

Die Diagnose von Infektionskrankheiten im Labor erfordert den direkten oder indirekten Nachweis infektiöser Agenzien (Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen oder Parasiten) in Geweben, Körperflüssigkeiten oder Ausscheidungen des Wirtes. Den medizinisch-mikrobiologischen Labors obliegen die Untersuchung dieser Proben und die Bestimmung der Antibiotikaresistenz pathogener Bakterien und Pilze. Traditionell beruht der Nachweis pathogener Mikroorganismen auf mikroskopischen Verfahren und/oder auf der kulturellen Erregeranzucht. Die Erregeridentifizierung erfolgt über phänotypische Merkmale, wie biochemische Fermentationsprofile („bunte Reihen“) für Bakterien, zytopathische Effekte in Zellkulturen bei Viren oder die mikroskopische Beurteilung der Morphologie von Pilzen und Parasiten. Diese Techniken sind bewährt, aber oft zeitaufwendig.

In zunehmendem Maße ersetzen deshalb moderne Nukleinsäurenachweisverfahren für die Identifizierung, Charakterisierung und Quantifizierung von Mikroorganismen die Methoden der klassischen Mikrobiologie.

Dieses Kapitel behandelt allgemeine Vorgehensweisen bei der Diagnostik, mit Betonung bakterieller Erkrankungen. Einzelheiten zum Nachweis von Viren, Pilzen und Parasiten werden in den jeweiligen Einzelkapiteln besprochen (siehe Kap. 214e, 235 und 245e).

NACHWEISMETHODEN

Der technische Fortschritt im medizinisch-mikrobiologischen Labor führte zur Entwicklung von Nachweisverfahren auf nicht visueller Basis. Die Mehrzahl dieser Methoden basiert auf der elektronischen Messung biologischer Signale unter Verwendung von relativ kostengünstigen automatisierten oder teilautomatisierten Analyseplattformen. In diesem Abschnitt werden sowohl die gegenwärtig üblichen Nachweisverfahren als auch die Tendenzen künftiger Entwicklung beschrieben.

Ein *biologisches Signal* ist ein Stoff, der reproduzierbar von anderen Substanzen im selben physikalischen Milieu unterschieden werden kann. Entscheidend für die Verwendung eines biologischen (oder elektronischen) Signals in der Diagnostik sind die Abgrenzbarkeit vom Hintergrundrauschen und die Übersetzung in eine sinnvolle Information.

Biologische Signale in der medizinischen Mikrobiologie sind beispielsweise Strukturbestandteile von Bakterien, Pilzen oder Viren, spezifische Antigene, Stoffwechselendprodukte, einzigartige DNS- oder RNS-Sequenzen, Enzyme, Toxine und andere Proteine sowie Oberflächen-Polysaccharide.

Ein Detektor wird verwendet, um ein Signal zu registrieren und zwischen Signal und Hintergrundrauschen zu unterscheiden. Die Messsysteme reichen vom geschulten Auge des Untersuchers, der morphologische Kriterien beurteilt, bis hin zu sensitiven elektronischen Instrumenten wie computergestützte Gas- Chromatografen oder Massenspektrometer. Die Empfindlichkeit, mit der ein Signal gemessen werden kann, variiert in erheblichem Umfang. Es ist unerlässlich, ein Messverfahren einzusetzen, das ein schwaches biologisches Signal vor einem signifikanten Hintergrundrauschen erkennt und damit sowohl hinreichend sensitiv als auch spezifisch arbeitet.

Zu den üblichen Messverfahren gehören unter anderem die Immunfluoreszenz, die Chemilumineszenz für DNS- und RNS-Sonden, gaschromatografische Verfahren für den Nachweis kurz- oder langkettiger Fettsäuren, colorimetrische Tests für die Messung des Substratumsatzes oder eines Stoffwechselendprodukts, die fotometrische Messung von Enzymaktivitäten, die Trübung von Lösungen als Ausdruck eines Bakterienwachstums, die Beobachtung zytopathischer Effekte in Zelllinien oder Partikelagglutinationstests zum Nachweis spezifischer Antigene.

AMPLIFIKATION

Amplifikationstechniken erhöhen die Sensitivität, mit der schwache Signale detektiert werden können. Die am weitesten verbreitete Amplifikationsmethode in der mikrobiologischen Praxis ist das Wachstum

(durch wiederholte Teilung) eines einzelnen Bakteriums zu einer diskreten Kolonie auf der Agarplatte oder zu einer Suspension, die viele identische Mikroorganismen enthält. Diese Methode erfordert lediglich ein den Bedürfnissen des Mikroorganismus angepasstes Nährmedium, nachteilig ist der Zeitaufwand, der für die Vermehrung benötigt wird. Eine schnellere Verstärkung biologischer Signale wird mit Techniken wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), der Ligase-Kettenreaktion (LCR) und der transcription-mediated amplification (TMA), die jeweils auf die DNS/RNS des Pathogens abzielen, Enzymimmunoassays (EIAs; für Antigene und Antikörper), elektronischer Signalverstärkung (für gas- und flüssigkeitschromatografische Nachweisverfahren) und die selektive Filtration oder Zentrifugation erreicht.

DIREKTER ERREGERNACHWEIS

„Direkter Nachweis“ meint den Nachweis von Pathogenen ohne Kulturmethode. Molekulare Methoden dazu sind unten besprochen.

MIKROSKOPIE UND FÄRBUNG

Das Gebiet der Mikrobiologie wurde in hohem Maße durch die Entwicklung und den Gebrauch des Mikroskops beeinflusst. Die Untersuchung von Patientenproben mit mikroskopischen Methoden erbringt rasch nützliche diagnostische Informationen. Durch Färbetechniken können die Erreger zuverlässiger erkannt werden.

Die einfachste mikroskopische Untersuchungsmethode ist die Beurteilung eines Objektträger-Deckglaspräparates. Diese Technik findet beispielsweise bei der Untersuchung von Liquor auf *Cryptococcus neoformans* Anwendung: Durch Zugabe von Tusche werden die ausgeprägten Kapseln der Hefezellen als heller Saum gegen den dunklen Hintergrund der Tusche sichtbar. Objektträger-Deckglaspräparate werden auch beim Dunkelfeldverfahren verwendet, um Spirochäten aus Genitalläsionen und Borrelien oder Leptospiren im Blut nachzuweisen. Hautgeschabsel und Haarproben können entweder unter Verwendung von 10%iger KOH-Lösung untersucht werden oder mit der Calcofluor-White-Methode, bei der sich Pilzelemente im UV-Licht als fluoreszierende Strukturen darstellen. Die Anfärbung von Objektträger-Deckglaspräparaten, beispielsweise mit Laktophenol-Baumwoll-Blau für Pilzelemente, wird häufig zur morphologischen Identifizierung eingesetzt.

Gram-Färbung

Ungefärbt sind Bakterien mit lichtmikroskopischen Verfahren bei 400- bis 1000-facher Vergrößerung nur schwer zu erkennen. Obwohl einfache Ein-Schritt-Färbungen verwendet werden können, sind Differenzialfärbungen gebräuchlicher. Die Gram-Färbung unterscheidet zwischen Keimen mit dicker Peptidoglykanschicht der Zellwand (grampositiv) und solchen mit dünner Peptidoglykanschicht und äußeren Membranen, die mit Alkohol oder Aceton entfärbt werden können (gramnegativ). Zellmorphologie und Gram-Eigenschaft von gefärbten Keimen können häufig zur Klassifizierung beispielsweise als Streptokokken, Staphylokokken und Clostridien verwendet werden (Tab. 150e-1).

Die Gram-Färbung eignet sich besonders für die Untersuchung von Sputum auf polymorphkernige Granulozyten (PMN) und Bakterien. Sputumproben von immunkompetenten Patienten mit mindestens 25 PMN und < 10 Plattenepithelzellen pro Gesichtsfeld liefern in der Regel klinisch relevante Befunde. Demgegenüber spricht die Anwesenheit von mehreren morphologisch unterschiedlichen Bakterienarten und mindestens 10 Plattenepithelzellen pro Gesichtsfeld für eine Kontamination des „Sputums“ mit Rachenflora. Trotz der Schwierigkeit, zwischen physiologischer Flora und Pathogenen zu unterscheiden, kann sich die Gram-Färbung bei Proben mit umfangreicher residenter Flora als hilfreich erweisen, sofern ein geeigneter biologischer Marker existiert. So können in Gram-Präparaten von vaginal-abstrichen Epithelzellen nachgewiesen werden, denen grampositive Bakterien aufgelagert sind. Bei gleichzeitiger Abwesenheit von *Lactobacillus* und Nachweis von gramnegativen Keimen ergibt sich ins-

TABELLE 150e-1 Interpretation der Gram-Färbung^a

Morphologie	Zusätzliche Befunde	Art
Gramnegative Bakterien		
Stäbchen	Reguläre Stäbchen	Enterobacteriaceae (Escherichia coli, Salmonella spp., Shigella spp., sonstige) Pseudomonas aeruginosa Acinetobacter baumannii Stenotrophomonas maltophilia
	Kleine pleomorphe Kokkobazillen	Haemophilus influenzae und andere Haemophilus-Arten
Kokken	Diplokokken	Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Moraxella catarrhalis
Gekrümmte Stäbchen	Kommaförmig	Vibrio spp.
	Komma- oder S-förmig	Campylobacter spp.
Grampositive Bakterien		
Stäbchen	Kleine regelmäßige Stäbchen	Listeria monocytogenes
	Kleine pleomorphe Stäbchen in unregelmäßiger palisadenförmiger Anordnung („Lattenzaun“)	Corynebacterium spp.
	Große regelmäßige Stäbchen, gelegentlich mit Sporenbildung	Bacillus spp., Clostridium spp.
	Kettenförmig angeordnete Stäbchen	Nocardia spp., Actinomyces spp.
Kokken	Blass purpurfarbene oder nicht angefärbte, säurefeste Stäbchen	Mycobacterium spp.
	Paarweise oder in kurzen Ketten angeordnete Kokken	Streptococcus pneumoniae, Enterococcus spp.
	In langen Ketten angeordnete Kokken	Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, sonstige Streptokokken-Arten
	Haufenförmig angeordnete Kokken	Staphylococcus spp., Micrococcus spp.

