp. 32 (7,2), *Campylobacter* spp. 24 (25,6), *Aeromonas* spp. 3 (0) und *Plesiomonas shigelloides* 5 (0) (Abb. 1). Insgesamt wurden 91 darmpathogene Keime isoliert, was 4,2 Prozent entspricht. In der Praxis für Labormedizin wurde bei gleichem Patientenkollektiv (Tropenrückkehrer) eine ähnlich große Anzahl von Stuhlproben (durchschnittlich ca. 2400 pro Jahr) untersucht. Die durchschnittliche Rate positiver Stuhlkulturen lag bei ca. 2,5 Prozent.

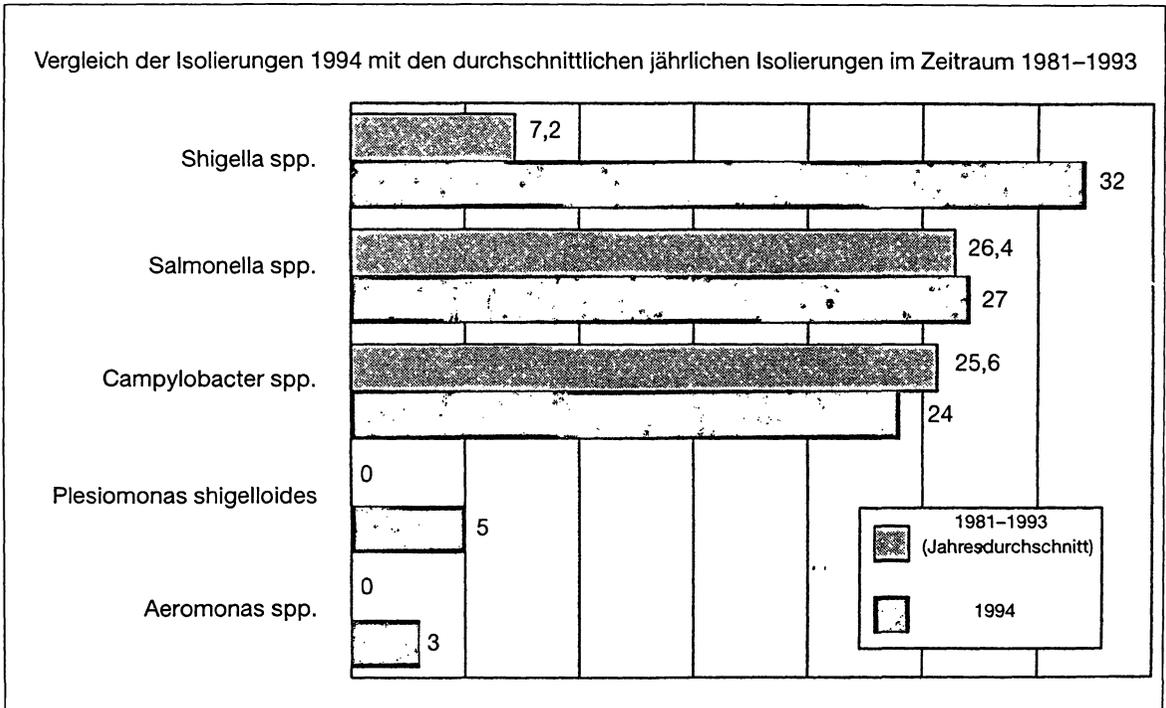


Abb. 1. Isolierung von pathogenen Bakterien aus Stuhl von Tropenrückkehrern

Diskussion

Ein direkter Vergleich der Isolierungsraten von Proben, die 1994 im Labor der Tropenklinik untersucht wurden, mit Proben, die früher (1981–1993) im auswärtigen Labor verarbeitet wurden, ist naturgemäß nicht möglich. Vergleicht man jedoch die Zahl der positiven Stuhlkulturen aus den Jahren 1981–1993 mit der Zahl von 1994, so kann man feststellen, daß im jährlichen Durchschnitt die Anzahl der isolierten Salmonellen- und Campylobacter-Arten etwa gleich blieb (was als interne Methoden-Kontrolle angesehen werden kann). Bei den Shigellen kam es jedoch zu einer drastischen Zunahme der Isolierungsraten. Während zwischen 1981–1993 die Isolierungsrate im Jahresdurchschnitt bei 7,2 Shigellen (= 12,2 % aller Isolate) lag, stieg sie 1994 in nur 10 Monaten auf bereits 32 (= 35,2 % aller Isolate). Seit die Stuhlproben sofort nach Stuhlabgabe angesetzt werden, zählen Shigellen zu den am häufigsten isolierten darmpathogenen Erregern bei Tropenreisenden. Der relativ geringe Anteil „positiver Stuhlkulturen“ von 4,2 % liegt daran, daß sehr viele der untersuchten Stuhlproben von asymptomatischen Personen stammten, die anlässlich einer routinemäßigen Tropenrückkehruntersuchung Stuhlproben abgaben.

