Medizinische Mikrobiologie

Kurs
Herbstsemester 2024

Kursleitung: Dr. B. Schulthess
Dr. F. Imkamp
PD Dr. S. Mancini
PD Dr. O. Nolte
Dr. H. Koliwer-Brandl

Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Egli

Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universität Zürich
Gloriastrasse 28/30
8006 Zürich
Tel. 044 634 27 00

E-Mail für Absenzen: schulthe@imm.uzh.ch

Kurskonzept gemäss Proff. em. Dr. E. C. Böttger / Dr. R. Zbinden

Zur Handhabung des Skripts

1. Bitte machen Sie sich mit den **allgemeinen Ausführungen und Tabellen** vertraut, so dass Sie dort immer wieder nachschlagen können.

   i) Mikrobiologische Färbungen
   ii) Kulturelle Untersuchungen
   iii) Liste der abgegebenen Dauerpräparate
   iv) Liste der Demonstrationskulturen
   v) Wichtige Identifizierungsmerkmale der bearbeiteten Erreger

2. Im Kursskript findet sich viel Platz für Ihre eigenen **Bemerkungen, Notizen und Zeichnungen**; bitte machen Sie von dieser Möglichkeit regen Gebrauch.
   Eigene Notizen und Zeichnungen fördern das Verständnis und sind eine wichtige Lern- und Erinnerungshilfe.

3. **Für eine erfolgreiche Teilnahme am Kurs ist zwingend notwendig, dass Sie sich auf den jeweiligen Kurstag vorbereiten und sich mit dem Ablauf des Kurstages vertraut machen; der Besuch der Kursvorlesungen hilft Ihnen dabei.**
   Ohne eine solche Vorbereitung wird es für Sie schwierig werden, dem Kurs zu folgen, vor allem weil zahlreiche Übungen aufgrund der notwendigen Inkubationszeiten verschachtelt an verschiedenen Tagen ablaufen.

Konzept und Zielvorstellung des Mikrobiologie-Kurses

Im Rahmen des Kurses sollen Sie sich mit den Grundlagen, Methoden und Indikationen der mikrobiologischen Diagnostik auseinandersetzen. Im Vordergrund steht die Durchführung eigener, auf Fallbeispiele bezogener Übungen, wobei Sie sich mit folgenden **praktischen Fertigkeiten** vertraut machen:

- **Bakteriologische Färbungen**
- **Mikroskopische Untersuchung**
- **Gewinnung von Untersuchungsmaterial**
- **Kulturelle Untersuchung von Probenmaterial**
- **Verarbeitung von Untersuchungsmaterial**
  - Nasenabstrich
  - Wundabstrich
  - Urinprobe
  - Stuhlprobe
  - Sputumprobe
  - Blutprobe
  - Liquorprobe
- **Wenige biochemische Stoffwechselleistungen**
- **Resistenzprüfung**

Achtung!!!
Am Kurstag 6 und 7 haben Sie die Gelegenheit, einen Eindruck von der mikrobiologischen Grundlagenforschung zu gewinnen <u>oder</u> eine Vertiefung der klassischen und modernen bakteriologischen Diagnostik wie PCR, MALDI-TOF MS und Automation zu erhalten.

Wir hoffen, dass diese Ausführungen Ihnen helfen, maximal vom Kurs zu profitieren, und wünschen Ihnen viel Spass.

Konzept und Zielvorstellung – Handhabung des Skripts

Kursübersicht

Arbeiten im bakteriologischen Laboratorium **1**

1 Mikroskopische Präparate **2**

1.1 Herstellung der Präparate 2
1.2 Färbung mit Methylenblau **(wird nicht selber durchgeführt)** 2
1.3 Färbung nach Gram 2
1.4 Färbung nach Ziehl-Neelsen **(wird nicht selber durchgeführt)** 3
1.5 Gebrauch des Mikroskopes Laborlux 11 4

2 Kulturelle Untersuchungen **6**

2.1 Feste Nährmedien / Agarplatten 6
2.2 Schrägagar – Röhrchen / Biochemische Agarröhrchen 7
2.3 Flüssige Nährmedien 8
2.4 Vereinfachter Identifizierungsalgorithmus 8

3 Im Kurs verwendete Medien **9**

4 Einführung Praktikum (Kurstage 1 und 2) **10**

4.1 Desinfektionsversuch (Daumenabdruck) 10
4.2 Luftkeimbestimmung 10
4.3 Nasenabstrich 11
4.4 Händedesinfektion 11

5 Wundinfektionen (Kurstage 1 – 3) **14**

5.1 Katalase-Test 15
5.2 Agglutination (β-hämolytische Streptokokken) 16
5.3 Clumping Faktor ("zellgebundene Koagulase") 16
5.4 Resistenzprüfung 17
5.5 *Leitsätze der Antibiotikatherapie 18
5.6 Praktikumsversuch 19
5.7 Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien („Das Antibiogramm“) 20

6 Urininfektionen (Kurstage 2-4) **22**

6.1 Entnahme von Mittelstrahlurin für die mikrobiologische Untersuchung 22
6.2 Keimzahlbestimmung 23
6.2.1 Eintauchnährböden 23
6.2.2 Kalibrierte Öse 24
6.3 *Identifikation von *Enterobacteriaceae* mit API 20E 24
6.4 Praktikumsversuch inclusive einfacher biochemischer Reaktionen 27
6.5 *Identifizierung von Bakterien mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) 29

* Diese Punkte werden am Tag 6 und 7 angeboten,
aber nicht für Besucher der Grundlagenforschung.

7 Resistenzplasmid-Transfer (Kurstage 3 und 4) **31**

7.1 Praktikumsversuch 32

8 Gastrointestinale Infektionen (Kurstage 2-4) **33**

8.1 Hektoen - Agar 34
8.2 Tetrathionat-Bouillon 34

8.3 TSI-Schrägagar / MIO-Röhrchen 34
8.4 *Polymerase – Kettenreaktion (PCR) 35
8.5 *DNA-Sequenzierung 36
8.6 *Bakterielle Breitspektrum PCR 36
8.7 *Real-Time PCR 36
8.8 *Line-Probe Assay 38
8.9 *Whole Genome Sequencing 38
8.10 Praktikumsversuch 39

9 Respiratorische Infekte (Kurstage 4 und 5) 40

9.1 Untersuchungsmaterialien 41
9.2 Praktikumsversuch 1 42
9.3 Praktikumsversuch 2 43

10 Sepsis (Kurstage 4 und 5) 44

10.1 Blutentnahme für Blutkulturen 44
10.2 Automatische Blutkultursysteme 44
10.3 Praktikumsversuch 46

11 Meningitis (Kurstag 5) 40

11.1 Untersuchungsmaterial und Diagnostik 41
11.2 Charakterisierung häufiger Erreger 42
11.3 Ammenwachstum 43
11.4 Praktikumsversuch 1

12 Mykobakteriosen (Kurstag 5) 50

12.1 Diagnostik – Traditionelle Methoden 51
12.2 Diagnostik – Molekulargenetische Methoden 51
12.2.1 Identifizierung von Mykobakterien 51
12.2.2 Direktnachweis von Mykobakterien im Patientenmaterial 53
12.3 DNA-Fingerprinting 53
12.4 Line-Probe Assay für den Resistenznachweis bei *Mycobacterium tuberculosis* 54
12.5 Praktikumsversuch 1 54
12.6 *Praktikumsversuch 2 55

13 Pilzinfektionen (Kurstage 4 und 5) 56

12.1 Untersuchungsmaterialien 58
12.2 Untersuchungsmethoden 59
12.3 Identifizierung von Hefen 59
12.4 Identifizierung von Schimmelpilzen 60
12.5 Praktikumsversuch 1 63
12.6 *Praktikumsversuch 2 64

* Diese Punkte werden am Tag 6 und 7 angeboten, aber nicht für Besucher der Grundlagenforschung.

Anhang 1: Liste der abgegebenen Dauerpräparate für die Mikroskopie

Anhang 2: Liste der Demonstrationskulturen

Anhang 3: Wichtige Identifizierungsmerkmale der bearbeiteten Erreger

Anhang 4: Auftragsformular des Instituts für Med. Mikrobiologie der Universität Zürich

Kurs Medizinische Mikrobiologie

Tag 1: Einführung / Wundinfektionen / Suche nach *Staphylococcus aureus* (Nase) 30. September - 03. Oktober 2024	Tag 2: Diagnostik Wundinfektionen / Urininfektionen / Stuhlbakteriologie 07. - 10. Oktober 2024	Tag 3: Plasmidversuch / Wundinfektionen / Urininfektionen / Stuhlbakteriologie 14. - 17. Oktober 2024

Theorie Tag 1 und 2 (Vorlesung am 30. September 2024, um 12:15)

Kursorganisation, Sicherheit im Kurs

Mikroskopie:
- Handhabung Mikroskop
- Färbeverfahren

Kultur:
- Medien (fest / flüssig, universell / selektiv)
- fraktioniertes Beimpfen

Untersuchungsgang Wundinfektion, Urin und Stuhl für bakterielle Erreger

Theorie Tag 3 (Vorlesung am 14. Oktober 2023, um 12:15)

Resistenz-Plasmid Versuch

Spezielle Harnwegsinfektionserreger und spezielle bakterielle Durchfallerreger

Händedesinfektion (Seite 11 und 12 / 13)

Händedesinfektion (Seite 11 und 12 / 13)

Einführung (Skript Kap. 4; Seite 10 und 11)
- Daumenabdruck vor / nach Desinfektion
- Luftkeimbestimmung (1x / Reihe)
- Eigener Nasenabstrich (Suche nach *Staphylococcus aureus*)

Einführung (Skript Kap. 4; Seite 10 und 11)
- Kolonien zählen
- Kolonien zählen und beurteilen
- *S. aureus* Resistenzprüfung ansetzen

Resistenz-Plasmidtransfer (Skript Kap. 7; Seite 31 und 32)
- Kontrollplatten beimpfen
- Empfänger- und Spenderbouillon zusammen pipettieren
- Platten nach Konjugation beimpfen

Wundabstrich (Skript Kap. 5; Seite 14-21)
- fraktioniertes Beimpfen auf Schafblutagar (SBA) und MacConkey-Agar (MAC)
- Gram-Präparat herstellen
- Mikroskopier-Einführung mit Demo-Präparaten
- Ausfüllen Auftragsformular

Wundabstrich (Skript Kap. 5; Seite 14-21)

Kulturen ablesen
- Staphylokokken: Katalase, Clumping Factor, "zellgebundene Koagulase", Gram-Dauerpräparat
- β-hämolysierende Streptokokken: Katalase, Agglutination Demo, Gram-Dauerpräparat
- Resistenzprüfung *S. aureus* ansetzen

Wundabstrich (Skript Kap. 5; Seite 14-21)
- Ablesen Resistenzprüfung Staphylokokken auch von dem Stamm von der Nase, falls positiv

Urin (Skript Kap. 6; Seite 22-30)
- Urin quantitativ ausstreichen
- Urin semiquantitativ beimpfen (Demo)

Urin (Skript Kap. 6; Seite 22-30)
- Kolonien zählen, Keimzahl berechnen
- Semiquantitative Keimzahlbestimmung im Urin
- Resistenzprüfung und einfache Biochemien ansetzen

Stuhluntersuchung (Skript Kap. 8; Seite 33-39)
- Fraktioniertes Beimpfen auf Hektoen-Agar und MAC
- Anreicherung beimpfen

Stuhluntersuchung (Skript Kap. 8; Seite 33-39)
- Beurteilung Hektoen-Agar und MAC, TSI Schrägagar beimpfen
- Subkultur der Anreicherung auf Hektoen-Agar und MAC

Kurs Medizinische Mikrobiologie

Tag 4: Sepsis / Respiratorische Infektionen Pilzinfektionen 21. - 24. Oktober 2023

Theorie Tag 4 (Vorlesung am 21. Oktober 2024, um 12:15)
Untersuchungsgang Blutkulturen und Sputum bei respiratorischen Infekten, Pilze

Resistenz-Plasmidtransfer (Skript Kap. 7; Seite 31 und 32)
- Beurteilen der Kontrollplatten
- Beurteilen der Platten nach der Konjugation mit selektierten Rekombinanten

Blutuntersuchung (Skript Kap. 10; Seite 44-46)
- Sepsis/Abimpfung Blutkulturen:
  - I: Patient mit akutem Abdomen
  - II: Endocarditis lenta

Mikroskopieren von vorbereiteten Gram-Präparaten von positiven Blutkulturen

Urin (Skript Kap. 6; Seite 22-30)
- Resistenzprüfung ablesen
- einfache biochem. Reaktionen ablesen

Stuhluntersuchung (Skript Kap. 8; Seite 33-39)
- Beurteilung TSI Schrägagar
- Beurteilung Hectoen-Agar und MacConkey aus der Anreicherung

Sputumuntersuchung (Skript Kap. 9; Seite 40-43)
- Gram-Färbung und Ansatz von Platten von 2 Sputen bei Patienten mit Verdacht auf Pneumonie und Cystische Fibrose
- Demo-Platte *Corynebacterium diphtheriae*