^a Einige wichtige Bakterien sind in der Gram-Färbung nicht darstellbar, da sie zu klein oder zu schmal sind oder den Farbstoff nicht ausreichend retinieren. Dazu gehören Treponema pallidum, Borrelia burgdorferi, Chlamydia spp., Mycoplasma spp. und Ureaplasma spp.

gesamt ein Bild, das als typisch für das Vorliegen einer bakteriellen Vaginose gilt. In vergleichbarer Weise eignet sich die Untersuchung gefärbter Stuhlpräparate auf Leukozyten als Screeningmethode, bevor eine Untersuchung auf Clostridium-difficile-Toxin oder andere Darmpathogene erfolgt.

Die Untersuchung von Proben aus normalerweise sterilen Regionen, wie Liquor, Gelenk-, Pleura- und Peritonealflüssigkeit, mittels Gram-Färbung dient dem Nachweis von Bakterien und/oder PMNs. Die Nachweisgrenze liegt bei 10⁴ Keimen/ml. Bei Materialien, die erfahrungsgemäß nur geringe Keimzahlen aufweisen, geht der Färbung häufig eine Zentrifugation der Probe zur Anreicherung voraus. Das Pellet wird gefärbt und anschließend mikroskopiert. Diese einfache Methode ist besonders hilfreich bei der Untersuchung von Liquor auf Bakterien und Leukozyten oder der Untersuchung von Sputum auf säurefeste Stäbchen.

Ziehl-Neelsen-Färbung

Die Ziehl-Neelsen-Färbung dient dem Nachweis von säurefesten Bakterien (z. B. Mycobacterium spp.). Diese lassen sich mit Karbolfuchsin-Lösung rot anfärben und geben auch bei einer anschließenden Säure- und Alkoholbehandlung den Farbstoff nicht mehr ab. Modifikationen dieses Verfahrens erlauben die Unterscheidung zwischen Aktinomyzeten und Nokardien oder anderen schwach (oder teilweise) säurefesten Keimen. Die Ziehl-Neelsen-Färbung wird bei Sputum, Körperflüssigkeiten und Gewebeproben angewandt, wenn eine Infektion mit säurefesten Stäbchen vermutet wird (z. B. Mycobacterium spp.). Das Erkennen der pinkfarbenen bis roten Bakterien gegen den blauen Hintergrund, der durch die Gegenfärbung erzielt wird, erfordert ein trainiertes Auge, zumal ein ganzer Abstrich nur einige wenige säurefeste Bakterien enthalten kann. Dies kann selbst nach Anreicherung mittels Zentrifugation der Fall sein. Eine Alternative zur Ziehl-Neelsen-Färbung ist die Auramin-Fluoreszenz-Färbung.

Färbungen mit Fluorochromen

Fluorochrome Färbungen, beispielsweise mit Akridinorange, werden zur Identifizierung von Leukozyten, Hefen, Bakterien und Parasiten in Körperflüssigkeiten verwendet. Färbungen für Bakterienkapseln, -geißeln und -sporen können zur gezielten Darstellung von charakteristischen Strukturen herangezogen werden.

Immunfluoreszenz-Färbungen

Für den *direkten* Immunfluoreszenztest (IFT) werden Antikörper verwendet, die mit einer fluoreszierenden Komponente, wie Fluorescein, markiert und gegen ein spezifisches Antigen gerichtet sind, um Erreger sichtbar zu machen. Bei der Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop absorbiert die fluoreszierende Komponente ultraviolettes Licht und emittiert sichtbares Licht einer höheren Wellenlänge, das für das menschliche Auge sichtbar ist. Beim *indirekten* Fluoreszenztest bindet ein nicht markierter Ziel-Antikörper an ein spezifisches Antigen. Anschließend wird ein Fluorescein-markierter sekundärer Antikörper zugegeben, der gegen den Ziel-Antikörper gerichtet ist. Weil jeder nicht markierte Ziel-Antikörper mehrere Bindungsstellen für den zweiten Antikörper aufweist, kann das sichtbare Signal intensiviert werden. Beide – direkter und indirekter IFT – weisen virale Antigene (z. B. Zytomegalievirus, Herpes-simplex-Virus und respiratorische Viren) in Zellkulturen oder klinischen Proben nach. Ebenso geeignet sind sie zum Nachweis von vielen schwer anzüchtbaren Bakterien (z. B. Legionella pneumophila) in nativen Untersuchungsmaterialien.

■ MAKROSKOPISCHER ANTIGENNACHWEIS

Latex-Agglutinationstests und EIAs sind schnelle und preiswerte Nachweismethoden für Mikroorganismen, extrazelluläre Toxine und Viren auf der Basis von Protein- und Polysaccharid-Antigenen. Solche Tests können sowohl zum direkten Nachweis in Nativmaterialien als auch zur Untersuchung von Bakterien- oder Viruszellkulturen eingesetzt werden. Monoklonale oder polyklonale Antikörper, die an einen Indikator (wie Latex-Partikel, ein Enzym oder einen Chemilumineszenzfarbstoff) gekoppelt sind, werden zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Reaktion benutzt.

Techniken wie die direkte Agglutination von Bakterienzellen mit spezifischen Antikörpern sind einfach, aber relativ wenig sensitiv, während Latex-Agglutination und EIA sensitiver sind. Einige Zell-assoziierte Antigene, wie Kapselpolysaccharide oder Lipopolysaccharide können durch Agglutination einer Bakteriensuspension mit Antiseren bestimmt werden; diese Methode ist zur Typisierung der somatischen Antigene von Shigellen und Salmonellen geeignet. Bei Immunoassays, die auf der Markierung von Antikörpern mit Enzymen beruhen, führt die Antigen-Antikörper-Reaktion in der Konsequenz zur Umwandlung eines farblosen Substrates in ein farbiges Produkt, das spektrofo-

tometrisch gemessen wird. Weil die Kopplung eines Enzyms an den Antikörper schwache biologische Signale verstärken kann, ist die Sensitivität solcher Tests häufig hoch, eine weitere Signalverstärkung ist durch „Sandwichtechniken“ unter Verwendung von Primär- und Sekundärantikörpern möglich. Die meisten Tests für die Erregerdiagnostik liefern rein qualitative Informationen (Antigen vorhanden oder nicht), einige Tests lassen darüber hinaus quantitative Aussagen über die Erregerkonzentration zu. EIA-Techniken sind auch für den Nachweis von bakteriellen Toxinen (z. B. Clostridium-difficile-Toxine A und B im Stuhl oder das Shiga-Toxin von enterotoxischen Escherichia coli) geeignet.

Schnelle und einfache Immunoassays für Antigene von A-Streptokokken, Influenzaviren und Respiratory Syncytial Virus (RSV) können direkt im klinischen Labor auch ohne Hinzuziehung eines Speziallabors durchgeführt werden und ermöglichen dadurch eine sofortige Therapieentscheidung. Solche Tests weisen in der Regel eine akzeptable Spezifität auf, bei gleichzeitig mäßiger Sensitivität.

■ PATHOGENNACHWEIS DURCH SEROLOGISCHE METHODEN

Der Nachweis von erregerspezifischen Antikörpern ist ein häufig für die Virusdiagnostik eingesetztes Verfahren, aber auch andere, meist schwer kultivierbare bakterielle Erreger, wie Borrelien, Brucellen oder Rickettsien, können damit diagnostiziert werden. Die verwendeten Methoden sind in erster Linie Enzym- oder Lumineszenzimmunoassays, daneben kommen Western-Blots, Agglutinationstechniken, Hämagglutinationshemmtests oder die indirekte Immunfluoreszenz zum Einsatz. In der Regel werden entweder IgM-Antikörper (als Ausdruck einer primären Immunantwort) oder IgG-Antikörper (als Ausdruck einer zeitlich verzögerten sekundären Immunantwort oder Booster-Reaktion) und in manchen Fällen (z. B. einige Tests für die Hepatitisdiagnostik) auch beide Antikörperklassen gemeinsam nachgewiesen. Insbesondere bei schleimhautassoziierten Infektionskrankheiten (z. B. Chlamydien- oder Helicobacterinfektionen) hat auch der Nachweis von erregerspezifischem IgA Bedeutung erlangt, der hier oft den IgM-Nachweis ersetzt. Serologische Diagnostik ist indirekte Diagnostik: Es wird nicht der Erreger selbst, sondern die humorale Immunreaktion des Wirtsorganismus auf den Erregerkontakt nachgewiesen. Serologische Befunde werden maßgeblich durch den Zustand des Immunsystems des Patienten, die spezifische Biologie des Erregers und die daraus resultierende Erreger-Wirts-Interaktion beeinflusst. Bei der Interpretation eines Testergebnisses müssen daher verschiedene Aspekte Berücksichtigung finden (Tab. 150e-2).

Der Nachweis von IgM steht in der Regel in engem zeitlichem Zusammenhang mit einer Akutinfektion, ist damit aber keineswegs gleichzusetzen: IgM-Antikörper können nach überstandener Infektion persistieren (meist 3–6 Monate, in Einzelfällen mehrere Jahre), werden auch nach Impfung gebildet und sind gelegentlich nach einem erneuten Erregerkontakt trotz bestehender Immunität in geringer Konzentration nachweisbar. Zusätzlich zeigen Tests zum IgM-Nachweis häufiger unspezifische (falsch positive) Ergebnisse als IgG-Tests.