Auch Hyams et al. [2] hatten während des Golfkrieges bei amerikanischen Soldaten zeigen können, daß in Stuhlkulturen, die innerhalb von 4 Stunden nach Abgabe angesetzt wurden, bei 30% der Patienten mit Diarrhoe Shigellen nachgewiesen werden konnten. Bei Stuhlproben, die in einem Cary-Blair-Transportmedium verschickt wurden, lag die Shigellen-Ausbeute nur bei 5%. Die Untersuchung von Hyams et al. zeigte eine etwa 6-fach höhere Isolierungsrate bei Ansatz von frischem Stuhl, in unserer Untersuchung lag die Rate ähnlich hoch (4,5-fach). Die Untersuchung von Hyams et al. zeigte auch, daß z. B. die Isolierungsrate von *Escherichia coli* unabhängig von einem frühen Ansatz oder einem Transport der Stuhlprobe in einem Transportmedium war. Auch unsere Ergebnisse zeigen, daß die Isolierungsraten von *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. unabhängig von der Transportzeit waren.

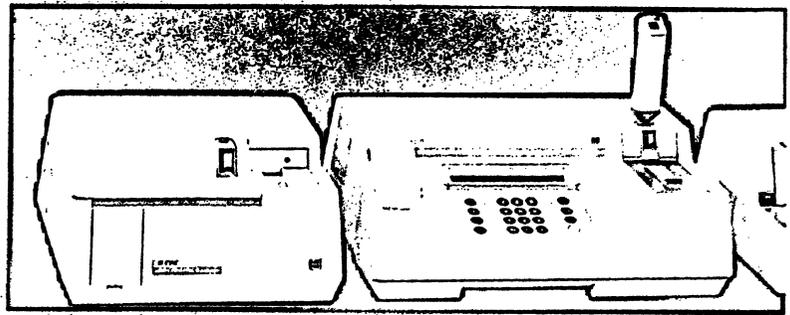
Während in den letzten Jahren nur sehr vereinzelt, da ausdrücklich aus Kostengründen nicht angefordert, (ge-

legentlich 1x pro Jahr, in den meisten Jahren gar nicht) sog. „neuere Enteritiserreger“ wie *Aeromonas* spp. bzw. *Plesiomonas shigelloides* isoliert wurden, konnten im Jahre 1994 bereits 8 mal (3 bzw. 5; = 8,8 % aller Isolate) diese exotischen Enteritiserreger isoliert werden, die in tropischen Ländern, insbesondere in Süd-Ost-Asien, häufig vorkommen. Der zusätzliche Ansatz einer Kligler-Reinheitskontrolle auf Blutagar ermöglichte die Prüfung nichtagglutinierender Glucose-positiver, Lactose- und H₂S-negativer Kligler-Kulturen mit der Oxidasereaktion. Oxidase-positive Keime wurden biochemisch differenziert. Dieses Vorgehen hatte sicherlich einen positiven Effekt auf die Isolierungsrate von *Aeromonas* spp. und *Plesiomonas shigelloides* gehabt.

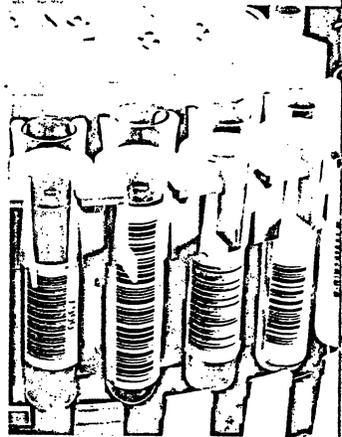
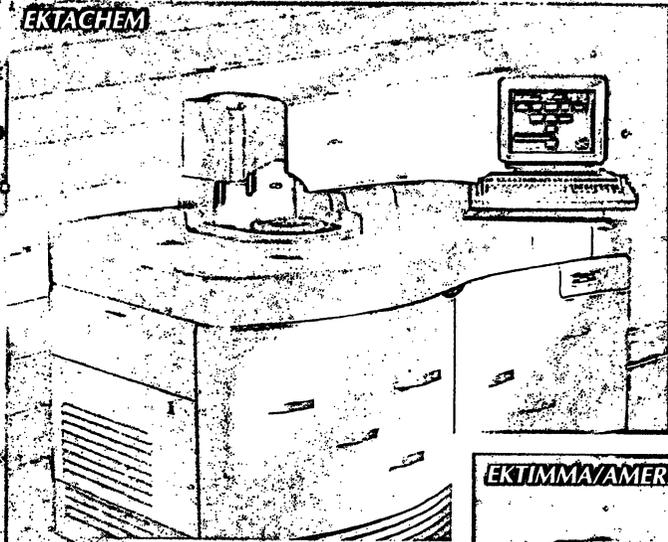
Unsere Untersuchung zeigt, daß erstens die Eingrenzung des Untersuchungsauftrags bei bakteriologischen Stuhluntersuchungen von symptomatischen und asymptomatischen Tropenrückkehrern nicht effizient ist und daß zweitens durch den Versand von Stuhlproben die Isolierungsrate von Shigellen stark reduziert wird. Selbst die Anwendung spezieller Transportmedien, wie sie in der Untersuchung von Hyams et al. verwendet wurden, ist nicht so effizient wie der frühe Ansatz von frisch abgegebenem Stuhl. Dies ist zwar seit langem bekannt, erweist sich jedoch bei der Anforderung von Stuhluntersuchungen oft als problematisch. Für eine optimale bakteriologische Stuhluntersuchung empfiehlt es sich daher, ein Laboratorium aufzusuchen, in welchem eine direkte Stuhlabgabe möglich ist. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, daß bei Tropenreisenden Shigellen als Infektionserreger eine weitaus größere Rolle spielen als die Meldungen vermuten lassen.