Mykologie (Skript Kap. 13; Seite 56-66)
- Vaginalabstrich: Gram-Färbung und CHROMagar beimpfen

Tag 5: Sepsis / Mykobakteriosen / Meningitis 28. Oktober - 31. Oktober 2024

Theorie Tag 5 (Vorlesung am 28. Oktober 2024, um 12:15)
Meningitis-Erreger, Diagnostik Mykobakterien

Liquoruntersuchung (Skript Kap. 11; Seite 47-49)
- Meningitis: Demo-Platten und Dauerpräparate von Meningitispatient

Blutuntersuchung (Skript Kap. 10; Seite 44-46)
- I: überimpfte Platten ablesen
- II: überimpfte Platten ablesen

→ Vergrünung der Kolonien auf Blutplatte beurteilen

Mykobakterien (Skript Kap. 12; Seite 50-55)
- Sputum von Patient: Präparat von Ziehl-Neelsen-Färbung
- Demo-Platten Mykobakterien

Fakultativ: Vorbereitung für vertiefte Diagnostik klinische Mikrobiologie
- Optionale eigene Untersuchungen auf resistente Bakterien oder auch andere Abstrich von Hund, Katze etc.
- Ansatz von Eintauchnährboden für Api 20 E

Sputumuntersuchung (Skript Kap. 9; Seite 40-43)
- Kulturen von Pneumonie-Erregern ablesen
- Kulturen beurteilen (Metallglanz, grünes Pigment)
- Demo-Platte Resistenz ablesen

Mykologie (Skript Kap. 13; Seite 56-66)
- CHROMagar beurteilen
- *Candida* spp.: Reisagar beurteilen

Tag 6 und 7: fakultativer Besuch der Grundlagenforschungsgruppen (6. und 13. November 2024) <u>oder</u> Führung durch die Diagnostiklabors (13. November 2024)

Grundlagenforschung (6. und 13. November 2024)
- Besuch bei einer Forschungsgruppe des Instituts für Med. Mikrobiologie, individuelle Anmeldung gemäss Aushang beim Kursraum

Führung durch die Diagnostiklabors (13. November 2024)
- Einblick in die moderne Bakteriologie – Automation ist der Schlüssel
- Das Neuste vom Neuen in der Molekulardiagnostik – Next Generation Sequencing
- Nationales Zentrum für Mykobakterien – Die Tuberkulose, eine alte Krankheit, aber ein aktuelles Problem!

1. Im **Kursraum** ist immer ein **Labormantel** (geschlossen) zu tragen, welcher zwischen den Kursen im Vorraum deponiert wird. Der Mantel darf nicht ins Spital mitgenommen werden. Bei Abschluss des Kurses soll dieser in einen Plastiksack verpackt nach Hause mitgenommen und direkt in die Waschmaschine gegeben werden (Waschtemperatur 95°C).

2. **Essen**, **Trinken** und **Rauchen** ist im Kursraum nicht erlaubt. Mit den Händen, welche möglicherweise kontaminiert sind, nicht ins Gesicht fassen. Bitte setzen Sie sich nicht auf die Labortische!

3. **Umgang mit infektiösem Material**:

- Kulturgefässe nicht offen stehen lassen
- Nie mit dem Mund pipettieren! Pipettierhilfen verwenden
- Bei **Kontamination** von Personen (Mund, Gesicht, Augen, Hände, etc.) oder Gegenständen (Kleidung, Arbeitsplatz) sofort eine Betreuungsperson informieren, damit geeignete Massnahmen ergriffen werden können
- Bei Bedarf, aber in jedem Fall am Ende eines Kurses, sind die Hände zu reinigen: zuerst mit 70% Alkohol desinfizieren; dann am Waschplatz (die Hände müssen trocken sein) waschen. Nur wenn die Hände sichtbar verschmutzt sind, die Hände vor der Desinfektion waschen
- Skript nicht als Arbeitsunterlage verwenden

4. **Arbeitsplatz**:
   Die Arbeitsplätze sind so eingerichtet, dass immer einzeln mitgearbeitet werden kann.
   Die Materialien auf dem Arbeitsplatz werden Ihnen jeweils erklärt.
   Bitte infektiöses Material in den Behälter für kontaminiertes Material (mit Plastiksack); aber nicht kontaminiertes Material (z.B. Papier) in den Behälter für normalen Abfall geben.

5. **Wir verzichten auf den Bunsenbrenner und benützen Plastikösen.**

6. Am **Ende jedes Kurstages**:

- Dauerpräparate reinigen (mit 70% Alkohol befeuchtetes Papiertüchlein verwenden)
- Präparate in Präparateschachtel versorgen und auf Vollständigkeit überprüfen
- Mikroskop: Beleuchtung ausschalten, Objektträgertisch und Immersionslinse mit Papiertüchlein (Kimberly) reinigen. Mikroskop auf dem Tisch stehen lassen, nur versorgen, wenn dies explizit gesagt wird
- Arbeitsplatz mit 70% Alkohol reinigen
- Händereinigung (siehe oben)

1. Herstellung der Präparate

- Pro klinisches Material wie eine Bakterienkolonie resp. eine Bakteriensuspension immer ein separates Präparat herstellen
- Objektträger mit Arbeitsplatznummerkleber versehen. Damit wird ersichtlich, auf welcher Seite das Material ist
- Präparat von Festmedium: 1 Öse Hahnenwasser auf Mitte des Objektträgers aufbringen, 1 Kolonie mit Öse aufnehmen, vom Rande ausgehend mit der Flüssigkeit gleichmässig verreiben und kreisförmig verteilen
- Präparat von Flüssigmedium: Öse in Flüssigmedium tauchen, Inhalt auf Mitte des Objektträgers geben und kreisförmig verteilen
- Präparat an der Luft trocknen lassen (nicht erhitzen!); Anschliessend **werden die Präparate in Methonal fixiert (1 Minute).**

2. Färbung mit Methylenblau (Demopräparat 4)

Prinzip: Einfache Anfärbung von Mikroorganismen und Zellen mit alkalischer Methylenblaulösung. Es können nur Grösse und Form von Strukturen unterschieden werden.

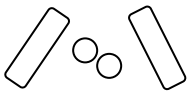
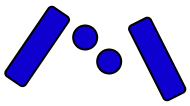
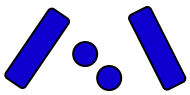
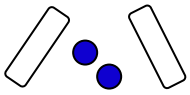
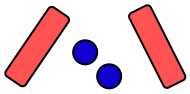
• Fixiertes Präparat mit Methylenblaulösung überschichten	30 - 60 Sekunden
• Abspülen mit Wasser	
• Trocknung mit Filterpapier (nicht reiben!)	

3. Färbung nach Gram

Prinzip: Doppelfärbung. Basische Anilinfarbstoffe bilden nach Beizung mit Jod Farbstoffkomplexe (blau), welche nur bei Gram-negativen (Murein einschichtig), nicht aber bei Gram-positiven (Murein mehrschichtig) mit Aceton-Alkohol wieder herausgelöst werden können. Gegenfärbung mit verdünnter Fuchsin- (oder Safranin-) Lösung (rot). Neben Form und Grösse lässt sich auch das Färbeverhalten beurteilen. Zellwandlose Bakterien werden nicht angefärbt.

• Fixiertes Präparat mit **Gentianaviolett** überschichten	**1 min**
• **Abspülen** der Farbe **mit H_2O** und **Überschichten** mit **Lugol'scher Lösung**	**2 min**
• **Entfärben mit Aceton-Alkohol** (auf Flaschenverschluss achten!)	bis Entfärbeflüssigkeit farblos, Objektträger schräg halten (oder kurz überschichten und dann erst Objektträger schräg halten)
• **Abspülen** mit Wasser	
• Mit verdünnter **Fuchsinlösung** überdecken	**30 sec**
• **Abspülen** mit Wasser	
• **Trocknen** mit Filterpapier **(nicht reiben)**	
• **Mikroskopieren** (Ölimmersion)	

- Schema Gram-Färbung:

	Bakterien/Untersuchungsmaterial auf Objektträger bringen und an der Luft trocknen lassen. Mit Methanol (oder Hitze) fixieren	Fixation der Mikroorganismen auf Objektträger
	Gentiana- oder Kristallviolett, 1 min	Alle Bakterien werden dunkelblau angefärbt
	Farbstoff wegkippen oder kurz mit Wasser abspülen; mit Lugol'scher Lösung (Jod) überschichten und 2 min belassen	Bindung des alkalischen Farbstoffes an die Zellwand
	Lugol'sche Lösung abkippen und mit Aceton/Alkohol so lange entfärben, wie Farbwolken weggespült werden. Sofort mit Wasser nachspülen. (Kurze Überschichtung mit Aceton/Alkohol und dann erst wie oben entfärben, spart Entfärbelösung)	Differentielle Entfärbung. Gram-positive Keime behalten die blaue Farbe, Gram-negative werden entfärbt
	Fuchsin (verd.) 30 sec, dann mit Wasser abspülen und trocknen	Gegenfärbung mit rotem Farbstoff, um auch die Gram-negativen Keime und zelluläre Strukturen sichtbar zu machen

4. Färbung nach Ziehl-Neelsen (wird nicht durchgeführt; Demo-Präparat 16)
GeneXpert für *Mycobacterium tuberculosis* – Komplex ist heute Alternative;
wird am Tag 6 demonstriert

Prinzip: Aufgrund ihrer Wachshülle (Mycolsäuren!) lassen sich Mykobakterien praktisch nicht nach Gram färben. Die erste Färbung erfolgt mit Phenol-Fuchsin, das bis kurz vor den Siedepunkt erhitzt wird. Dabei wird das Phenol-Fuchsin so fest verankert, dass es mit Salzsäure-Alkohol (Ethanol 96%, HCl 3%) nicht wieder entfernt werden kann ('Säurefestigkeit'). Am Schluss erfolgt die Gegenfärbung mit Methylenblau zur Anfärbung der entfärbten Strukturen (Kontrastverbesserung). Säurefeste Stäbchen sind rot (Karbolfuchsin), die Umgebung blau (Methylenblau). Eine Speziesdiagnose ist mit der Ziehl-Neelsen-Färbung nicht möglich.

- Objektträger auf umgekehrtes Färbegitter legen
- Ausstrich mit konzentrierter Ziehl-Neelsen Karbolfuchsinlösung bedecken
- Mit langen Zündhölzern (Alternative wäre Bunsenbrenner auf Sparflamme!) vorsichtig von unten her bis zur Dampfbildung erhitzen (nicht kochen!), bis phenolische Dämpfe auftreten
- 5 min einwirken lassen
- Abspülen mit Leitungswasser
- Entfärbung mit saurem Alkohol (**nicht** Aceton-Alkohol) bis keine Farbschlieren mehr sichtbar sind, dann 2 min einwirken lassen
- Abspülen mit Leitungswasser
- Gegenfärbung mit Methylenblau während 30 Sekunden
- Abspülen mit Leitungswasser und mit Filterpapier trocknen
- Mikroskopieren (Ölimmersion)

5. Gebrauch des Mikroskopes Laborlux 11

5.1 Hellfeld-Mikroskopie (Köhler-Beleuchtung):

- Beleuchtung einschalten (Knopf **1a**). Helligkeit auf Position 6 einstellen (Knopf **1b**)
- Objektträger (**2**) auf Objekttisch einspannen. Gewähltes Objektiv einschwenken; immer zuerst 10er Objektiv mit gelbem Ring benützen, um die Materialschicht zu finden. Kondensorring (**4**) auf Stellung H bringen. Objektstelle aufsuchen. Bildschärfe mit Grob- und Feintrieb einstellen (**3**). Falls wenig Material auf dem Objektträger vorhanden ist und die Materialschicht nicht gefunden wird, kann zuerst die Nummer des Arbeitsplatzklebers – oder ein Strich eines Filz-/Fettstiftes auf dem Objektträger - scharf eingestellt werden; anschliessend Objektträger mit Bedienungsknöpfen zur Kreuzverstellung so verschieben, dass das Material unter dem Objektiv zu liegen kommt
- Aperturblende (bei **4**) bis auf Position 8 oder bis zum Anschlag öffnen, wo PH steht
- Okularabstand (**5**) (horizontal) einstellen, so dass sich beide Bilder völlig überdecken. (Indexwert auf Frontplatte auf beide Okularstutzen übertragen. Anzahl Teilstriche rechts von 64 mm in Plus- und links von 64 mm in Minus-Teilstriche auf Okular übertragen).
  Bei Fehlsichtigkeit (kann auch bei Normalsichtigkeit angewendet werden) mit rechtem Auge durch rechtes Okular blicken und mit Feintrieb scharf stellen. Danach mit linkem Auge durch linkes Okular blicken und linken Okularstutzen so lange drehen, bis Objektstelle ebenfalls scharf; hierbei Feintrieb **nicht mehr** betätigen
- Leuchtfeldblende mit Rändel (**6**) schliessen. Kondensor H(**7**) in Höhe so verstellen, dass Leuchtfeldblende scharf erscheint - bei unseren Mikroskopen so weit nach oben wie möglich. Mit eingestelltem Objektiv 10 Leuchtfeldblende zentrieren (**6**). Leuchtfeldblende so weit öffnen, dass Leuchtfeldblende gerade hinter dem Sehfeldrand verschwindet. Muss für optimales Bild bei jedem Objektivwechsel vorgenommen werden (versuchen!)
- Allenfalls Bildkontrast durch Schliessen der Aperturblende (**4**) auf Position 6-8 optimieren. Zu starkes Schliessen der Aperturblende führt zu einer schlechteren Auflösung.
  Achtung: Die Helligkeit wird mit dem Knopf 1b reguliert, nicht mit der Aperturblende
- **WICHTIG:** Aufsuchen der Bildebene mit den Objektiven 40 und 100: Positionieren des Objekttisches mit Grobtrieb bis dicht an die Frontlinse des Objektivs; Kontrolle durch seitliches Blicken (NICHT durch Okular). Einstellen des exakten Arbeitsabstandes "Objektträger-Objektiv" durch Blicken durch das Okular hindurch und langsames WEGBEWEGEN des Objekttisches vom Objektiv.
  Trick: Wenn das Präparat mit dem 10er Objektiv bereits scharf ist, kann nach Einschwenken des 40er oder 100er Objektiv die Materialschicht mit dem Feintrieb einfacher gefunden werden; aber bevor das 100er Objektiv ganz eingeschwenkt wird, muss – **ohne Veränderung des Feintriebs** – ein Tropfen Immersionsöl auf den Objektträger gegeben werden, in welchem das 100er Objektiv dann „eintaucht"