TABELLE 150e-2 Bei der Interpretation der serologischen Erregerdiagnostik einfließende Aspekte

1. Nachgewiesene Antikörperklasse (IgG und/oder IgM bzw. ggf. IgA)
2. Antikörperkonzentration
3. Verlauf (Serokonversion, Titeranstieg oder -abfall)
4. Avidität der IgG-Antikörper zur Beurteilung des Infektionszeitpunktes. Zu Beginn der Immunreaktion werden zunächst niedrigavide IgG-Antikörper gebildet. Durch somatische Hypermutation in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe „reifen“ die Antikörpermoleküle, sodass mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur Primärinfektion die Avidität der Antikörper zunimmt
5. Zielantigen der nachgewiesenen Antikörper. So zeigt der Nachweis von Anti-HBc in der Hepatitis-B-Serologie einen Erregerkontakt an, ohne zwischen einer bestehenden oder abgelaufenen Infektion zu unterscheiden, während der Nachweis von Anti-HBs eine überstandene Infektion und Immunität anzeigt
6. Erregerspezifische Faktoren: Inkubationszeit, Infektionsort, Persistenz
7. Patientenspezifische Faktoren: Immunglobululingabe, Immundefekte, Neugeborenenalter
8. Stör- und Einflussfaktoren: z. B. Schwangerschaft, Koinfektionen, Komorbidität

IgG-Antikörper erscheinen später im Verlauf einer Infektion und persistieren oft lebenslang. Diese Persistenz ist nicht immer gleichbedeutend mit einer überstandenen Infektion und kann nur dann als Beleg für eine Immunität gewertet werden, wenn die Bindung des Antikörpers an das spezifische Antigen den Lebenszyklus des pathogenen Mikroorganismus unterbricht (Nachweis neutralisierender Antikörper) oder die Wirkung mikrobieller Toxine hemmt (z. B. antitoxische Immunität gegen Diphtherie und Tetanus). IgG-Antikörper werden auch gefunden bei Akutinfektionen (oft in niedriger Konzentration bei gleichzeitig positivem IgM, Titeranstieg im Verlauf), bei chronischen Infektionen (z. B. Hepatitis B und C, HIV), nach passiver Immunglobuliningabe oder als Leittiter der Mutter bei Säuglingen.

INTERFERON-γ-FREISETZUNGSTESTS

Interferon(IFN)-γ-Freisetzungstests bilden Teilaspekte der T-Zell-vermittelten Immunreaktion auf pathogene Mikroorganismen in vitro ab. Praktische Bedeutung haben diese Verfahren vor allem in der Diagnostik der Tuberkulose erlangt, wo sie aufgrund höherer Spezifität und Sensitivität den Tuberkulin-Hauttest als Screeningtest zunehmend ablösen. Beide etablierten Tests (QuantiFERON-TB Gold und T-SPOT.TB) basieren auf der Stimulation von T-Lymphozyten durch zwei spezifische Antigene (ESAT-6 und CFP-10) von Mycobacterium tuberculosis. Da diese Antigene weder durch den BCG-Stamm noch durch nicht tuberkulöse Mykobakterien (MOTT) exprimiert werden, führt eine frühere BCG-Vakzinierung oder ein vorausgegangener Kontakt mit MOTT zu keinem positiven Testergebnis. Der Unterschied zwischen beiden Tests besteht darin, dass beim QuantiFERON-TB das nach Stimulation von Vollblut gebildete IFN-γ gemessen wird, während der T-SPOT.TB die Zahl der IFN-γ-produzierenden aktivierten T-Lymphozyten bestimmt. Wie die serologischen Verfahren stellen auch IFN-γ-Freisetzungstests indirekte Methoden der Diagnostik dar: Sie können eine aktive Tuberkulose nicht von einer latenten Infektion unterscheiden; hier bleiben direkte Erregernachweise (Mikroskopie, Kultur, PCR) wegweisend. Ein weiteres potenzielles Einsatzgebiet der IFN-γ-Freisetzungstests ist das Immunmonitoring transplantierter Patienten im Zusammenhang mit CMV- und Polyomavirusinfektionen. Im Gegensatz zur Tuberkulosedagnostik korreliert hier die abnehmende Zahl IFN-γ-produzierender T-Lymphozyten mit dem Risiko der Reaktivierung einer latenten Virusinfektion. Diagnostische Verfahren auf der Basis der intrazellulären Zytokinmessung mittels Durchflusszytometrie befinden sich zurzeit in Entwicklung.

KULTURELLER NACHWEIS VON PATHOGENEN MIKROORGANISMEN

■ PROBENNAHME UND -TRANSPORT

Für die kulturelle Anzucht von Bakterien, Pilzen oder Viren muss die Probe in ein geeignetes Wachstumsmedium überführt werden. Die erfolgreiche Identifizierung eines spezifischen Pathogens hängt meist von der Probenahme und dem Transport, in Verbindung mit einem angemessenen Bearbeitungsalgorithmus im Labor, ab. In einigen Fällen ist es besser, die Probe vor dem Transport direkt nach der Entnahme auf ein Kulturmedium zu überimpfen (z. B. Harnröhrenabstriche auf Neisseria gonorrhoeae). Im Allgemeinen gilt: Je schneller die Probe in ein geeignetes Medium überimpft wird, umso höher ist die Chance, bakterielle Pathogene zu isolieren. Tiefe Gewebeprobe oder Punktate (Eiter) ergeben meist wertbarere Kulturergebnisse als oberflächliche Abstriche. In Tabelle 150e-3 sind die Abnahme- und Transportverfahren für gebräuchliche Proben aufgelistet. Weil viele erregerspezifische Besonderheiten zu beachten sind, sollte in Zweifelsfällen ein mikrobiologisches Labor kontaktiert werden.

■ ISOLIERUNG PATHOGENER BAKTERIEN

Die Isolierung von verdächtigen Keimen aus klinischen Materialien beruht auf dem Einsatz künstlicher Medien, die bakterielles Wachstum in vitro fördern. Solche Medien bestehen aus Agar, der selbst nicht durch die Bakterien verstoffwechselt wird, sowie aus Nährstoffen, die das Wachstum der jeweiligen Bakterienspezies fördern. In einigen Fällen werden Substanzen zugesetzt, die das Wachstum anderer Bakterien hemmen. Flüssigmedien werden zur Anzucht (Vermehrung) von Keimen aus Materialien mit geringer Keimdichte eingesetzt, wie beispielsweise Peritonealdialysat und Liquor oder für Proben, bei denen mit Anaerobiern oder anderen anspruchsvollen Keimen gerechnet werden muss. Bouillons, die das Wachstum bzw. die

TABELLE 150e-3 Anleitung zu Probennahme und Transport für kulturelle Erregernachweise

Merke: In jedem Fall muss das mikrobiologische Labor über den Entnahmeort der zu kultivierenden Probe und über die vermutete Infektion informiert werden. Diese Information bestimmt die Auswahl der Kulturmedien und die Bebrütungsdauer.

Kulturtyp (Synonyme)	Probenmaterial	Mindestmenge	Probengefäß	Ergänzende Bemerkungen
Blut				
Blut, Routine (Blutkultur auf Aerobier, Anaerobier und Hefen)	Vollblut	Erwachsene und Kinder: je 10 ml in beide Flaschen Kleinkinder: wenn möglich 5 ml in aerobe Flasche Bei Neugeborenen weniger	Siehe unten ^a	Siehe unten ^b
Blut auf Pilze (außer Hefen)/Mycobacterium spp.	Vollblut	Je 10 ml in 2 Flaschen, wie für Routine-Blutkultur oder in Isolator-Röhrchen vom Labor	Wie bei Routine-Blutkultur	Kennzeichnung mit „Langzeitbebrütung“, da einige Pilze 4 Wochen zum Wachstum benötigen
Blut, Isolator (Lyse/Zentrifugation)	Vollblut	10 ml	Isolator-Röhrchen	Hauptsächlich zur Isolierung von Pilzen, Mykobakterien und anderen anspruchsvollen Aerobiern sowie zur Elimination von Antibiotika aus Blutkulturen, in denen Erreger durch Zentrifugation angereichert werden
Respirationstrakt				
Nase	Abstrich von Nasenvorhöfen	1 Abstrich	Steriler Tupfer im Transportmedium	Verwendung von Kalziumalginat-Abstrichen möglich
Rachen	Abstrich des hinteren Pharynx, von Ulzerationen oder eiterverdächtigen Regionen	1 Abstrich	Steriler Tupfer im Transportmedium	Siehe unten ^c
Sputum	Frisches Sputum (kein Speichel)	2 ml	Kommerziell erhältliches Sputum-Röhrchen oder vergleichbares Behältnis mit Schraubverschluss	Sputum und keinen Speichel einsenden; das Auszählen von Platteneithelien und Granulozyten im Gram-Präparat oft wichtiger Teil der Beurteilung, auch induziertes Sputum möglich
Bronchialaspirat	Transtracheales Aspirat, bronchoskopisch gewonnene Probe oder Bronchialaspirat	1 ml Aspirat oder Bürste in Transportmedium	Steriles Aspirat oder Bronchoskopie-Röhrchen, Bronchoskopie-Bürste in separatem sterilem Behälter	Spezielle Vorkehrungen abhängig von den diagnostischen Überlegungen (z. B. Pneumocystis)
Stuhl				
Stuhl für Routine-Kultur, Stuhl auf Salmonella, Shigella, Campylobacter und Yersinien	Rektalabstrich oder (vorzugsweise) frischer Stuhl	1 g Stuhl oder 2 Rektalabstriche	Fest schließendes Stuhl-Röhrchen oder anderes auslaufsicheres Gefäß	Bei Verdacht auf Infektion mit Vibrio spp. Labor im Vorfeld informieren und geeignete Abnahme-/Transportsysteme verwenden
Stuhl auf enteropathogene Escherichia coli (einschließlich EHEC) und Clostridium difficile	Frischer Stuhl	1 g	Fest schließendes Stuhlröhrchen	<i>Einschränkung:</i> Toxinnachweis erfordert Anreicherungstechniken
Stuhl auf Aeromonas und Plesiomonas	Frischer Stuhl	1 g	Fest schließendes Stuhlröhrchen	<i>Einschränkung:</i> nur sinnvoll, wenn gleichzeitig auch auf andere bakterielle Enteritiserreger untersucht wird
Urogenitaltrakt				
Urin	Hygienisch einwandfrei gewonnener Mittelstrahl- oder Katheterurin	0,5 ml	Eintauchnährboden im sterilen, auslaufsicheren Behälter mit Schraubverschluss oder spezielles Urinröhrchen	Siehe unten ^d
Urogenitalsekrete	Vaginalsekret, Harnröhrensekret, Zervixabstrich, Gebärmuttersekret, Prostata-Exprimat, Sperma usw.	1 Abstrich oder 0,5 ml Flüssigkeit	Vaginal- und Rektalabstriche in Amies-Transportmedium oder vergleichbarem Transportmedium für B-Streptokokken-Nachweis; direkte Beimpfung von Kulturplatten für Neisseria gonorrhoeae	Möglichst keine Vaginalabstriche zur „Routinekultur“, sofern kein konkreter Verdacht besteht. Zum Nachweis von mehreren Keimen (z. B. B-Streptokokken, Trichomonas, Chlamydia oder Candida spp.) immer einen Abstrich pro Keim gewinnen