Literatur

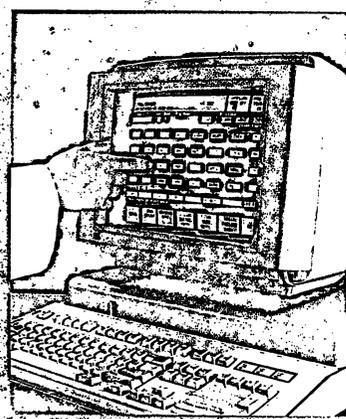
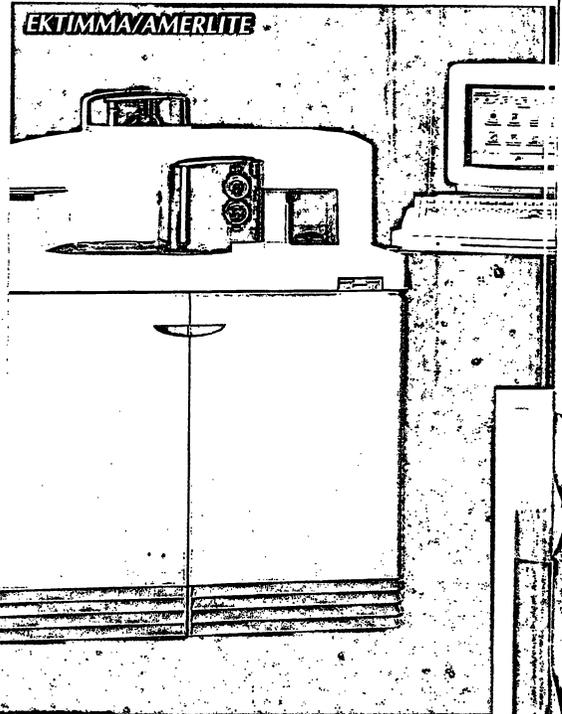
1. (1995) Statistisches Bundesamt Wiesbaden, persönliche Mitteilung
2. Hyams CK, Bourgois AL, Merrell BR, Rozmajz P, Escamilla J, Thornton SA, Wassermann GM, Burke A, Echeverria J, Green KY, Kapikian AZ, and Woode JN (1991) Diarrhoeal Disease During Operation Desert Shield. *N Engl J Med* 325(20), 1423-1428



EKTACHEM



EKTIMMA/AMERLITE



Johnson & Johnson

Clinical Diagnostics

IHRE PRODUKTIVITÄT
STEHT NICHT IN DEN STERNEN

AMERLEX

für die Radiö-Immunanalytik

AMERLITE

für die nichtradioaktive Immundiagnostik

- signalverstärkte Lumineszenz

EKTIMMA*

- vollautomatisches Immunoassay Analysesystem
- permanenter Zugriff bei kontinuierlicher Arbeitsweise, vollselektiv

EKTACHEM

für die Klinische Chemie

- mittels Mehrschichtfilmtechnologie
- Analysesysteme von 100 bis 900 Tests/Stunde

PCR Automation**

- „Pouch“ Konzept mit dem Ausschluß von Kontaminationsrisiken im Reaktionsablauf

SURECELL

- Schnelltests mit integrierten Kontrollen

Von KODAK zur → Johnson & Johnson Clinical Diagnostics

ab 1. 7. 1995: Karl-Landsteiner-Straße 1
69151 Neckargemünd

* verfügbar zu Beginn 1996

** in der Entwicklung