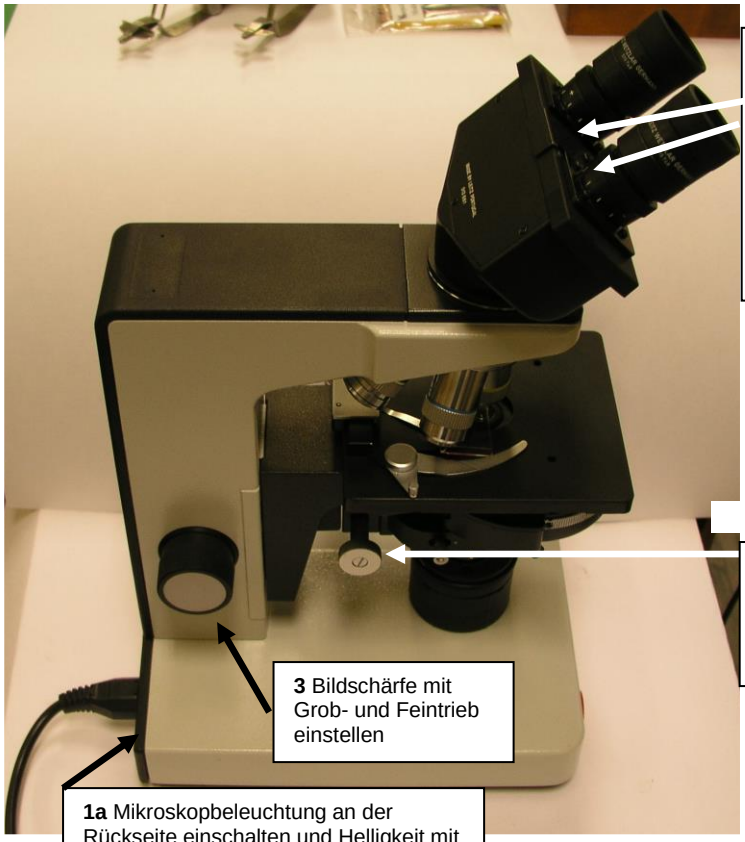
5.2. Phasenkontrast-Mikroskopie:

Die Objektive 40 (= Phaco 2) und 100 (= Phaco 3) können mit Kondensor 2 und Kondensor 3 für die Phasenkontrast-Mikroskopie verwendet werden (statt H für Hellfeld, steht 2 bzw. 3).

5.4. Pflege des Mikroskops:

Reinigen der Okulare und des Objekttisches mit Papiertüchlein (Kimberly); Öl von Demonstrationspräparaten ebenfalls abwischen. Kein organisches Lösungsmittel verwenden (auch nicht Alkohol). Diese gefährden die Halterung der Frontlinsen der Objektive. Alle optischen und mechanischen Teile sind säure- und basenempfindlich.

Achtung: Die Frontlinsen der Objektive 10 und 40 sind mit einem Kitt gekittet, der **nicht** ölresistent ist. Das führt dazu, dass die Frontlinse sich lockert, wenn das Objektiv mit Immersionsöl verschmutzt wird. Diese Objektive **dürfen auf keinen Fall ins Immersionsöl getaucht werden** (beim Objektivwechsel unbedingt beachten!).
Die 40er Objektive werden erst für die Pilzpräparate auf die Mikroskope aufgeschraubt.



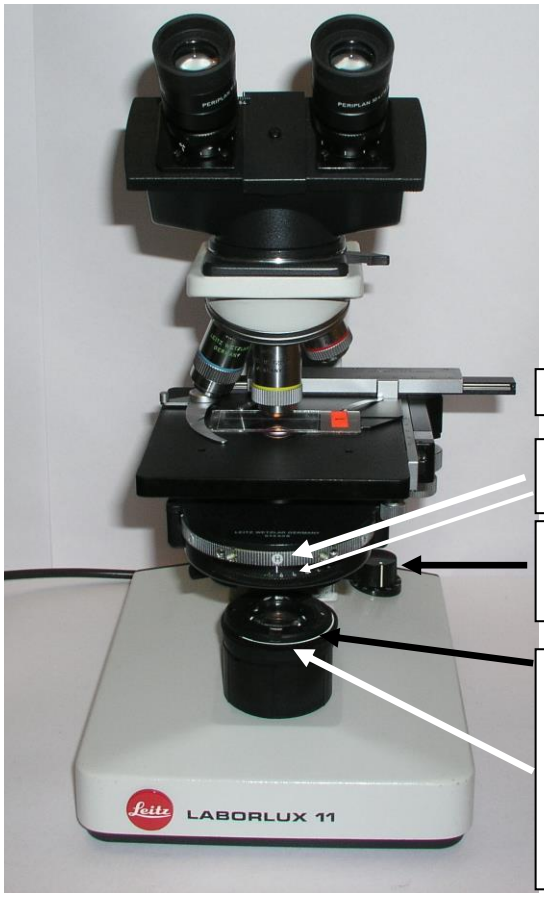
5 Okularabstand dem individuellen Augenabstand anpassen. Wert auf der Frontplatte
auf Okularstutzen übertragen.

Einfacher ist die Scharfstellung mit Feintrieb für das rechte Auge, anschliessend für das linke Auge (Feintrieb nicht mehr betätigen) unter Drehen des linken Okularstutzens.

7 Kondensor in der Höhe so verstellen (bei uns ganz nach oben), dass die Leuchtfeldblende beim Durchschauen durch Okular scharf erscheint.

3 Bildschärfe mit Grob- und Feintrieb einstellen

1a Mikroskopbeleuchtung an der Rückseite einschalten und Helligkeit mit dem Knopf 1b (siehe unten) einstellen.



2 Objektträger auflegen

4 Kondensorring auf Position H; Aperturblende öffnen (8 bis PH)

1b Helligkeit mit diesem Knopf einstellen. Position 6 zu Beginn, für 100er Objektiv heller einstellen.

6 Leuchtfeldblende durch Drehen am Rändel schliessen.
Nach Scharfstellen der Blende (siehe bei 7) Leuchtfeldblende zentrieren, indem mit Daumen und Zeigefinger die Blende verschoben wird.
Anschliessend Leuchtfeldblende so weit öffnen, bis man sie durch das Okular gerade nicht mehr sieht.

Die meisten (nicht alle!) medizinisch bedeutsamen Bakterien können in der Regel problemlos mittels künstlicher Nährmedien angezüchtet und anschliessend identifiziert werden. Dabei kommt eine Vielzahl verschiedener Medien mit den unterschiedlichsten Eigenschaften zum Einsatz. Folgende Prinzipien spielen eine wichtige Rolle:

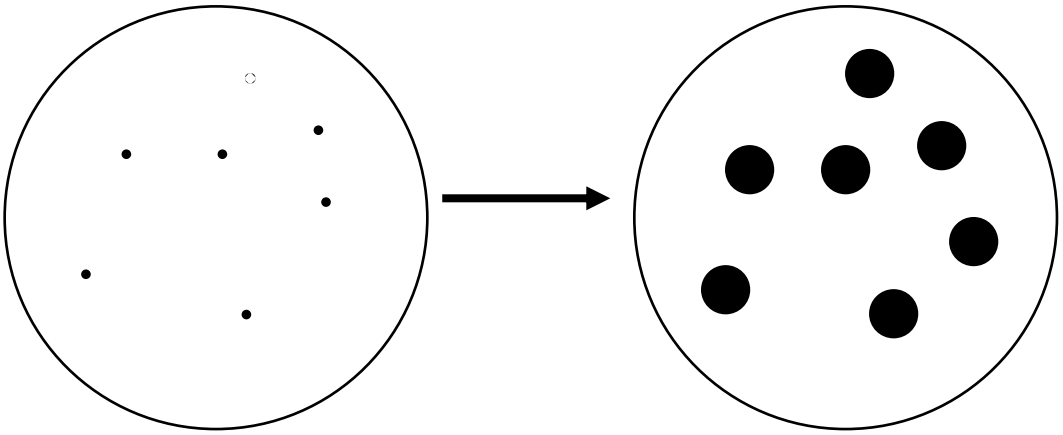
Allgemeines Nährmedium:	die meisten Bakterien können darauf problemlos wachsen, z.B. Blutagar
Selektivmedium:	nur bestimmte Bakteriengruppen wachsen, während andere unterdrückt werden, z.B. MacConkey Agar
Differentialnährmedium:	Verschiedene Bakterienarten zeigen unterschiedliche Morphologien, z.B. MacConkey Agar

Häufig finden sich Eigenschaften von einem Selektiv- und einem Differentialnährmedium kombiniert in einem Nährboden, z.B. MacConkey Agar (siehe folgende Seite)

Spezialmedien:	Einige Bakterienarten haben bezüglich Nährmedium ganz spezielle Anforderungen und wachsen nur nach Zugabe von Serum, Vitaminen oder anderen Stoffen. *Haemophilus influenzae* benötigt z.B. sowohl Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) als auch Haemin (siehe auch Kapitel 11)

1. Feste Nährmedien / Agarplatten

Aus jedem einzelnen Bakterium, das auf die Agarplatte gebracht wird, entsteht nach Bebrütung und entsprechender Vermehrung (Generationszeit von *Escherichia coli* ca. 20 Minuten) eine Kolonie. Bei Mischkulturen spiegelt die Anzahl der jeweiligen Kolonieformen auf einem nicht selektiven Medium in etwa das ursprüngliche Verhältnis der Bakterienarten im Untersuchungsmaterial wieder.



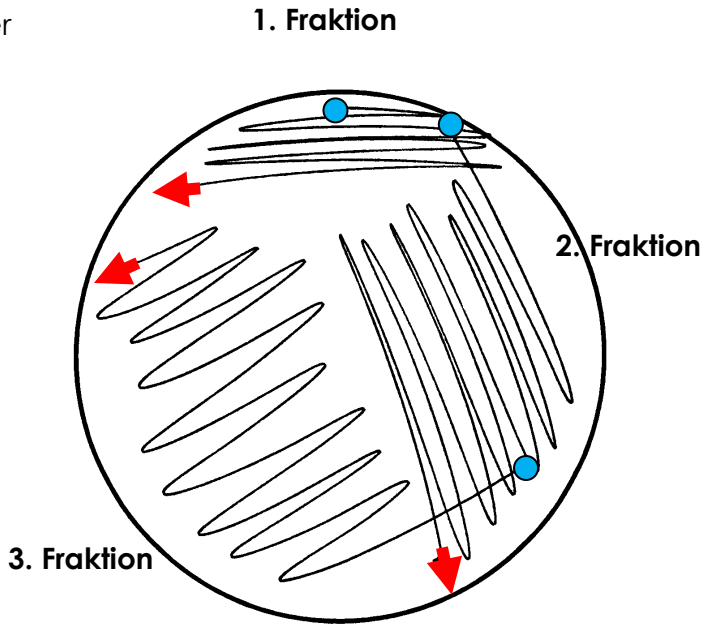
Je nach verwendetem Medium sehen die Kolonien der gewachsenen Bakterien sehr unterschiedlich aus. Eine genaue Beschreibung ist deshalb sehr hilfreich und umfasst folgende Aspekte:

- Grösse (z. B. stecknadelkopfgross)
- Form (z. B. rund, flach, halbkugelig)
- Oberfläche (z.B. rau, glatt, glänzend)
- Rand (z. B. glatt, gewellt, gezackt, fransig)
- Farbe (z. B. weiss, grau, gelb, milchig)
- Hämolyseform (keine, α- oder β-Hämolyse)

	1 Selektion	2 Differenzierung
Schafblutagar	keine	Hämolyse
MacConkey Agar	Gallensalze und Kristallviolett hemmen Gram-positive Keime	Lactose und Indikator (Neutralrot): die Säureproduktion durch den Abbau von Lactose wird durch eine Rotfärbung des pH-Indikators angezeigt

Durch fraktioniertes Beimpfen des Untersuchungsmaterials muss sichergestellt werden, dass Einzelkolonien entstehen, mit denen die weiteren Untersuchungen durchgeführt werden können:

- Mit Watteträger oder Öse etwa 1/6 der Agarplatte beimpfen (1. Fraktion)
- it der ausgeglühten Öse (oder Plastiköse) Material wie in Abbildung verteilen (2. Fraktion)
- (Öse ausglühen und erkalten lassen)
- Mit der gleichen Plastiköse Material weiterverteilen wie in Abbbildung (3. Fraktion)
- Für die Fraktionierung soll die ganze Agarfläche ausgenützt werden
- Beschriften der Platte auf dem Boden (nicht dem Deckel!) mit Gruppe, Arbeitsplatz, Untersuchungsmaterial; **die Inkubation erfolgt mit dem Deckel gegen unten (Kondenswasser)**
- Platten nach vorne bringen und in bereitgestellten Korb legen



Nach Bebrütung sollten, je nach Menge der Bakterien im Untersuchungsmaterial, spätestens in der 3. Fraktion Einzelkolonien vorhanden sein. Alle weiteren Untersuchungen erfolgen mit Einzelkolonien.