Tabelle 150e-3 (Fortsetzung)

Kulturtyp (Synonyme)	Probenmaterial	Mindestmenge	Probengefäß	Ergänzende Bemerkungen
Punktate, Aspirate und Gewebeproben				
Liquor	Liquor (Lumbalpunktion)	1 ml für Routine-Kulturen; ≥ 5 ml für Mykobakterien	Steriles Röhrchen mit fest schließendem Verschluss, Beimpfung von Blutkulturflaschen möglich	Nicht tiefgefrieren; umgehender Transport ins Labor
Körperflüssigkeiten	Aseptisch gewonnene Punktate oder Lavageflüssigkeiten	1 ml für Routine-Kulturen	Steriles Röhrchen mit fest schließendem Verschluss. Probenmaterial kann in der Spritze belassen werden, wenn diese vor dem Transport verschlossen wird	Für einige Flüssigkeiten (z. B. Peritoneallavage) sind größere Mengen bei zu erwartender niedriger Keimzahl hilfreich
Biopsate und Knochenmarkaspirate	Intraoperativ entnommene Gewebeproben, Knochen, antikoaguliertes Knochenmark, Biopate oder andere Proben von primär sterilen Bereichen	1 ml Flüssigkeit oder 1 g Gewebe	Steriles Abstrichröhrchen; sterile Flasche oder Gefäß für Gewebeproben	Akkurate Kennzeichnung von Probenart und Entnahmeort ist entscheidend. Ausreichend Material für mikrobiologische und histologische Untersuchungen gewinnen
Wunden	Eitriges Material oder Abszessinhalt ohne Kontamination durch Normalflora	2 Abstriche oder 0,5 ml aspirierter Eiter	Abstrich im Transportmedium oder steriles Röhrchen mit fest schließendem Schraubverschluss. Für die gleichzeitige Kultur von Anaerobiern Anaerobier-Transportgefäß oder verschlossene Spritze einschicken	Probengewinnung: Abszessinhalt oder andere Flüssigkeiten in einer Spritze (einem Abstrich vorzuziehen) einsenden, um eine ausreichende Probenmenge und anaerobe Bedingungen zu gewährleisten
Spezielle Empfehlungen				
Pilze	Oben aufgeführte Materialien können verwendet werden. Für Urin oder Sputum auf Pilze ist die erste Morgenprobe vorzuziehen	1 ml oder wie oben aufgeführt; größere Mengen können bei der Untersuchung auf Pilze im Urin sinnvoll sein	Sterile, auslaufsichere Behältnisse mit fest schließendem Deckel	Probengewinnung: Proben sollten innerhalb von 1 Stunde in das mikrobiologische Labor transportiert werden. Kontamination mit Normalflora von Haut, Rektum, Vaginaltrakt oder anderen Körperoberflächen vermeiden
Mykobakterien (säurefeste Stäbchen)	Sputum, Gewebe, Urin, Körperflüssigkeiten	10 ml Flüssigkeit oder kleine Gewebestücke. Abstriche sollten nicht verwendet werden	Sterile Behältnisse mit fest schließendem Deckel	Nachweis von Mycobacterium spp. wird durch Anreicherungstechniken verbessert. Abstriche und Kulturen aus Pleura-, Peritoneal- und Perikardflüssigkeit ergeben häufig eine geringe Ausbeute. Mehrere Kulturen vom selben Patienten sind anzuraten. Kultur in Flüssigmedien verkürzt die Zeit bis zum positiven Nachweis
Legionella	Pleuraflüssigkeit, Lungenbiopat, bronchoalveoläre Lavage, bronchiale/transbronchiale Biopsie	1 ml Flüssigkeit; Gewebestück jeglicher Größe, wobei ein 0,5-g-Stück wünschenswert wäre	Geeignetes steriles Behältnis	Schneller Transport zum Labor ist entscheidend
Anaerobier	Aspirate von Abszessen oder Körperflüssigkeiten	1 ml aspirierte Flüssigkeit, 1 g Gewebe oder 2 Abstriche	Ein geeignetes Anaerobier-Transportgefäß ist erforderlich ^a	Kulturen auf obligate Anaerobier immer durch Kulturen auf fakultative Anaerobier ergänzen; Gewebeproben oder Flüssigkeiten sind Abstrichen vorzuziehen
Viren ^f	Atemwegssekrete, Spülflüssigkeiten des Respirationstraktes, Nasenabstriche, Blutproben (einschließlich buffy coats), Vaginal- und Rektalabstriche, Abstriche von verdächtigen Hautläsionen, Stuhlproben (in einigen Fällen)	1 ml Flüssigkeit, 1 Abstrich oder 1 g Stuhl in jedem geeigneten Transportmedium	Flüssigkeitsproben oder Stuhl in sterilen Behältnissen oder Abstriche in Virustransportmedium (gekühlt, aber nicht gefroren) sind generell geeignet. Plasmaproben und buffy coats in sterilen Röhrchen bei 4–8 °C lagern; falls Versand oder längere Lagerung erforderlich, tiefgefrieren bei –80 °C	Transport meist in antibiotikahaltigen Medien, um bakterielle Überwucherung und Virusinaktivierung zu verhindern. Bei unverzüglichem Transport ins Labor Proben kühlen, aber nicht gefrieren. Verfahren und Transportmedien variieren je nach vermutetem Erreger und Transportdauer

^a Bei Erwachsenen zwei Kulturflaschen (kleinere Flaschen für pädiatrische Proben) beimpfen (1) aerob mit Dextrosephosphat, Soja-Trypton-Bouillon oder einer anderen geeigneten Bouillon und (2) anaerob mit Thioglykolat oder einer anderen Bouillon, die reduzierende Substanzen zur Isolation von obligaten Anaerobiern enthält. Bei Kindern, von denen nur begrenzte Blutvolumina gewonnen werden können, nur die aerobe Blutkulturflasche beimpfen, sofern nicht eine Sepsis durch Anaerobier vermutet wird (z. B. bei abdominalen Infektionen). Für spezielle Situationen (z. B. Verdacht auf Pilzinfektion, kulturnegative Endokarditis oder Sepsis durch Mykobakterien) stehen spezielle Blutkultursysteme zur Verfügung (Isolator-Systeme; siehe Tabelle).

^b Abnahme: Durchstichseptum der Blutkulturflasche und Punktionsstelle am Patienten gründlich desinfizieren. Eindringen von Luftblasen in die anaerobe Flasche unbedingt vermeiden. Auch die Belüftung der aeroben Blutkulturflaschen nach dem Beimpfen ist bei automatisierten Blutkultursystemen nicht mehr erforderlich und sollte gemäß den MiQ „Blutkulturdiagnostik“ wegen der Kontaminationsgefahr unterlassen werden.

Spezielle Anmerkungen: Es gibt keine wichtigere mikrobiologische Untersuchung als den Nachweis von Bakterien im Blut. Die schnelle Identifizierung von Bakterien oder Pilzen als Erreger bestimmt in entscheidendem Maße das Überleben des Patienten. Bakterien können im Blut kontinuierlich nachweisbar sein (wie bei Endokarditis, fulminanter Sepsis und frühen Stadien von Salmonellose und Brucellose) oder intermittierend (wie bei den meisten anderen bakteriellen Infektionen, bei denen Bakterien sporadisch in die Blutbahn ausgeschwemmt werden). Die meisten Blutkultursysteme bestehen aus 2 separaten Flaschen mit Flüssigmedium: Eine dient der Anzucht von aeroben und fakultativ anaeroben Keimen, die andere dem Nachweis von obligaten Anaerobiern. Bei Verdacht auf eine kontinuierliche Bakteriämie/Fungämie sollten vor Therapiebeginn 2 oder 3 Blutkulturen (jeweils aerob + anaerob) abgenommen werden; werden anspruchsvolle Keime vermutet, empfehlen sich weitere Abnahmen. Bei intermittierender Bakteriämie 2 oder 3 Blutkulturpärchen im Abstand von mindestens 1 Stunde während der ersten 24 Stunden abnehmen.

Tabelle 150e-3 (Fortsetzung)

^c Normalfloora beinhaltet alpha-hämolyisierende Streptokokken, saprophytische *Neisserien*, Coryneforme und *Staphylokokken*. Die aerobe (Routine-)Kultur von Rachenabstrichen umfasst das Screening auf beta-hämolyisierende Streptokokken und andere potenziell pathogene Keime. Fakultativ pathogene Keime wie *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae*, die auch in der normalen Schleimhautflora auftreten können, werden von den meisten Labors differenziert. Besteht Verdacht auf eine Infektion mit *Neisseria gonorrhoeae* oder *Corynebacterium diphtheriae*, sollte eine gezielte Anforderung erfolgen.

^d (1) Aus Mittelstrahlurin und Dauerkatheterurin isolierte Keime sollten nur bei einer signifikanten Bakteriurie (Keimzahl $\geq 100.000/\text{ml}$) und < 4 verschiedenen Spezies differenziert werden. Keine Dauerkatheterspitzen oder Urin aus dem Urinbeutel kulturell untersuchen. (2) Bei Untersuchung von Einmalkatheterurin, Blasenpunktionsurin und vergleichbaren Urinproben alle potenziell pathogenen Keime – unabhängig von der Koloniezahl – differenzieren und auf Antibiotika-Empfindlichkeit testen. (3) Der Nachweis von nur 1 Spezies typischer Uropathogene (z. B. Reinkultur von *Escherichia coli*) rechtfertigt die Differenzierung und Resistenztestung bereits bei einer Keimzahl von $\geq 1000/\text{ml}$, wenn eine entsprechende klinische Symptomatik vorliegt.