2. Schrägagar – Röhrchen / Biochemische Agarröhrchen

Werden vor allem bei der Identifizierung eingesetzt:

- Mit Plastiköse / -Nadel kleine Menge des Materials oder der Bakterienkolonie entnehmen
- Agarfläche in einer Wellenlinie vom unteren bis ganz zum oberen Rand der Schrägfläche beimpfen
- Bei einigen Untersuchungen muss zudem bis am Boden in die Agarsäule eingestochen werden (z. B. Beimpfung von TSI-Röhrchen). Dies sollte nur mit der Nadel durchgeführt werden
- Normale Biochemieröhrchen ohne Schrägfläche mit Nadel direkt bis auf den Boden in die Agarsäule einstechen
- Öse/Nadel entsorgen
- Röhrchen verschliessen

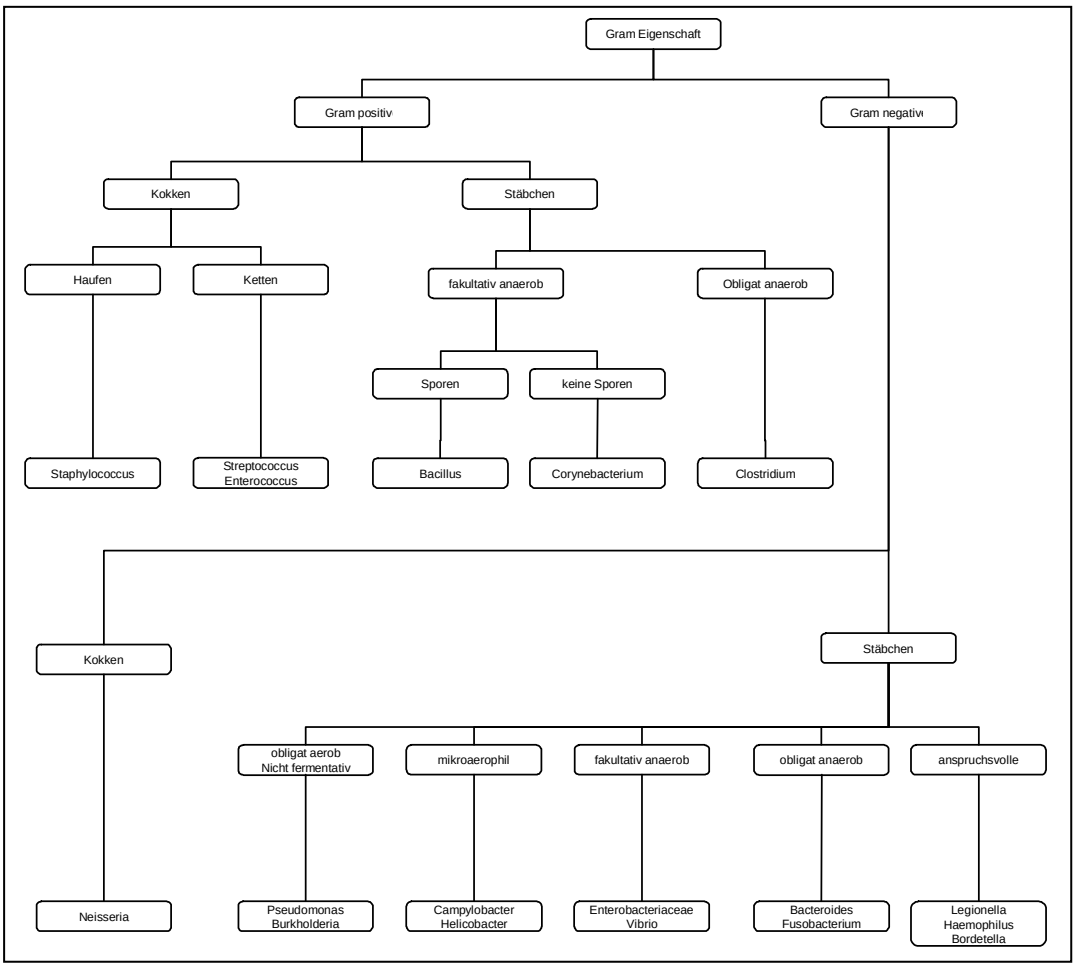
3. Flüssige Nährmedien

Flüssige Nährmedien dienen der Anreicherung von Bakterien. Dies kann mit allgemeinen Medien, aber auch mit Selektivmedien (z. B. Anreicherung von Salmonellen, siehe gastrointestinale Infektionen) erfolgen. Weil Bakterien unterschiedliche Generationszeiten besitzen, spiegelt die Zahl der Bakterien nach Bebrütung in keiner Weise die Zahlenverhältnisse im Untersuchungsmaterial wieder. Mit flüssigen Selektivmedien wird gerade dieser Effekt ausgenützt.

	Anzahl Bakterien nach Inkubation für				
Generationszeit Bakterien	**0 h**	1 h	2 h	3 h	**4 h**
Bakterium A: 30 min	**1**	4	16	64	**256**
Bakterium B: 60 min	**10**	20	40	80	**160**

Bereits nach 4 Stunden (normalerweise werden Kulturen während > 18 Stunden inkubiert) sind mehr Bakterien der Spezies A vorhanden als von Spezies B, obwohl im Ausgangsmaterial Bakterium B 10-mal häufiger war als Bakterium A.

4. Vereinfachter Identifizierungsalgorithmus



CHROMagar Candida (Seite 59)

Selektivmedium für Hefen, gleichzeitig Identifizierungsmedium für 3 *Candida* spp., welche sich durch Koloniemorphologie und Farbe unterscheiden.

CLED-Agar (Seite 23)

Nährstoffreiches Medium für die semiquantitative Keimzahlbestimmung aus Urin.

Enterokokken-Agar (Seite 23)

Selektivmedium für den Nachweis von Enterokokken (meist im Urin). Enterokokken zeigen schwarz gefärbte Kolonien.

Hektoen-Agar (Seite 34)

Selektiv- und Differentialnährmedium für den Nachweis von Salmonellen und Shigellen. Gegenüber MacConkey-Agar erhöhte Gallensalzkonzentration führt zur Hemmung von vielen Enterobakterien. Nachweis des Lactose- und Saccharose-Abbaues sowie der Produktion von H_2S.

MacConkey-Agar (Seite 7)

Medium für den Nachweis von Gram-negativen Stäbchenbakterien, v.a. *Enterobacteriaceae*, weil Gram-positive Keime durch die vorhandenen Gallensalze gehemmt werden. Beurteilung des Abbaus von Lactose.

Middlebrook 7H10-Agar (Seite 55)

Nährstoffreiches, nicht-selektives Medium für die Anzucht von Mykobakterien.

Müller-Hinton-Agar (Seite 17)

Standardmedium für die Durchführung des Agardiffusionstests zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber Antibiotika.

Reisagar (Seite 59)

Nährstoffarmes Medium, auf welchem verschiedene Candida-Arten eine typische Mikromorphologie zeigen (Myzel, Sprosszellen, Chlamydosporen)

Sabouraud-Agar (Seite 59)

Selektivmedium mit Gentamicin und Chloramphenicol für den Nachweis von Pilzen (Hefen, Schimmelpilze)

Schafblutagar (Seite 7)

Allgemeines Nährmedium mit Blutzusatz, auf welchem die meisten Bakterien gut wachsen können. Unterscheidung verschiedener Hämolyseformen.

Schoggi-Agar (Seite 48)

Kochblutagar. Allgemeines Nährmedium, auf welchem dank der aus den Blutzellen freigesetzten Stoffen (z.B. NADH, Hämin) auch anspruchsvolle Organismen wie *Neisseria* sp. oder *Haemophilus* sp. wachsen können.

Tetrathionat-Bouillon (Seite 34)

Selektivbouillon zur Anreicherung von Salmonellen aus Stuhlproben. Hemmt die meisten anderen *Enterobacteriaceae*.

TSI-Schrägagar (Seite 34)

Drei-Zucker-Eisenagar, welcher gleichzeitig den Nachweis des Abbaues von Glucose, Saccharose und Lactose sowie die Bildung von H_2S und Gas erlaubt.

1. Desinfektionsversuch (Daumenabdruck)

Untersuchung der Bakterienflora auf der Haut vor und nach Desinfektion.

Tag 1	- Daumenabdruck links und rechts auf einer Hälfte der Blutagarplatte - Hände mit 70% Alkohol desinfizieren (siehe **Seiten 12/13**) - Daumenabdruck links und rechts auf der anderen Hälfte der Blutagarplatte - Platte beschriften und zur Bebrütung nach vorne bringen	
Tag 2	- Beurteilung Bakterien vor und nach Desinfektion - Anzahl Kolonien? Koloniemorphologie?	
	vor Desinfektion	nach Desinfektion

2. Luftkeimbestimmung

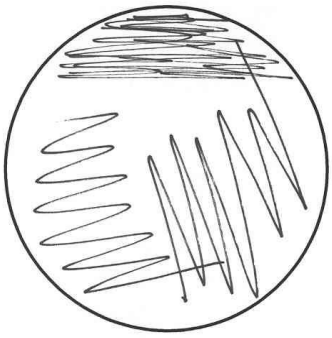
Erfassung von Bakterien in der Raumluft

Tag 1	- 3 Blutagarplatten nebeneinander offen auf den Tisch legen - nach 15, 30 und 60 Minuten jeweils eine Platte schliessen und beschriften - alle Platten zusammen nach vorne bringen zur Bebrütung		
Tag 2	- Beurteilung Bakterien zu den verschiedenen Zeitpunkten - Anzahl Kolonien? Koloniemorphologie?		
	15 Minuten	30 Minuten	60 Minuten

3. Nasenabstrich (einen pro Person)

Bei der Normalbevölkerung kann die Nase (aber auch andere Orte) bis zu 30% mit *Staphylococcus aureus* besiedelt sein. Dieses Reservoir ist epidemiologisch wichtig, da Träger einem grösseren Infektionsrisiko mit diesem Keim ausgesetzt sind als Nicht-Träger. Speziell wichtig ist die Elimination von solchen Reservoiren bei Auftreten von Methicillin-resistenten *S. aureus* (abgekürzt MRSA) im Spital.

Charakterisierung von *S. aureus*:
- weisse bis gelbe Kolonien
- β-hämolytisch
- Katalase positiv
- Koagulase (freie Koagulase, nur Demo) positiv
- Clumping Factor („Zellgebundene Koagulase") positiv

Tag 1	- Sich selbst einen Nasenabstrich abnehmen (Watteträger in NaCl leicht anfeuchten, in Nasenöffnung einführen und an verschiedenen Stellen der Nasenwand unter leichter Drehung Abstrich entnehmen) - Abstrich jeweils auf 1 Schafblutplatte fraktioniert ausstreichen (Watteträger abrollen, dann mit der ausgeglühten Öse bzw. Plastiköse die 2. und die 3. Fraktion anfertigen) 
Tag 2	- Beurteilung der normalen Nasenflora - β-hämolytische Keime vorhanden? Wenn ja, Platten einem Kursbetreuer zeigen - Gramfärbung, Katalase- und Clumping Factor-Testung von verdächtigen Kolonien

4. Händedesinfektion

- Desinfektionsmittel in die hohlen, trockenen Hände geben
- Gemäss Anleitung (**Seite 12**) Desinfektionsmittel während 30 Sekunden gründlich einreiben. Hände müssen die ganze Einreibezeit feucht bleiben (im Bedarfsfall erneut Desinfektionsmittel entnehmen!)
- Unter der UV-Lampe überprüfen, ob alle Bereiche der Hände desinfiziert wurden

BODE

Hände-Desinfektion

Standard-Einreibemethode für die hygienische Hände-Desinfektion gem. EN 1500

1. Schritt:
Handfläche auf Handfläche

Achtung: Inklusive Handgelenk

2. Schritt:
Rechte Handfläche über linkem Handrücken und linke Handfläche über rechtem Handrücken

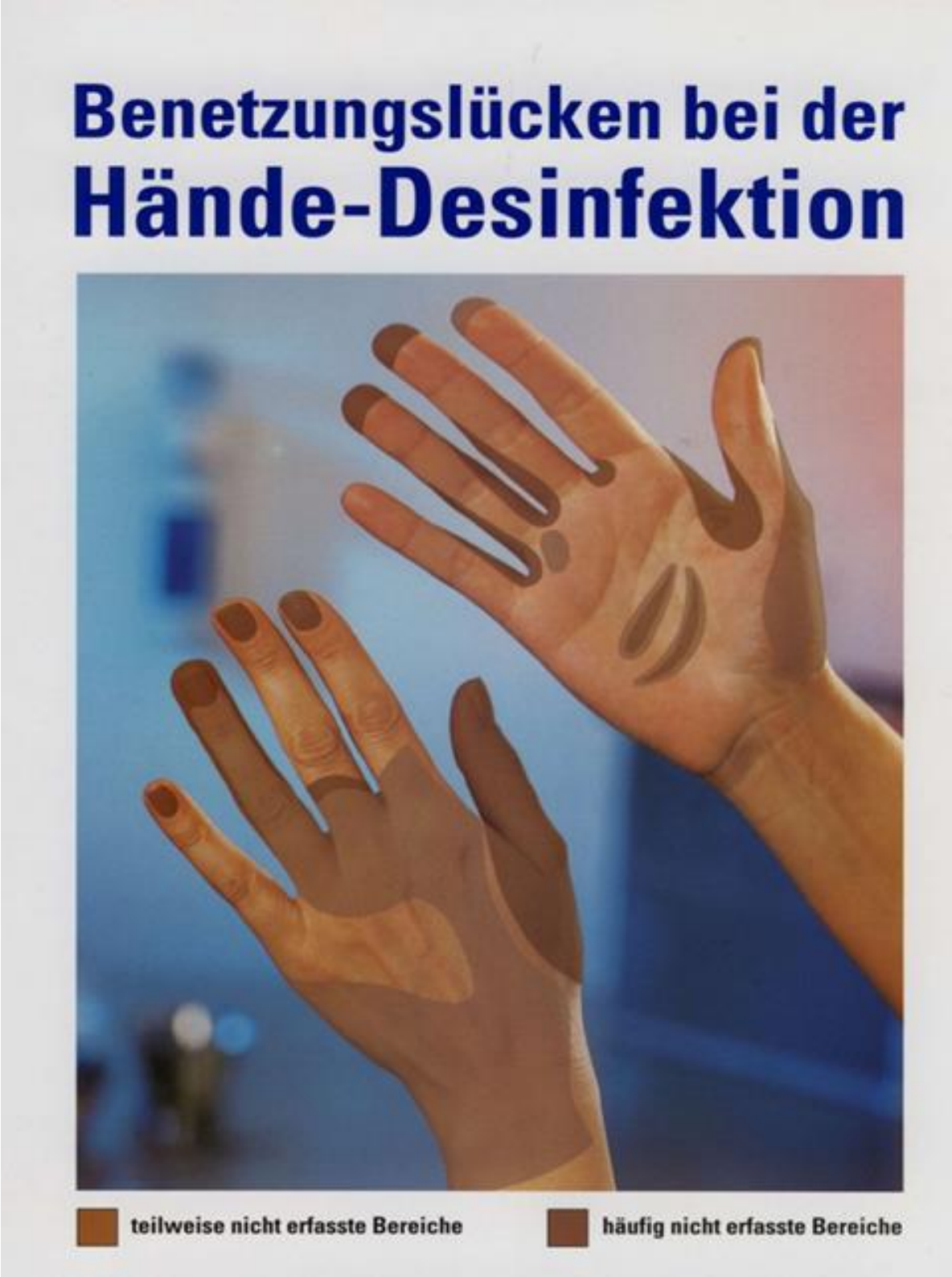
3. Schritt:
Handfläche auf Handfläche mit verschränkten, gespreizten Fingern

4. Schritt:
Außenseite der Finger auf gegenüberliegende Handflächen mit verschränkten Fingern

5. Schritt:
Kreisendes Reiben des rechten Daumens in der geschlossenen linken Handfläche und umgekehrt

6. Schritt:
Kreisendes Reiben hin und her mit geschlossenen Fingerkuppen der rechten Hand in der linken Handfläche und umgekehrt

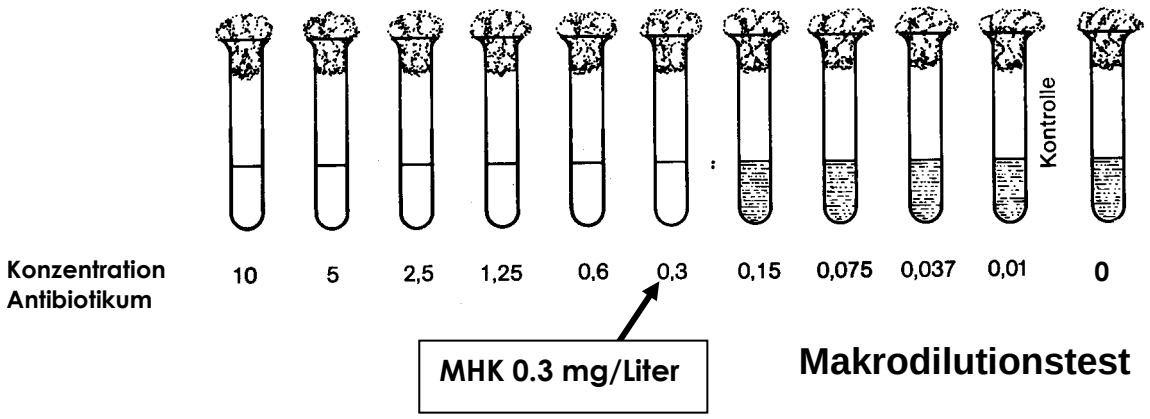
Desinfektionsmittel in die trockenen Hände geben. Nach dem oben aufgeführten Verfahren das Produkt 30 Sek. in die Hände bis zu den Handgelenken kräftig einreiben. Die Bewegungen jedes Schrittes fünfmal durchführen. Nach Beendigung des 6. Schrittes werden einzelne Schritte bis zur angegebenen Einreibedauer wiederholt. Darauf achten, dass die Hände die gesamte Einreibezeit feucht bleiben. Im Bedarfsfall erneut Hände-Desinfektionsmittel entnehmen.


Benetzungslücken bei der
Hände-Desinfektion
teilweise nicht erfasste Bereiche
häufig nicht erfasste Bereiche

Wundinfektionen werden am häufigsten durch Gram-positive Kokken wie *Staphylococcus aureus* oder β-hämolytische Streptokokken insbesondere der Gruppe A (*Streptococcus pyogenes*), seltener durch Gram-negative Keime verursacht. Bei tiefen Wunden sind auch Anaerobier in Betracht zu ziehen.

Zur Ermittlung der **in vitro-Empfindlichkeit** eines Bakteriums gegen ein Antibiotikum wird der Erreger in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz kultiviert, und es wird registriert, welche Wirkstoffkonzentration im Nährmedium erforderlich ist, um seine Vermehrung zu hemmen. Dies kann auf festen oder in flüssigen Nährmedien erfolgen.

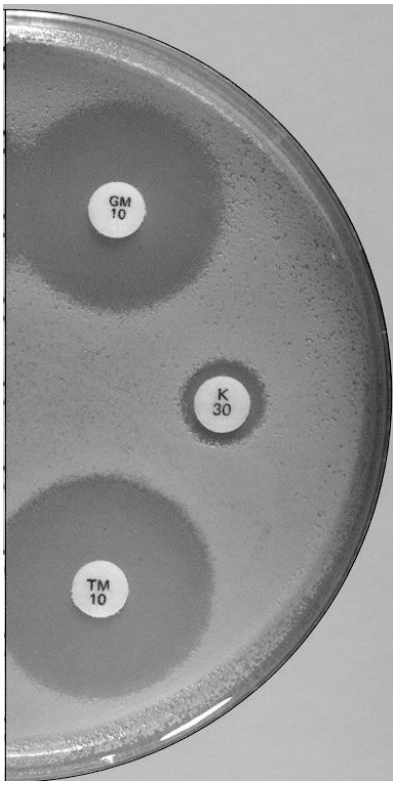
Als **Standard** gilt der **Reihenverdünnungstest** in flüssigem Nährmedium in Reagenzröhrchen (Makrodilutionstest) oder in Mikrotiterplatten (Mikrodilutionstest). Die minimale Hemmkonzentration (MHK) entspricht derjenigen Wirksubstanzkonzentration, bei welcher sich der zu testende Organismus gerade nicht mehr vermehren kann.

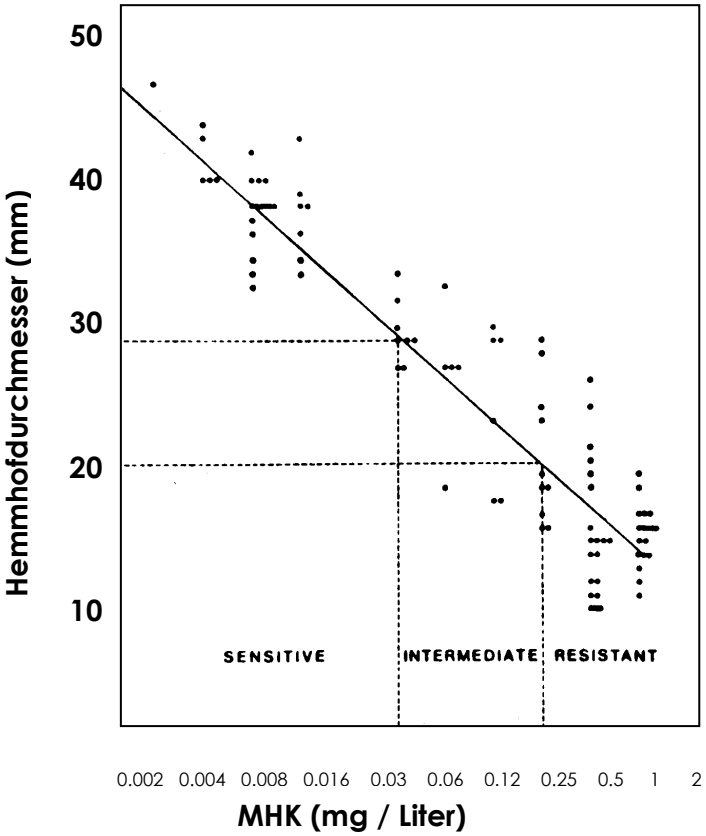


Das Prinzip des **Agardiffusionstests** beruht darauf, dass das zu testende Antibiotikum aus einem Trägermaterial (üblicherweise Papierblättchen) in den Agar diffundiert, der homogen mit dem zu testenden Erreger beimpft ist. Die Konzentration des Wirkstoffes nimmt kontinuierlich mit der Diffusionsstrecke ab. Parallel zu diesem Vorgang wachsen die Bakterien zu Kolonien aus. Um das Testblättchen herum sind sie dabei einem Konzentrationsgradienten ausgesetzt. Je empfindlicher nun der zu testende Stamm ist, umso grösser bleibt die wachstumsfreie Zone, die üblicherweise als Hemmhof bezeichnet wird. Hochresistente Bakterien wachsen bis an das Testblättchen heran.

Die Hemmhofgrösse wird beeinflusst durch:

- die chemisch-physikalischen Eigenschaften des Antibiotikums und des Testmilieus, welche die Diffusionsgeschwindigkeit in den Agar bestimmen
- die Wachstumsgeschwindigkeit und Empfindlichkeit des Keimes gegenüber der Testsubstanz
- die Dichte des Inokulums





Die Hemmhofdurchmesser werden mit Hilfe einer Regressionsanalyse definiert und den Kategorien „sensibel“, „mässig sensibel“ (oder „intermediär“) und „resistent“ zugeordnet (s. S. 20). Dazu werden für zahlreiche Stämme, die ein möglichst gleichartiges Wachstumsverhalten zeigen sollten, parallel die MHK-Werte und die Hemmhofdurchmesser bestimmt. Die Abbildung links zeigt eine solche Regressionsanalyse.

1. Katalase – Test

Durch das Enzym Katalase wird H_2O_2 in H_2O und O_2 umgewandelt und es tritt Bläschenbildung auf.