^e Aspire in verschlossenen Spritzen oder anderen Transportgefäßen, die die Sauerstoffexposition minimieren, sind für die Anzucht von obligaten Anaerobiern geeignet. Eine Reihe kommerziell hergestellter Transportgefäße steht zur Verfügung. Kontamination von Proben mit Standortflora von Haut, Rektum, Vagina oder anderen Körperregionen vermeiden. Inadäquate Probenbehälter für aerobe Kulturen (z. B. trockene Abstriche) und ungeeignete Materialien (wie gefrorene Proben, expektoriertes Sputum, Stuhl, Magensaft sowie Vagina-, Rachen-, Nasen- und Rektalabstriche) sollten zurückgewiesen werden.

^f Spezifische Erfordernisse vor Probenversand erfragen, da die Labors unterschiedliche Methoden zum Nachweis von Viren einsetzen.

Vermehrung von geringen Keimzahlen ermöglichen, können im positiven Fall auf Festmedien subkultiviert werden. Der generelle Einsatz von Flüssigmedien für alle Proben lohnt sich nicht.

Zur Isolierung von pathogenen Bakterien werden zwei grundlegende Strategien verfolgt. Eine Strategie besteht in der Verwendung von angereicherten Medien, die das Wachstum sämtlicher Bakterien fördern, die aus normalerweise sterilen Proben wie Blut oder Liquor angezüchtet werden können. Die zweite Strategie besteht im Einsatz von Selektivnährmedien, um gezielt bestimmte Bakterienspezies aus Stuhl, Genitalsekreten oder Sputum, die eine Vielzahl von Bakterien beherbergen, zu isolieren (hervorzuheben). Dabei werden antimikrobiell wirksame Stoffe oder andere hemmende Substanzen eingesetzt, um alle Bakterien, außer den gesuchten, im Wachstum zu unterdrücken. Nach Inkubation erfolgt die weitere Differenzierung der Keime, die auf diesen Medien gewachsen sind, um festzustellen, ob es sich um die gesuchten Erreger handelt (**Abb. 150e-1**).

BLUTKULTURAUTOMATEN

Der Nachweis mikrobieller Erreger im Blut ist schwierig, weil die Proben häufig eine geringe Keimzahl aufweisen. Ferner kann die Integrität der Keime sowie deren Vermehrungsfähigkeit durch humorale Abwehrmechanismen oder antimikrobielle Substanzen beeinträchtigt sein. Im Laufe der Zeit konnte das Nachweisverfahren durch den Einsatz von Systemen, die die Gasbildung (üblicherweise CO_2) von Bakterien und Hefen in Blutkulturmedien messen, automatisiert werden. Solche Methoden sind hinsichtlich der Detektion positiver Kulturen nicht sensitiver als das menschliche Auge; da jedoch die Flaschen in einem Blutkulturautomaten wesentlich häufiger geprüft werden, wird eine positive Kultur schneller entdeckt als mit manuellen Methoden. Wichtige Informationen, einschließlich Gram-Eigenschaften und vorläufiger Resistenztestung, sind so früher verfügbar.

Mehrere Faktoren beeinflussen die Nachweisrate aus Blutkulturen von Patienten mit Bakteriämie. Eine Erhöhung des getesteten Blutvolumens steigert die Chance einer positiven Kultur. Die Heraussetzung des Blutvolumens von 10 auf 20 ml erhöht den Anteil positiver Blutkulturen um etwa 30 %. Dieser Effekt ist jedoch weniger ausgeprägt bei Patienten mit bakterieller Endokarditis. Die Gewinnung mehrerer Kulturen (bis zu 3 pro 24-Stunden-Intervall) steigert ebenfalls die Chance eines Erregernachweises. Verlängerte Bebrütungszeiten und blinde Subkultur zum Nachweis von sehr anspruchsvollen Erregern (wie die Erreger der HACEK-Gruppe) sind bei Verwendung von Blutkulturautomaten nicht erforderlich.

Automatisierte Systeme werden auch bei anderen Materialien als Blut zum mikrobiellen Erregernachweis eingesetzt, beispielsweise bei Liquor-, Peritonealpunktat und anderen primär sterilen Materialien. Einige Automaten erlauben auch die Kultivierung von Mykobakterien, wenn geeignete Flüssigmedien verwendet werden. Obwohl Blutkulturautomaten beim Nachweis von Hefen und den meisten Bakterien sensitiver sind als das Lysis-Zentrifugation-Verfahren (Isolator), wird die Isolator-Blutkultur dennoch für Fadenpilze, *Histoplasma capsulatum* und einige anspruchsvolle Bakterien (*Legionella* spp. und *Bartonella* spp.) empfohlen.

IDENTIFIZIERUNGSMETHODEN

Wurden verdächtige Bakterien isoliert, dann kann aufgrund des Wachstums auf den Agarmedien (Koloniegröße, Farbe, Hämolyseverhalten, Geruch, Mikroskopie) eine bestimmte Spezies vermutet werden. Zur endgültigen Identifizierung sind zusätzliche Tests erforderlich. Die gebräuchlichste Differenzierungsmethode besteht nach wie

vor in der Prüfung biochemischer Eigenschaften. Darüber hinaus stehen anspruchsvollere Methoden wie die Massenspektrometrie, die Gaschromatografie und Nukleinsäurenachweise zur Verfügung.

■ KLASSISCHE PHÄNOTYPISIERUNG

Die klassische phänotypische Identifizierung von Bakterien umfasst die Untersuchung auf Protein- oder Kohlenhydrat-Antigene, Produktion spezifischer Enzyme, die Fähigkeit, spezifische Substrate und Kohlenstoffquellen (wie Kohlenhydrate) zu verstoffwechseln, oder die Produktion bestimmter Metaboliten. Für einige dieser Tests stehen Schnellverfahren zur Verfügung, womit viele der gängigen Keime schon nach 24-stündigem Wachstum identifiziert werden können. Andere Keime, insbesondere gramnegative Bakterien, erfordern eine eingehende manuelle oder automatisierte Testung.

Automatisierte Systeme erlauben eine schnelle phänotypische Identifizierung von bakteriellen Erregern. Die meisten Techniken zur Biovarbestimmung beruhen auf der Anzucht in mehreren Substraten. Dies ergibt ein Muster an Reaktionen, das mit den bekannten Reaktionsmustern verschiedener Bakterienspezies verglichen wird. Dieses Verfahren liefert relativ schnell ein Ergebnis. Kommerziell erhältliche Systeme umfassen miniaturisierte Fermentation, Kodierung der Ergebnisse zur vereinfachten Dokumentation und Wahrscheinlichkeitsberechnungen für die am ehesten zutreffende Erregerspezies. Wenn die Biovarbestimmung automatisiert erfolgt und der Ableseprozess mit der computerbasierten Analyse der Daten gekoppelt wird, können schnell wachsende Keime (wie Enterobacteriaceae) innerhalb von Stunden nach dem Wachstum auf Agarplatten identifiziert werden.

Verschiedene Systeme ermöglichen sogar eine noch schnellere Identifikation (innerhalb von 2–3 Stunden) durch Nutzung präformierter Enzyme. Solche Systeme stützen sich nicht auf das bakterielle Wachstum per se, um den Verbrauch eines bestimmten Substrates nachzuweisen. Sie arbeiten mit einem sehr dichten Inokulum, in dem spezifische bakterielle Enzyme in solchen Mengen vorhanden sind, dass diese ausreichen, um ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln. Einige Systeme nutzen fluoreszenzbasierte Nachweismethoden für Substrate bzw. Metaboliten, um so durch Signalverstärkung die Sensitivität zu erhöhen.

■ MATRIX-GESTÜTZTE LASER-DESORPTION/IONISATION MIT FLUGZEITANALYSATOR-MASSENSPEKTROMETRIE (MALDI-TOF-MS)

Vor einigen Jahren hielt eine neue Methode zur Keimdifferenzierung Einzug in die bakteriologische und mykologische Routinediagnostik: die Massenspektrometrie – MALDI-TOF-MS, ein Verfahren zur Proteomanalyse. Als Untersuchungsmaterial werden auf Festnährmedien angezüchtete Bakterien, Sprosspilze, Fadenpilze oder Dermatophyten in den Test eingesetzt. Darüber hinaus können positive Blutkulturen und Urine auch direkt analysiert werden. Im Vergleich zu klassischen Methoden der Phänotypisierung dauert die Analyse einer einzelnen Probe im Massenspektrometer durchschnittlich nur 6 Minuten. Zur Durchführung der Untersuchung wird eine geringe Erregermenge auf eine Probenplatte aufgebracht und mit einer Matrix-Lösung überschichtet. In der Messkammer des Massenspektrometers werden die Proben mit einem Laser beschossen und dabei explosionsartig verdampft und ionisiert. Die gemessene Flugzeit der Proteine bis zum Auftreffen auf einen Detektor variiert je nach Masse und Ionisierungsgrad der Proteine und Proteinbruchstücke. Für jeden Erreger ergibt sich ein charakteristisches Proteinspektrum, das mit Referenzspektren einer Datenbank verglichen wird. Danach erfolgt, wie bei den klassischen Methoden, anhand von Berechnungen die Zuordnung zur am wahrscheinlichsten zutreffenden Erregerspezies.

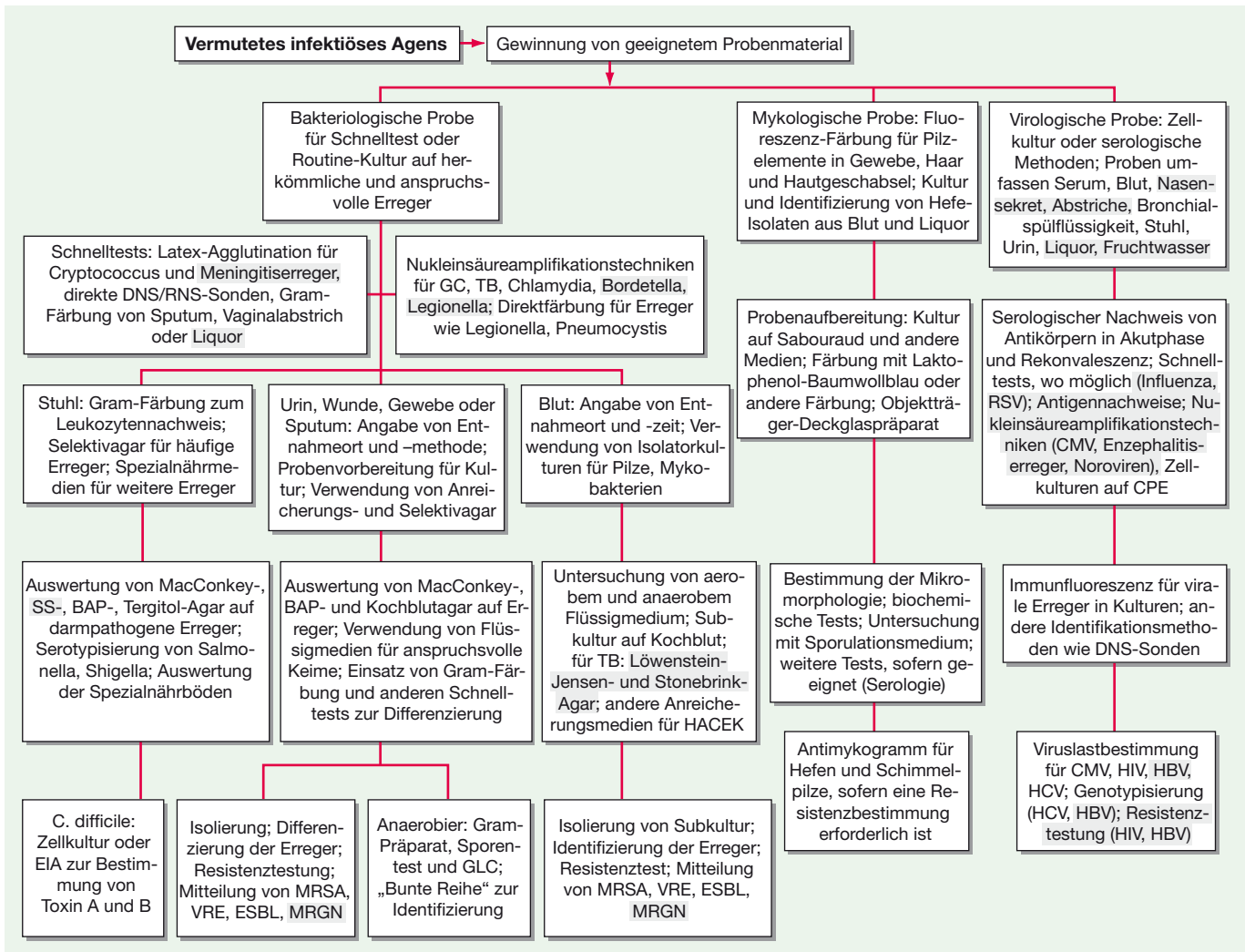


Abbildung 150e-1 Gebräuchliche Algorithmen zur Untersuchung von Proben in mikrobiologischen Labors. BAP = Blutagarplatte; CMV = Zytomegalievirus; CPE = zytopathischer Effekt; EIA = Enzymimmunoassay; ESBL = Extended-Spectrum-β-Laktamase; GBS = Gruppe-B-Streptokokken; GC = Neisseria gonorrhoeae; GLC= Gas-Flüssigkeitschromatografie; HACEK = Haemophilus aphrophilus/parainfluenzae/paraphrophilus; Aggregatibacter actinomycetemcomitans; Cardiobacterium hominis; Eikenella corrodens und Kingella kingae; HBV = Hepatitis-B-Virus; HCV = Hepatitis-C-Virus; HE = Hektoen enteric medium; HIV = Human Immunodeficiency Virus; MRSA = methicillinresistenter Staphylococcus aureus; RSV = Respiratory Syncytial Virus; TB = Mycobacterium tuberculosis; VRE = Vancomycin-resistente Enterokokken.

■ GAS-FLÜSSIGKEITS-CHROMATOGRAPHIE

Die Gas-Flüssigkeits-Chromatografie wird eingesetzt, um Stoffwechselprodukte des bakteriellen Fermentationsprozesses nachzuweisen. Verbreiteten Einsatz findet die Methode bei der Identifizierung von kurzkettigen Fettsäuren, die durch obligate Anaerobier während der Glukose-Fermentation gebildet werden. Da sich Arten und relative Konzentrationen von flüchtigen Säuren bei den verschiedenen Genera und Spezies dieser Keimgruppe unterscheiden, dient die so gewonnene Information als metabolischer „Fingerabdruck“ für ein spezielles Isolat.

Die Gas-Flüssigkeits-Chromatografie kann mit komplexen Softwaresystemen zur Signalanalyse gekoppelt werden, die der Identifikation und Quantifizierung von langkettigen Fettsäuren in den äußeren Membranen und Zellwänden von Bakterien und Pilzen dienen. Für jede Spezies sind die Arten von langkettigen Fettsäuren und deren relative Konzentrationen charakteristisch genug, um sogar eine Differenzierung eng verwandter Spezies zu erlauben. Erreger können so wenige Stunden nach ihrer Anzucht endgültig bestimmt werden.

■ NUKLEINSÄURETESTVERFAHREN

Techniken für den Nachweis und die Quantifizierung erregerspezifischer DNS und RNS in klinischen Proben sind ein empfindliches Werkzeug zur Diagnostik von bakteriellen, viralen, parasitären oder Pilzinfektionen. Nukleinsäuretestverfahren werden für vier verschiedene Zwecke genutzt: (1) für den Nachweis und gegebenenfalls die Quantifizierung spezifischer Pathogene in klinischen Proben, (2) für die Identifizierung von Mikroorganismen (üblicherweise Bakterien), die mithilfe konventioneller Methoden nur schwer oder nicht bestimmt werden können und (3), um im Rahmen epidemiologischer Fragestellungen den Verwandtschaftsgrad zweier oder mehrerer Iso-

late eines Erregers zu ermitteln, d. h., ob sie zum gleichen Stamm oder Klon gehören. Weiterhin (4) eignen sich Nukleinsäuretests zur Vorhersage der Empfindlichkeit von Mikroorganismen (bisher in erster Linie Viren, jedoch zunehmend auch Bakterien) gegenüber Chemotherapeutika. Die aktuell eingesetzte Technologie umfasst ein breites Spektrum an Methoden für die Amplifikation und Signaldetektion. Für viele Pathogene sind kommerziell hergestellte, auf der Basis der europäischen Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika CE-zertifizierte Methoden verfügbar, weiterhin finden „Inhouse“-Methoden je nach Spektrum des untersuchenden Labors Verwendung.

Der Einsatz von Nukleinsäurenachweisverfahren erfordert generell die Lyse intakter Zellen oder Virionen und die Denaturierung der freigesetzten DNS oder RNS in Einzelstränge. Gensonden bzw. Primer komplementär zur Zielsequenz des Pathogens werden mit der denaturierten Nukleinsäure der Probe, in Abhängigkeit von der Technologie, in Lösung oder auf einer Festphase hybridisiert. Eine In-situ-Hybridisierung zum Nachweis von Mikroorganismen in Gewebeproben ist ebenfalls möglich. Wenn die Hybridisierung der Gensonden oder Primer an die Zielsequenz (dem biologischen Signal) abgeschlossen ist, stehen verschiedene Methoden für den Nachweis, die Amplifikation und gegebenenfalls auch für die Quantifizierung des Komplexes aus Zielsequenz und Gensonde/Primer zur Verfügung (Abb. 150e-2).

Gensonden für den direkten Nachweis von Pathogenen in klinischen Proben

Gensonden werden für den Direktnachweis pathogener Mikroorganismen im Probenmaterial ohne vorherige Amplifikation der DNS- oder RNS-Zielsequenz eingesetzt. Bei diesen Tests wird eine relativ kurze, für das gesuchte Pathogen spezifische Nukleotidsequenz