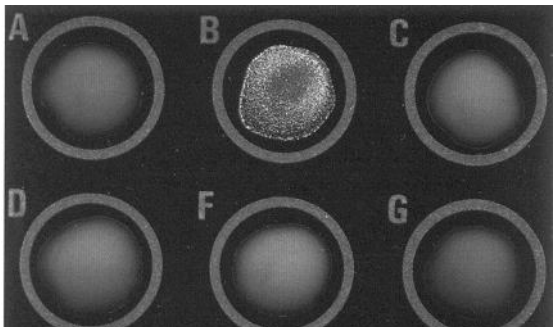
- 1 Kolonie mit Öse auf einen Objektträger geben
- H_2O_2 auftropfen
- Bildung von Gasbläschen zeigt die Bildung von O_2 an (= positiver Test)
- Immer negative Kontrolle mitlaufen lassen (Streptokokken)

Positiv: Staphylokokken Negativ: Streptokokken

2. Agglutination (β-hämolytische Streptokokken)
Demo

Identifikation von Gruppe-A-Streptokokken durch Agglutination mit spezifischen Antikörpern. Auch für Streptokokken der anderen Gruppen erhältlich (Gruppen B, C, D, F und G).

- Je einen Tropfen Phadebact StrepA-Reagens und Kontroll-Reagens auf Agglutinations-Kärtchen geben
- Jeweils eine Kolonie sorgfältig zerreiben und mit dem Reagens gut mischen. Kärtchen hin- und herkippen. Agglutination darf nur mit dem StrepA-Reagens auftreten
- Demonstration der Agglutination



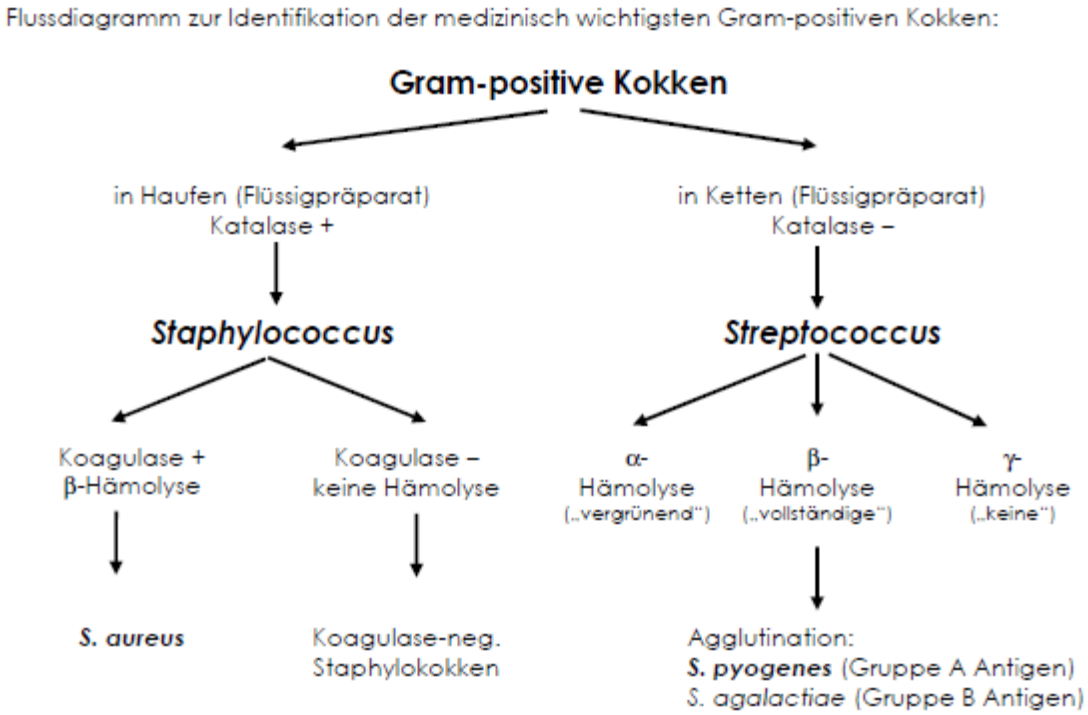
Positive Agglutination für Streptokokken der Gruppe B

3. Clumping – Faktor ("zellgebundene Koagulase")

- Je 1 Tropfen NaCl-Lösung und Plasma nebeneinander auf einen Objektträger aufbringen.
- 1 Öse Kulturmaterial des zu testenden Staphylokokkenstammes auftragen und langsam von der Seite in die Flüssigkeit einreiben.
- Tritt eine Verklumpung mit dem Plasma ein, so ist die Reaktion als positiv zu werten. Die NaCl-Kontrolle muss negativ ausfallen (homogene Trübung).
- Auf einem zweiten Objektträger gleichen Test mit einem Koagulase - negativen Staphylokokken durchführen.

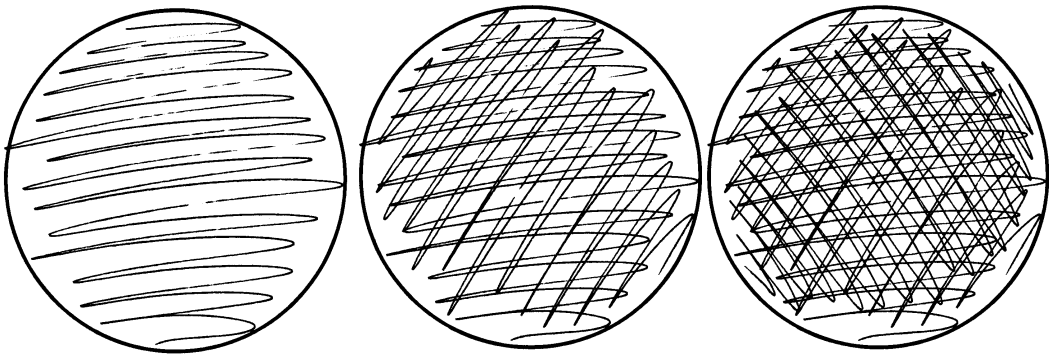
Positiv:	*S. aureus*
Negativ:	andere Staphylokokken

Flussdiagramm zur Identifikation der medizinisch wichtigsten Gram-positiven Kokken:



4. Resistenzprüfung

- 2-3 Einzelkolonien des zu testenden Keimes mit der Öse antippen und in 2 ml NaCl- Lösung homogen einreiben bis die Suspension einer Trübung nach Mc Farland von 0,5 entspricht (= 10^8 koloniebildende Einheiten/ml). Vorgehen: Röhrchen schräg halten; Koloniematerial zuerst am Röhrchenrand verreiben; mit der Öse ins NaCl tauchen und den Tropfen mit Koloniematerial mischen; erst dann ganz in die Flüssigkeit einreiben
- Watteträger in Röhrchen tauchen, überschüssige Flüssigkeit am Röhrchenrand abtupfen
- Bakteriensuspension mit Watteträger gleichmässig in parallelen Strichen auf der gesamten Fläche der Agarplatte (Müller-Hinton-Agar) verteilen
- Platte um 60° drehen und Vorgang wiederholen, ohne Watteträger erneut in Bakteriensuspension einzutauchen
- Platte nochmals um 60° drehen und Vorgang nochmals wiederholen
- Platte beschriften
- Auf dem Korpus vorne Platte mit Antibiotika-Testblättchen (Dispenser auf Korpus; Instruktion durch Lehrpersonal) beschicken und zur Bebrütung in den bereitliegenden Korb legen



5. Leitsätze der Antibiotikatherapie

- Ein Antibiotikum ist kein Antipyretikum! Fieber allein ist keine Indikation für Antibiotikagabe
- Vor einer Antibiotikatherapie Versuch einer Erregerisolierung!
- Bei jedem unklaren Fieber müssen 2 bis 3 Blutkulturen abgenommen werden
- Richtige Probenentnahme und –transport sowie Angaben zu aktueller Verdachtsdiagnose, Grunderkrankung(en) und antimikrobieller Vorbehandlung auf dem Auftragsformular sind Voraussetzung eine korrekte Diagnostik
- Wenn Antibiotikatherapie in 3-4 Tagen nicht anspricht, vor allem an folgendes denken:
  - Falsche Wahl der Substanz:
    - Erreger resistent
    - andere Erregergruppe (Viren! Pilze!)
  - Substanz erreicht Infektionsort nicht:
    - Abszess
    - Infizierter Fremdkörper (intravasaler Katheter, Blasenkatheter)
  - Abwehrdefekt des Patienten
  - Drug fever
- Wenn Antibiotikatherapie als unnötig erkannt, dann <u>sofort</u> absetzen!
  Je länger Antibiotika gegeben werden, um so grösser ist die Gefahr der Selektion resistenter Keime, von Nebenwirkungen und Toxizität!
- Die meisten Lokalantibiotika können durch Antiseptika ersetzt werden (z.B. PVP-Jod-Präparate)
- Perioperative Antibiotikaprophylaxe so kurz wie möglich. Bei vielen Eingriffen genügt <u>*eine*</u> Dosis (z.B. Hysterektomie, Gallenwegs-, Colonchirurgie)
- Ein mikroskopisches Präparat (Eiter, Liquor, Urin etc.) gibt oft schon 1-3 Tage vor dem endgültigen bakteriologischen Befund ausserordentlich wertvolle Hinweise auf den Erreger
- Antibiotika werden häufig zu lange gegeben. Bei den meisten Erkrankungen genügt die Gabe bis 5 Tage nach Entfieberung. Antibiotika nicht zu häufig wechseln! Auch die beste Antibiotika-Kombination erzielt Entfieberung meist erst in 2-3 Tagen
- Bleiben Sie bei Antibiotika, mit denen Sie gute klinische Erfahrungen haben. Die neuesten, meist teuersten Substanzen haben Vorteile meist nur bei wenigen Spezialindikationen und häufig Lücken gegen klassische Infektionserreger. Lassen Sie sich durch den eloquentesten Pharmavertreter und aufwendige Hochglanzprospekte nicht von Ihrer persönlichen guten Erfahrung mit Standard-Antibiotika (Penicillin, Cotrimoxazol, Clarithromycin) abbringen!
- In vielen Situationen, besonders in der Praxis des niedergelassenen Arztes, ist eine kalkulierte Therapie bei Infektionen mit typischen Erregern bekannter Empfindlichkeit möglich (z.B.: unkomplizierte Harnwegsinfektion – *E. coli* – Kurztherapie mit Cotrimoxazol). In der Klinik, besonders auf Intensivstationen, ist dagegen mit nosokomialen Erregern zu rechnen, die sehr unterschiedliche Antbiotikaresistenzen aufweisen. Hier ist die regelmässige Erstellung einer Keim- und Resistenzstatistik zur kalkulierten bzw. Erregerisolierung und Antibiogramm vor der gezielten Therapie unabdingbar!

(E.C. Böttger, modifiziert nach F. Daschner, Antibiotika am Krankenbett, 1992)

6. Praktikumsversuch

Untersuchungsmaterial: Abstrich oberflächliche Wunde oder eigener Stamm von Nase

Tag 1	- Mit Watteträger Schafblutplatte und MacConkey-Agar beimpfen, mit Öse fraktionieren - Präparat herstellen, an der Luft trocknen lassen, sorgfältig fixieren, Gram-Färbung (Anleitung **Seite 2**) (Zum Üben zuerst Präparat Nr. 1 von der Schachtel anschauen) - Ausfüllen eines Auftragsformulars (alle für das Labor wichtigen Informationen berücksichtigen)
Tag 2	- Beschreibung Kolonien o Katalase: (auch bei Streptokokken als Kontrolle durchführen) o Clumping Factor ("zellgebundene Koagulase") mit Plasma: Kontrolle mit NaCl: o Empfindlichkeitsprüfung ansetzen
Tag 3	- Empfindlichkeitsprüfung des *Staphylococcus aureus* gemäss folgender Tabelle:

Antibiotikum	Abkürzung µg	Hemmhof (mm)			Resultat	
		R	I	S	mm	R/I/S
Penicillin	P 1	≤25		≥26		
Ciprofloxacin Hemmhöfe für *S. aureus*	CIP 5	≤20	21-49	≥50		
Clindamycin	DA 2	≤18	19-21	≥22		
Cefoxitin, Hemmhöfe für *S. aureus*	FOX 30	≤21		≥22		

I = empfindlich bei erhöhter Dosierung; dies ist seit 2018 die neue Definition nach EUCAST.
Ciprofloxacin ist für Staphylokokken immer mit der höheren Dosierung gefordert!
In der Regel nicht als Monotherapie, da eine schnelle Resistenzentwicklung möglich.

Ergänzung zum Versuch

Sie werden im Kurs instruiert, wie Sie den genauen Hemmhofdurchmesser für Penicillin bei *Staphylococcus aureus* bestimmen, damit wir die Streuung der Hemmhöfe des Stammes von der Wunde (Messstreuung) bzw. die Streuung der Nasenstämme (biologische Streuung) besprechen können.