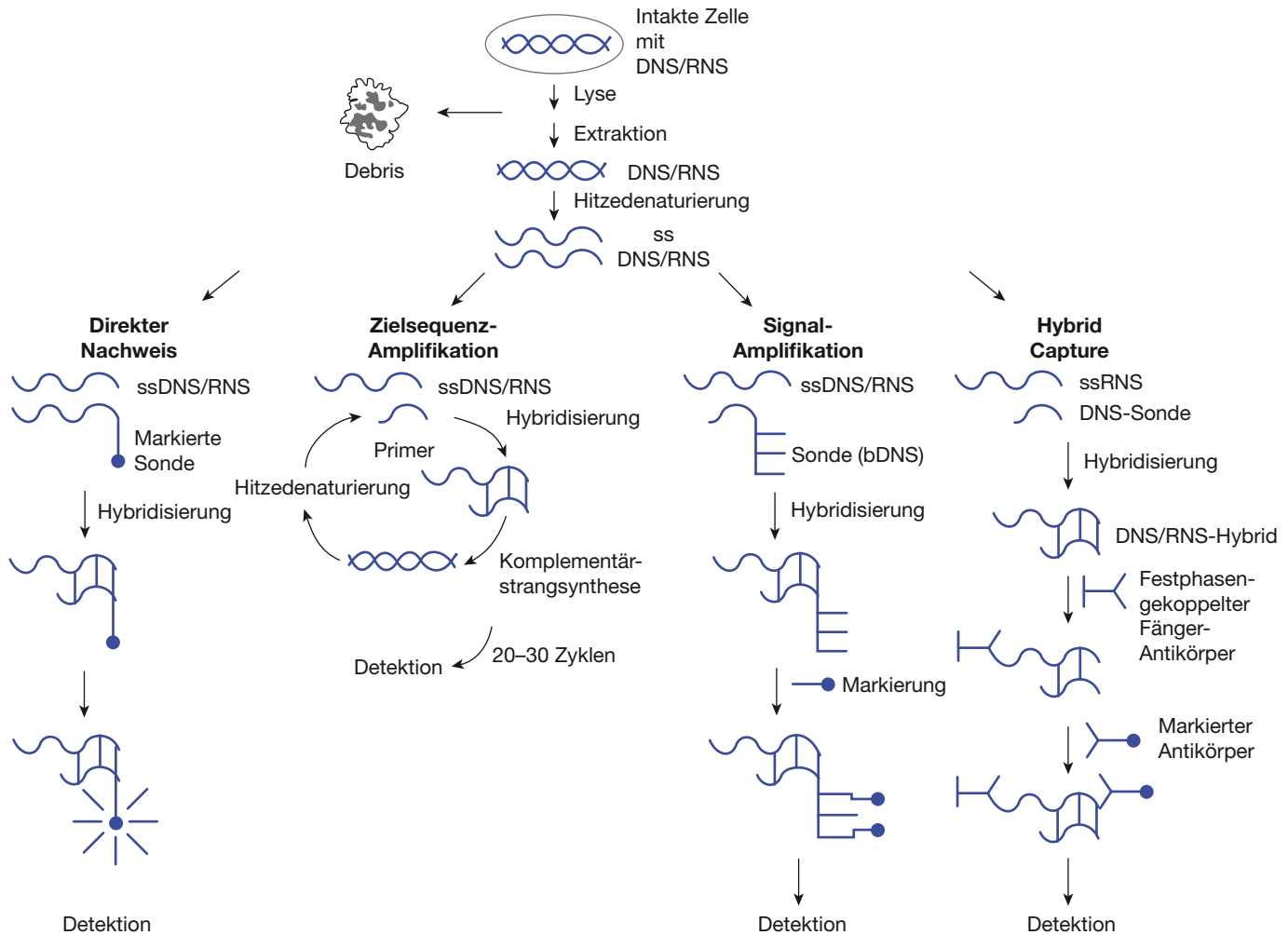


Abbildung 150e-2 Strategien für die Amplifikation und den Nachweis des Komplexes aus Zielsequenz und Gensonde. Aus Mikroorganismen extrahierte DNS oder RNS wird erhitzt, um einzelsträngige (ss) Nukleinsäure zu erzeugen, die die gesuchte Sequenz enthält. Diese Zielsequenz hybridisiert entweder direkt mit der markierten Gensonde (direkter Nachweis) oder wird über wiederholte Zyklen der Synthese eines komplementären Stranges (Polymerase-Kettenreaktion) vervielfältigt und schließlich über eine Markierung nachgewiesen. Bei der Branched-DNS-Methode (bDNS) bindet zunächst ein synthetischer DNS-Komplex an die Zielsequenz, im zweiten Schritt erfolgt die Signalverstärkung über die Hybridisierung einer großen Zahl markierter Oligonukleotide an repetitive Sequenzen der synthetischen DNS. DNS/RNS-Hybride werden mithilfe eines Fänger-Antikörpers an eine Festphase fixiert und konzentriert (Hybrid Capture) und anschließend mithilfe eines zweiten markierten Antikörpers detektiert.

nachgewiesen. Einzelsträngige DNS oder RNS hybridisiert mit einer komplementären Basensequenz (Gensonde), an die ein Reagens gekoppelt ist, das in einer Folgereaktion ein detektierbares Signal generiert. Ein kombinierter Test zum Nachweis und zur Differenzierung typischer Vaginitis- bzw. Vaginose-Erreger (*Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis* und *Candida spp.*) ist als CE-markiertes Produkt erhältlich. Daneben ist eine Auswahl von Sonden zur Bestätigung der Identität kultivierter Keime (z. B. dimorpher Pilze, *Mycobacterium spp.* und anderer Bakterien wie *Campylobacter spp.*, *Streptococcus spp.* und *Staphylococcus aureus*) verfügbar, in der Routine werden diese Sonden jedoch selten eingesetzt. Sonden für den direkten Nachweis von Bakterien zielen häufig auf hochkonservierte Sequenzabschnitte der 16S-ribosomalen RNS, von der sehr viel mehr Kopien in der Bakterienzelle vorliegen als von einer beliebigen genomischen DNS-Sequenz. Sensitivität und Spezifität der Gensondenassays sind vergleichbar mit traditionellen Methoden wie EIA und Kultur.

In einem alternativen Sondentest, dem Hybrid Capture Assay, hybridisiert eine RNA-Sonde mit einer DNS-Zielsequenz. Das resultierende DNS/RNS-Hybrid wird durch die Bindung an einen Antikörper spezifisch für DNS/RNS-Hybride an einer Festphase fixiert und konzentriert (eingefangen). Die Signaldetektion erfolgt mit einem zweiten Chemilumineszenz-markierten Antikörper, der ebenfalls mit DNS/RNS-Hybriden reagiert. Hybrid Capture Assays sind verfügbar für den Nachweis von *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* und humanen Papillomaviren. Manche Labors setzen eigene Gensonden für den Pathogennachweis ein, auch für diese „Inhouse“-Verfahren ist eine Validierung in Anlehnung an die Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika vorgeschrieben.

Nukleinsäureamplifikationstechniken

Mithilfe von Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAATs) gelingt es theoretisch, ein einziges Molekül der Zielsequenz zu einer nachweisbaren Menge zu vervielfältigen. Es existieren verschiedene Möglichkeiten der Nukleinsäureamplifikation: PCR, LCR, Strangersatz-Amplifikation und selbsterhaltende Sequenzreplikation (auch NAS-BA, Nucleic Acid Sequence based Amplification), von denen PCR-basierte Technologien mit Abstand am weitesten verbreitet sind. In jedem Fall hängt die exponentielle Vervielfältigung einer erregerspezifischen DNS- oder RNS-Sequenz von Oligonukleotiden (Primern) ab, die spezifisch mit der Zielsequenz hybridisieren. Die amplifizierte Nukleinsäure kann entweder am Ende der Reaktion oder bereits während des Amplifikationsprozesses (so genannte Real-Time-Verfahren) nachgewiesen werden. Die Sensitivität von NAATs ist sehr viel größer als die traditioneller Nachweismethoden wie der Kultur.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine dreistufige Kettenreaktion, bei der im ersten Schritt durch wiederholtes Erhitzen die beiden komplementären Stränge der DNS-Doppelhelix getrennt werden (Denaturierung), im zweiten Schritt die Primer an die Zielsequenz hybridisieren (Annealing) und schließlich im dritten Schritt die Synthese des komplementären Stranges erfolgt (Extension). Anschließend werden die PCR-Produkte über eine markierte Sonde detektiert. Moderne Methoden zum Monitoring des PCR-Prozesses nach jedem Amplifikationsschritt – entweder über den Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen in die DNS oder durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Gensonden mit der Fähigkeit zum Fluorescence Resonance Energy Transfer – haben die Zeit bis zum Vorliegen eines Ergebnisses erheblich verkürzt. Eine alternative Technologie basiert auf der transkriptionsvermittelten Amplifikation (TMA), bei der zunächst die gesuchte RNS in eine DNS umgeschrieben wird, von der dann die Transkripti-

on der RNA-Zielsequenz erfolgt. Die TMA erfordert im Unterschied zur PCR nur einen einzigen Zyklus aus Denaturierung und Annealing für die Amplifikation der Zielsequenz.

Die Identifizierung von mit anderen Methoden schwer bestimm- baren Bakterien beruht auf der Amplifikation einer hochkonservier- ten Region der 16S-rRNA mittels PCR. Nach anschließender automa- tischer Sequenzierung von mehreren hundert Basenpaaren wird die Sequenzinformation mithilfe einer Datenbank ausgewertet, die In- formationen tausender Spezies enthält. Die 16S-Sequenzierung ist weniger schnell als andere Verfahren und für den Routineeinsatz im mikrobiologischen Labor noch relativ teuer, dennoch entwickelt sie sich zur definitiven Bestimmungsmethode für ungewöhnliche und schwer kultivierbare Mikroorganismen.

Quantitative Nukleinsäurenachweisverfahren

Im Rahmen neuerer Therapieregime für die Behandlung von HIV- und CMV-Infektionen sowie der chronischen Virushepatitiden B und C ist es gängige Praxis, das Therapieansprechen und den Therapieerfolg über die Bestimmung der Viruslast zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn zu überprüfen. Daneben gehören die Genotypisierung für die Therapieplanung (HCV) sowie die Erfassung therapeeassoziiierter Mutationen (HIV, HBV) zum diagnostischen Standard. Quantitative NAATs sind kommerziell verfügbar für HIV (PCR), CMV (PCR), HBV (PCR), HCV (PCR und TMA) und für Epstein-Barr-Virus (PCR). Viele Labors nutzen zudem validierte „In-house“-Methoden zum quantitativen Nachweis dieser und anderer Pathogene.

Der Branched-DNS-Test (bDNS) ist eine Alternative zu NAATs für den quantitativen Nukleinsäurenachweis. Bei diesem Verfahren hybridisiert ein verzweigter synthetischer DNS-Komplex an die Zielsequenz, die zuvor über eine Fängersonde an das Reaktionsgefäß immobilisiert wurde. Die Signalverstärkung beruht auf der Bindung einer großen Zahl markierter Oligonukleotide an repetitive Sequenzen der synthetischen DNS und nachfolgender Detektion mittels Chemilumineszenz. Der Vorteil der bDNS-Methode gegenüber der PCR besteht darin, dass die Zielsequenz nicht amplifiziert wird und dadurch weniger Kontaminationsprobleme im Labor auftreten. bDNS-Assays sind verfügbar für die Viruslastbestimmung von HIV, HBV und HCV.