Streubreite Penicillin des *S. aureus* von der Wunde (Messstreuung):

Streubreite Penicillin der *S. aureus* Nasenstämme (biologische Streuung):

7. Die Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien („Das Antibiogramm“)

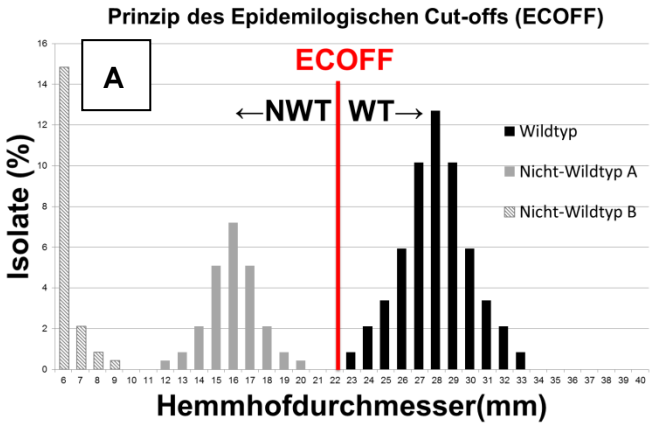
Das „Antibiogramm“, d.h. der interpretierte mikrobiologische Befund zur antibiotischen Empfindlichkeit bildet bei der Auswahl eines Antibiotikums zur Behandlung eines bakteriellen Infektes zumeist die Entscheidungsgrundlage.
Grundsätzlich existieren zwei wesentliche Techniken zur Empfindlichkeitsprüfung. Einerseits kann die „Minimale Hemmkonzentration“ (MHK) bestimmt werden. Dazu werden Reihenverdünnungen eines Antibiotikums hergestellt, z.B. 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0, 128.0, 256.0 mg/L. Anschliessend werden in jeder Verdünnungsstufe 10^4 Bakterien eines zu messenden Bakterienisolates dazu gegeben (inokuliert). Die Verdünnungsreihe wird 24 Stunden bebrütet. Vermehren sich die Bakterien, trübt sich die Suspension optisch; ist das Wachstum durch das Antibiotikum gehemmt, bleibt die Suspension klar. Die niedrigste Verdünnungsstufe ohne bakterielles Wachstum repräsentiert die MHK (siehe Seite 14).

Die zweite im Routinelabor eingesetzte Technik zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien ist der Plättchendiffusionstest („Kirby-Bauer Methode“). Er ist wesentlich einfacher zu handhaben als eine MHK-Bestimmung, korreliert jedoch sehr gut mit deren Ergebnissen. Dazu werden Filterpaperblättchen, welche mit einer bestimmten Menge von Antibiotika imprägniert sind, auf eine Agarplatte (Müller-Hinton-Agar) aufgebracht, welche zuvor mit einer Bakteriensuspension bestrichen („inokuliert“) wurde. Diese Suspension, der sogenannte MacFarland Standard 0,5 enthält 10^8 Bakterien/ml. Das Antibiotikum diffundiert aus dem Filterpapierblättchen radial in den Agar und bildet einen radialen Konzentrationsgradienten aus. Die Agarplatten werden anschliessend 24 Stunden bebrütet und die Bakterien vermehren sich auf dem Agar, so dass ein optisch sichtbarer „Rasen“ von Bakterien entsteht. Entsprechend der Empfindlichkeit auf die aufgebrachten Antibiotika bilden sich rings um die Filterpapierblättchen Zonen ohne Bakterienwachstum, die sogenannten „Hemmhöfe“ oder „Hemmzonen“ aus, welche mit dem Konzentrationsgradienten und der MHK korrelieren.

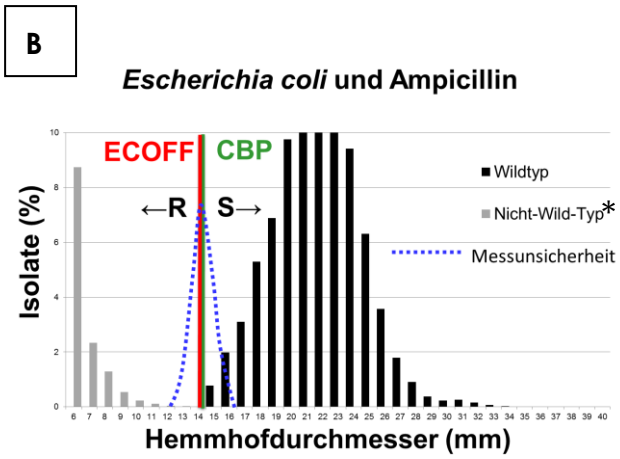
Reine MHK- oder Hemmhofdurchmesser-Werte allein sagen jedoch über den zu erwartenden klinischen Erfolg einer antibiotischen Behandlung nichts aus. Dazu müssen diese Werte interpretiert werden. Dies geschieht, indem die Messwerte im Labor mit klinischen Grenzwerten („Clinical breakpoints“, CBPs) verglichen werden. Dadurch wird eine Kategorisierung in „klinisch-therapeutische“ Kategorien möglich. Die Kategorie „Sensibel“ (S) bedeutet dabei eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Behandlung des entsprechenden Bakerienisolates mit einem bestimmten Antibiotikum erfolgreich sein wird. Die Kategorie „Resistent“ (R) impliziert eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Behandlung des entsprechenden Bakerienisolates mit einem bestimmten Antibiotikum NICHT erfolgreich sein wird. Die Kategorie „Intermediär“ (I) reflektiert eine „Grauzone“ technisch-methodischer Messunsicherheit und/oder biologischer Variation (siehe auch Seite 14).

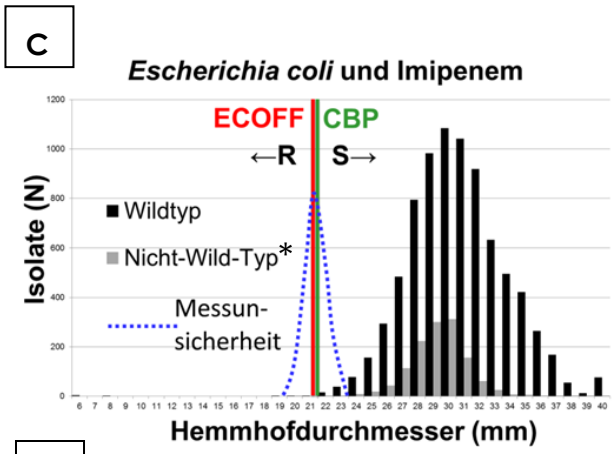
Die Festlegung klinischer Grenzwerte (CBPs) ist ein komplexer Prozess, der neben mikrobiologischen auch klinische und pharmakologische Parameter mit einbezieht. Die Festlegung der CBPs erfolgt durch nationale und internationale Organisationen, z.B. das Clinical and Laboratories Standards Intitute (CLSI) der USA oder das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testung (EUCAST).
Bakterienspezies können grundsätzlich in eine „Wildyp-Population“ (WT) und in „Nicht-Wildyp-Populationen“ (NWT) eingeteilt werden (siehe Abb. A auf der Seite 21). Der WT besitzt per Definition keinen erworbenen antibiotischen Resistenzmechanismus, während der NWT Resistenzmechanismen erworben hat. Die WT-Population wird dabei vom „Epidemiologischen cut-off“ (ECOFF) (MHK oder Hemmhofdurchmesser) begrenzt. Die klinischen Grenzwerte für die Kategorien S, I, und R orientieren sich im Allgemeinen an den ECOFF-Werten, soweit klinische und pharmakologische Daten (z.B. erreichbare Serumkonzentrationen, „clinical outcome studies“) dem nicht entgegen stehen.

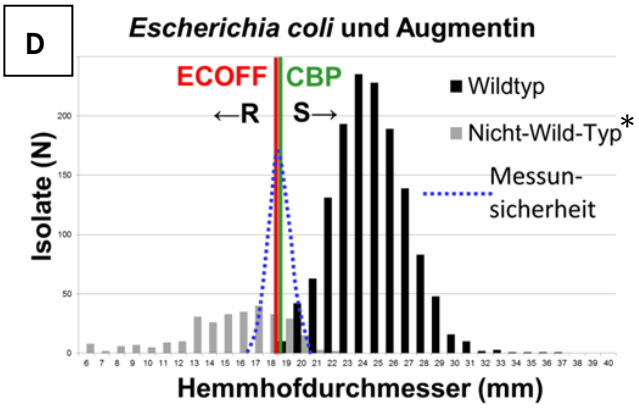
Sind WT und NWT Populationen eindeutig voneinander unterscheidbar, können anhand des ECOFFs, der hier zum CBP wird, die Kategorien S und R festgesetzt werden (Abb. B). Der WT wird als behandelbar (S), die NWT als nicht behandelbar (R) eingestuft. Überlagern sich die Verteilungen der WT und NWT Populationen vollständig, so hat der Resistenzmechanismus des NWT keinen Einfluss auf das entsprechende Antibiotikum (Abb. C). WT und NWT können als sensibel (S) eingestuft werden. Der ECOFF wird auch hier zum CBP. Fehlzuordnungen resultieren in den Abb. B und C dargestellten Situationen aus der Messunsicherheit allein.

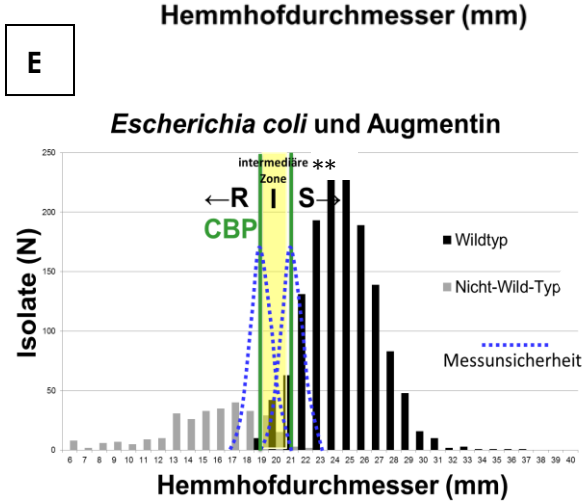


Überlappen WT und NWT Populationen (Abb D), ist die Zuordung zu den Kategorien S und R zusätzlich durch die biologische Streuung erschwert. Um Fehlzuordnungen zu vermeiden, kann hier eine intermediäre Kategorie als „Pufferzone“ dienen, die den nicht eindeutig vorherzusagenden klinischen Erfolg zwischen den CBPs S/I und I/R repräsentiert (Abb E).









* Nicht-Wild-Typ: hier am Beispiel von Extended-Spektrum-Beta-Laktamase-Bildnern (ESBL)

** Die intermediäre Zone wird seit 2019 als empfindlich bei erhöhter Dosierung (**i**ncreased exposure) bezeichnet. Im konkreten Fall wird dieser Bereich aktuell als area of technical uncertainty (ATU) bezeichnet

Die häufigste klinische Manifestation der unkomplizierten Harnwegsinfektion ist die akute Zystitis bei der Frau mit der typischen Trias von akut auftretender Dysurie, Harndrang und suprapubischen Schmerzen. Sie ist die Folge des retrograden Zutritts von Bakterien in die Blase ohne das Vorliegen anatomischer Störungen und ist nicht selten zeitlich mit sexueller Aktivität assoziiert ("honeymoon cystitis"). Das Erregerspektrum wird durch Bakterien dominiert, welche Bestandteil der normalen Darmflora sind (siehe Tabelle).

Von komplizierten Harnwegsinfektionen spricht man bei Vorliegen einer anatomischen Störung, die zur Beeinträchtigung der Blasenentleerung führt (Prostatahypertrophie, Nierensteine), oder einer prädisponierenden Krankheit (Diabetes mellitus, Nierenkrankheit). In diesen Fällen findet man als Erreger häufiger andere Enterobakteriazeen als *E. coli*, *Pseudomonas* sp. oder *Candida albicans*, während *S. saprophyticus* kaum vorkommt.

Erreger und Diagnostik

Für die Diagnostik wird eine quantitative Kultur mit Mittelstrahlurin durchgeführt. Die Bakteriurie gilt in der Regel dann als signifikant, wenn >10^5 Keime pro ml Urin nachgewiesen werden können. Ausnahmsweise können auch bei Keimzahlen von <10^5 / ml Symptome der Harnwegsinfektion auftreten (Urethralsyndrom). Weil die Keimzahl im Urin für eine korrekte Interpretation wichtig ist, kommt der Entnahmetechnik sowie der Probenverarbeitung eine grosse Bedeutung zu. Um eine nachträgliche Veränderung der Keimzahl zu verhindern, müssen Urinproben innert zwei Stunden nach Entnahme angesetzt werden. Andernfalls ist eine Kühlung bei 4°C oder die Verwendung von Eintauchnährböden oder Borat-Transportmedien unumgänglich.

Keim	**Häufigkeit**
Escherichia coli	75 %
Klebsiella spp.	2 %
Proteus spp.	1 %
Staphylococcus saprophyticus	6 %
andere	16 %

Erregerspektrum bei der unkomplizierten Harnwegsinfektion der Frau
Ferry S *et al.*(1988) Scand J Infect Dis 20:535-44

1. Entnahme von Mittelstrahlurin für die mikrobiologische Untersuchung

Beim Mann:
Glans penis sorgfälig mit Wasser waschen, gut abspülen, trocknen. Ohne Unterbrechung der Miktion, die mittlere Portion in ein steriles Gefäss auffangen.

Bei der Frau:
(aus: Diagnose und Bekämpfung von Infektionskrankheiten, Bundesamt für Gesundheit)

Benötigtes Material: 5 Wattetupfer, 1 Gefäss mit Wasser, 1 sauberes Plastikgefäss zum Auffangen des Urins, allenfalls Eintauchnährboden.