Anwendung von Nukleinsäuretestverfahren

Die Zahl kommerziell erhältlicher oder durch Labors entwickelter NAATs hat stark zugenommen und deckt ein breites Spektrum pathogener Mikroorganismen ab. Ebenso sind Multiplex-NAATs zum simultanen Nachweis mehrerer respiratorischer, gastrointestinaler oder urogenitaler Pathogene in einer Probe verfügbar. Neben den bereits erläuterten Anwendungen werden Nukleinsäuretests für den Nachweis und die Differenzierung schwer oder nicht kultivierbarer bakterieller Spezies, wie Mykobakterien, Legionellen, Ehrlichien, Rickettsien, Babesien, Borrelien und *Tropheryma whippelii*, eingesetzt. Darüber hinaus wurden Methoden für die schnelle Detektion von Organismen entwickelt, die bei einem möglichen Einsatz als Biowaffe eine ernste Gefahr für die Allgemeinheit darstellen. Dazu gehören *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, Pockenviren und *Yersinia pestis*. Bei durch neue Erreger oder Erregervarianten ausgelösten Epidemien stellen Nukleinsäuretestverfahren oft das einzige diagnostische Verfahren dar. Die Genome des SARS-Coronavirus, der neuen Influenza A/H1N1, von *Escherichia coli* O104:H4 (EHEC) oder des für die Epidemie von 2014/2015 verantwortlichen Ebolavirus waren innerhalb weniger Wochen nach Beginn der Ausbrüche entschlüsselt. Basierend auf diesen Erkenntnissen standen mit geringer Verzögerung schnelle und spezifische Nukleinsäureamplifikationstests in den Routinelabors zur Verfügung.

Nukleinsäure-basierte Verfahren kommen ebenfalls zum Einsatz, um den Verwandtschaftsgrad verschiedener Isolate derselben Erreger- spezies zu ermitteln. Treten gleichartige Infektionen bei mehreren Pa- tienten auf, zwischen denen ein epidemiologischer Zusammenhang vermutet wird (z. B. Behandlung in einer Gesundheitseinrichtung), so gilt der Nachweis der Klonalität der Isolate als Beweis für einen Aus- bruch. Die Pulsed-Field-Gel-Elektrophorese bleibt noch der Gold- standard für die Analyse von Bakterienstämmen. Diese Methode ba- siert auf dem Verdau der bakteriellen DNA durch selten schneidende Restriktionsenzyme. Daraus resultieren große DNS-Fragmente, die gelelektrophoretisch aufgetrennt und danach gefärbt werden. Die Pul- sed-Field-Elektrophorese arbeitet im Unterschied zu anderen Elektro-

phoresetechniken nicht mit einem zeitlich homogenen elektrischen Feld, sondern mit wechselnder Polarität, um die Auftrennung großer DNS-Fragmente im Bereich von 20 bis 50 kbp zu verbessern. Ähn- liche Bandenmuster (d. h. < 3 unterschiedliche Banden) sprechen für einen engen Verwandtschaftsgrad der Isolate oder für die Zugehörig- keit zu einem Klon. Einfachere Methoden der Stammtypisierung er- fassen die Sequenzierung einzelner oder mehrerer Gene oder die Am- plifikation repetitiver Sequenzen des bakteriellen Chromosoms mit- tels PCR. Das Whole Genome Sequencing wurde zur Untersuchung verschiedener epidemischer Ausbrüche eingesetzt, aber die Methode befindet sich derzeit noch in der Entwicklung.

Zukünftige Anwendungen molekularbiologischer Techniken wer- den wahrscheinlich konventionelle Kultur- und Identifizierungsver- fahren für viele pathogene Mikroorganismen ersetzen. Dazu gehören Chip-basierte Technologien, mit denen tausende spezifische Nuklein- säuresequenzen auf einem einzelnen Silikonchip nachgewiesen wer- den können. Moderne Methoden der Hochdurchsatzsequenzierung (Next Generation Sequencing = NGS) von in klinischen oder Um- weltproben enthaltenem genetischem Material machen es heute sogar möglich, in einem metagenomischen Ansatz bisher unbekannte Erre- ger als Auslöser von Erkrankungen zu identifizieren.

RESISTENZTESTUNG VON BAKTERIEN

Eine grundlegende Aufgabe des mikrobiologischen Labors besteht in der Prüfung der Antibiotikaempfindlichkeit eines speziellen Bakte- rienisolats. Solche Tests dienen in erster Linie der Optimierung der Antibiotikatherapie und spielen eine wesentliche Rolle bei der Kran- kenhaushygiene und epidemiologischen Überwachung multiresisten- ter Erreger, wie methicillinresistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), multiresistenter gramnegativer Stäbchen (MRGN) und vancomycin- resistenter *Enterococcus faecium* (VRE). Zwei Herangehensweisen sind üblich. Eine ist die qualitative Bewertung der Antibiotika-Em- pfindlichkeit mittels Einstufung in die Kategorien empfindlich, resis- tent oder intermediär. Dies kann erfolgen durch Aufbringen von anti- biotikage tränkten Blättchen auf eine Agaroberfläche, die zuvor mit dem zu testenden Bakterienstamm beimpft wurde (Agardiffusionstest nach Bauer-Kirby). Nach Bebrütung des Agars wird die Größe der Zonen (Hemmhöfe) ohne Bakterienwachstum um die Antibiotika- blättchen gemessen. Alternativ verwendet man Flüssigkulturen, die eine vorgegebene Antibiotikakonzentration enthalten (Breakpoint- Methode). Diese Methoden wurden sorgfältig gegen quantitative Me- thoden kalibriert. Die klinische Erfahrung mit jedem Antibiotikum sowie Hemmhofgrößen und Breakpoints wurden für jede Spezies er- mittelt. Die zweite Vorgehensweise besteht im Beimpfen einer Serie von Flüssigkulturen (oder Agarplatten), die steigende Antibiotikakon- zentrationen enthalten. Die niedrigste Antibiotikakonzentration, die in der Lage ist, sichtbares Wachstum zu hemmen, wird als *minimale Hemmkonzentration* (MHK) bezeichnet. Wird aus den nicht bewach- senen Röhrchen eine Subkultur angelegt, lässt sich die minimale An- tibiotikakonzentration bestimmen, die nötig ist, um 99,9 % des Aus- gangsinokulums abzutöten (*minimale bakterizide Konzentration*, MBK). Die MHK kann zur Interpretation in die Kategorien empfind- lich, resistent oder intermediär eingeordnet werden und ist daher ge- bräuchlicher als die MBK. Die quantitative Resistenztestung mit der Mikro-Bouillonverdünnungsmethode, einer miniaturisierten Version der Bouillonverdünnungsmethode in Mikrotiterplatten, ist automati- sierbar und wird häufig in größeren klinischen Labors eingesetzt.

Eine innovative Version des Agardiffusionstests arbeitet mit einem quantitativen Diffusionsgradienten oder Epsilometer (E-Test). Hierzu verwendet man saugfähige Streifen, auf die der Länge nach ein An- tibiotikum mit einem bekannten Gradienten aufgebracht wurde. Wenn der Streifen auf eine bakterienbeimpfte Agarplatte aufgebracht wird, diffundiert das Antibiotikum in das Agarmedium und hemmt das Bakterienwachstum. Die MHK wird als die niedrigste Konzentration bestimmt, die sichtbares Wachstum auf dem Agar hemmt.

Die Beurteilung der Ergebnisse der oben beschriebenen Testmetho- den erfolgt nach Bewertungskriterien, die vom European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), vom Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; vormalig NCCLS) oder anderen Breakpoint Committees festgelegt und jährlich überarbeitet werden.

Für einige Keime, wie obligate Anaerobier und einige β -hämolyse- rende Streptokokken, wird die Resistenztestung wegen der schwieri- gen Anzucht der Keime und der vorhersagbaren Antibiotikaempfind- lichkeit der meisten Isolate nicht routinemäßig durchgeführt.

Eine Alternative zur konventionellen Resistenztestung ist der Nachweis des Gens, welches für das die Antibiotikaresistenz vermittelnde Enzym kodiert. Die Untersuchung kann über Nukleinsäureamplifikationstechniken direkt aus der klinischen Probe durchgeführt werden. Hauptanwendungsgebiet dieser Technologie ist das MRSA-Screening, bei dem die *mecA*-Kassette im Genom von *Staphylococcus aureus* nachgewiesen wird. Gegenüber konventionellen Methoden ergibt sich eine erhebliche Zeitersparnis von 1–2 Tagen, was Krankenhäusern ermöglicht, ein Eingangsscreening bei Patienten von Schwerpunktstationen durchzuführen. Mit der zunehmenden Verbreitung multiresistenter Tuberkuloseerreger (MDR/XDR-TB) wurden auch Methoden zur genomischen Resistenztestung für *Mycobacterium-tuberculosis*-Isolate etabliert. Aufgrund der Komplexität bakterieller Resistenzmechanismen sind vergleichbare Methoden für andere Erreger bisher nicht Bestandteil der diagnostischen Routine.

■ RESISTENZTESTUNG VON PILZEN

Mit dem Aufkommen neuer Wirkstoffe zur Behandlung von Hefen und Erregern systemischer Mykosen entstand zunehmend die Notwendigkeit, individuelle Isolate auf deren Empfindlichkeit gegenüber

Antimykotika zu testen. In der Vergangenheit beteiligten sich nur wenige Labors an solchen Testungen, da es an Standardmethoden fehlte, wie sie für die Testung von Bakterien existieren. Inzwischen wurden jedoch einige Methoden für die Resistenztestung von Pilzen zugelassen. Diese Methoden, welche die *minimale fungizide Konzentration* (MFK) bestimmen, sind der Mikro-Bouillonverdünnungsmethode zur MHK-Bestimmung bei Bakterien vergleichbar. Der E-Test ist für die Resistenztestung von Hefen für Fluconazol, Itraconazol und Flucytosin zugelassen. Der herkömmliche Agardiffusionstest mit Antibiotikablättchen kann zur Resistenztestung von *Candida* spp. für Fluconazol und Voriconazol verwendet werden. Methoden zur Bestimmung der MFK für Pilze wie *Aspergillus* spp. sind technisch schwierig und die meisten klinischen Labors verweisen bei Anfragen an Referenzlabors.

■ TESTUNG AUF CHEMOTHERAPEUTIKARESISTENZ BEI VIREN

Siehe Kapitel 214e und 215e.