Vorgehen:

1. Hände mit Wasser und Seife waschen
2. Scheideneingang mit Wasser waschen
3. Material vor sich auf einem Hocker vorbereiten
4. Gefäss für die Uringewinnung öffnen, ohne den Rand mit Fingern oder Kleidern zu berühren
5. Auf Toilette sitzen, Beine gespreizt

6. In die eine Hand einen Wattetupfer nehmen und ins Gefäss mit Wasser tauchen
7. Mit der anderen Hand Scheideneingang spreizen und während der ganzen Prozedur gespreizt halten
8. Mit dem ersten Wattetupfer Gebiet der Harnröhrenmündung mit einer einmaligen Bewegung von vorne nach hinten reinigen
9. Dasselbe mit den vier weiteren Tupfern machen
10. Urinieren. Erste Hälfte des Urins in die Toilette
11. Zweite Hälfte, ohne den Strahl zu unterbrechen, ins Gefäss auffangen. Der zu untersuchende Urin darf nicht mit der Haut oder den Kleidern in Berührung gekommen sein

2. Keimzahlbestimmung

2.1. Eintauchnährböden - Demo

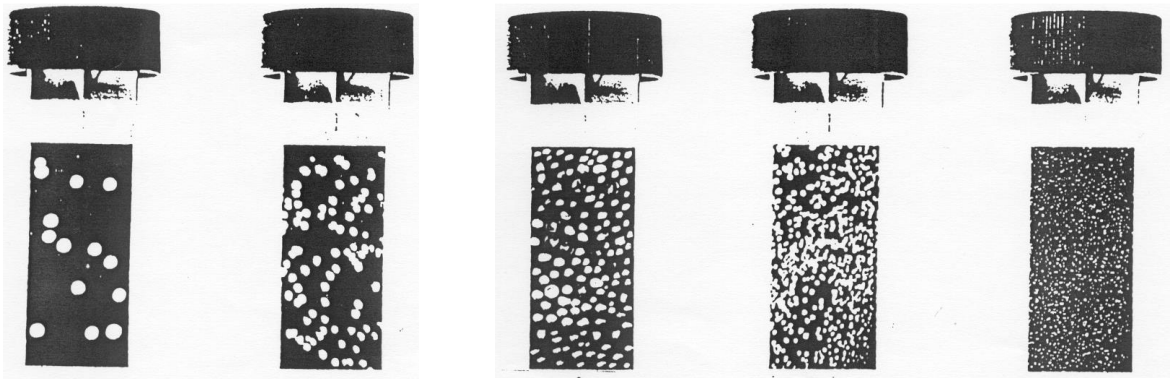
Verschiedene Fabrikate kommerziell erhältlich, im Kurs wird UROTUBE E verwendet.

- CLED (Cystin-Laktose-Elektrolytdefizienter) – Agar:
  - Nährstoffreich (Cystin). Gram-positive und Gram-negative Bakterien können wachsen
  - Gelbfärbung zeigt Spaltung von Laktose an
  - Elektrolytdefizienz verhindert das Schwärmen von Proteus
  - Bestimmung der Gesamtkeimzahl
- MacConkey - Agar (siehe auch **Seite 9**):
  - Nur Gram-negative Stäbchenbakterien können wachsen
  - Abbau von Laktose wird durch Rotfärbung angezeigt
- Enterokokkenmedium
  - vorwiegend Wachstum von Enterokokken
  - Kolonien sind schwarz gefärbt

Beimpfung: Urotube aufschrauben und 1x in Urin eintauchen. Agarflächen sollten vollständig benetzt sein. Gut abtropfen lassen und auch den letzten Tropfen am Rand des Urinbehälters abtupfen. Urotube gut zuschrauben.

Bebrütung: über Nacht bei 37°C

Interpretation: Die Keimzahlbestimmung (-schätzung!) erfolgt auf dem CLED-Agar durch Vergleich der Kolonienzahlen mit Standard-Vergleichsbildern (siehe **Seite 24**). Das Vorliegen von Mischkulturen deutet auf eine Kontamination hin, z.B. mit Vaginalflora (ungenügende Materialentnahme). Das bedeutet, dass die Untersuchung wiederholt werden muss. In solchen Fällen wird das Labor keine Keimidentifikation oder Empfindlichkeitsprüfung durchführen.



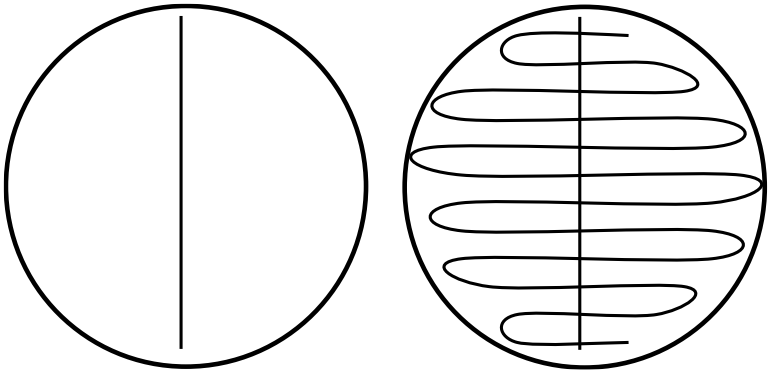
<10^4 / ml 10^4 / ml 10^4 – 10^5 / ml 10^5 / ml >10^5 / ml

Keimzahlbestimmung auf CLED-Agar

2.2. Kalibrierte Öse

Eine kalibrierte Öse nimmt eine definierte Menge Flüssigkeit (1 µl oder 10 µl) auf. Die gesamte Menge muss möglichst gleichmässig auf der ganzen Agarfläche verteilt werden (Ausstrich, siehe unten). Nach Bebrütung wird die Anzahl der Kolonien gezählt und kann dann in die Keimzahl (KBE/ml) umgerechnet werden (z.B. bei 1 µl-Öse: gezählte Kolonien x 1000).
KBE: Kolonie-bildende Einheiten (= CFU: colony-forming units)

Praktisches Vorgehen
1. Mit der Öse die gewünschte Menge Urin entnehmen. 2. Platte in der Mitte mit einem Impfstrich beimpfen. 3. Mit selber Öse von oben nach unten schlangenlinienförmig das Material verteilen.



3. Identifikation von *Enterobacteriaceae* mit API 20E

Viele Bakterien können auf Grund ihrer Stoffwechselleistungen identifiziert werden. Meist werden dazu kommerziell erhältliche Systeme („Bunte Reihen") verwendet, z.B. API 20E für *Enterobacteriaceae*, API Strep für Streptokokken, etc.

Arbeitsanleitung für API 20E:

1. Vorbereitung
   - Inkubationswanne mit Deckel bereitstellen
   - Wanne seitlich mit Platznummer beschriften
   - 5 ml Wasser aus Röhrchen vorsichtig in Wanne giessen (→ feuchte Kammer)
   - Streifen in Wanne legen

2. Vorbereitung des Inokulums
   - Mit Öse grosse Bakterienkolonie in 5 ml sterilem Wasser (Röhrchen mit Deckel) homogen suspendieren
3. Beimpfen des Streifens
   - Mit Pipetten (oder Socorex - Pipette (50-200 µl)) jeweils ca. 130 µl der Suspension sorgfältig in die Röhrchen (entspricht zugedecktem Teil der Näpfchen) pipettieren. Damit keine Luftblasen entstehen, muss der Streifen schräg gehalten und die Pipettenspitze am seitlichen Rand der Näpfchen angesetzt werden
   - Bei CIT, VP und GEL auch den oberen Teil der Näpfchen füllen (total ca. 250 µl)
   - Die unterstrichenen Reaktionen ADH, LDC, H_2S, ODC und URE mit Paraffinöl überschichten (→ anaerobe Bedingungen)
   - Die Inkubationswanne schliessen und bei 37°C für 18-24 Std. bebrüten.
4. Ablesung des Streifens
   - Spontanreaktionen auf dem Ergebnisblatt notieren (+ oder -)
   - Zu folgenden Reaktionen die entsprechenden Reagenzien zugeben:
     - VP-Test: je ein Tropfen Reagenz VP1 und VP2. 10 Minuten warten. Eine rosa oder rote Färbung zeigt eine positive Reaktion an. Ergebnis eintragen
     - IND-Test: ein Tropfen James-Reagenz. Bei positiver Reaktion tritt innerhalb von 2 Minuten nach Zugabe eine rote Verfärbung ein. Ergebnis eintragen
     - TDA-Test: ein Tropfen TDA-Reagenz zufügen. Eine dunkelbraune Farbe zeigt eine positive Reaktion an. Ergebnis eintragen

Ablesung API 20E:

Tests	Substrat	Reaktion/Enzym	negativ	positiv
ONPG	Ortho-Nitro-Phenyl-Galactosid	β-Galactosidase	farblos	gelb
ADH	Arginin	Arginindihydrolase	gelb/orange	rot
LDC	Lysin	Lysindecarboxylase	gelb	orange/rot
ODC	Ornithin	Ornithindecarboxylase	gelb/hell-orange	dunkel-orange, rot
CIT	Natriumcitrat	Citratabbau	blassgrün/gelb	blau-grün
H_2S	Natriumthiosulfat	H_2S-Produktion	farblos/gräulich	schwarz
URE	Harnstoff	Urease	gelb	rot
TDA	Tryptophan	Tryptophandeaminase	TDA: gelb	TDA: braun
IND	Tryptophan	Indolproduktion	IND: gelb	IND: rot
VP	Natriumpyruvat	Acetoinproduktion	VP1+2: farblos	VP1+2: rosa-rot
GEL	Gelatine	Gelatinase	keine Diffusion	homogen schwarz
GLU	Glukose	Fermentation / Oxidation	blau/blau-grün	gelb
MAN	Mannit			
INO	Inosit			
SOR	Sorbit			
RHA	Rhamnose			
SAC	Saccharose			
MEL	Melibiose			
AMY	Amygdalin			
ARA	Arabinose			

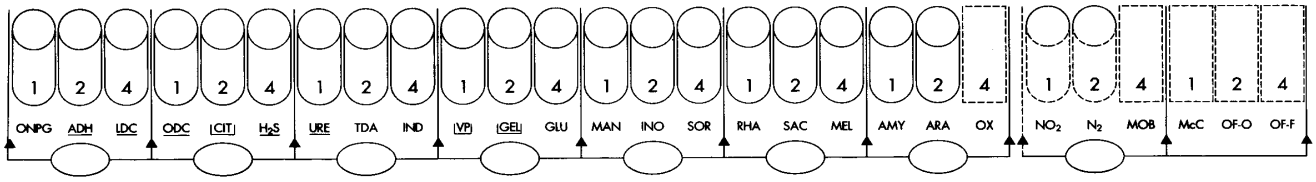
api 20 E

07223 A

REF. : _____

Origine / Source / Herkunft / Origen / Prelievo : _____

bioMérieux



Imprimé en France / Printed in France

Autres tests / Other tests / Weitere Tests / Altri tests / Otros tests :

Ident. :

---

5 144 172 FAIBLE DISCRIMINATION LOW DISCRIMINATION UNGENUEGENDE SELEKTIVITAETSID. 5 144 172

				CELac	ASCORB.ac	MDGac	GLYCEROLac
Escherichia coli 1	%id=89.6 T=0.80 (SOR 91%)		Escherichia coli	2%	NT	0%	70%
Kluyvera spp	%id=10.3 T=0.61 (LDC 25%)(AMY 99%)		Kluyvera ascorbata	100%	+	98%	40%
			Kluyv.cryocrescens	100%	-	94%	6%

---

5 144 173 TRES BONNE IDENTIFICATION VERY GOOD IDENTIFICATION SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG 5 144 173

			ASCORB.ac
Kluyvera spp	%id=99.4 T=0.89 (LDC 25%)	Kluyvera ascorbata	+
		Kluyv.cryocrescens	-

---

5 144 204 TRES BONNE IDENTIFICATION VERY GOOD IDENTIFICATION SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG 5 144 204

Plesio.shigelloides %id=99.9 T=0.72 (ADH 99%)

---

5 144 472 TRES BONNE IDENTIFICATION VERY GOOD IDENTIFICATION SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG 5 144 472

Escherichia coli 1 %id=99.7 T=0.71 (MAN 98%)

---

5 144 550 TRES BONNE IDENTIFICATION VERY GOOD IDENTIFICATION SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG 5 144 550

Escherichia coli 1 %id=99.5 T=0.72 (ARA 99%)

---

5 144 552 EXCELLENTE IDENTIFICATION EXCELLENT IDENTIFICATION AUSGEZEICHNETE IDENTIFIZIERUNG 5 144 552

Escherichia coli 1 %id=99.9 T=1.00

---

5 144 553 FAIBLE DISCRIMINATION LOW DISCRIMINATION UNGENUEGENDE SELEKTIVITAETSID. 5 144 553

				CELac	ASCORB.ac	MDGac	GLYCEROLac
Escherichia coli 1	%id=67.0 T=0.75 (AMY 3%)		Escherichia coli	2%	NT	0%	70%
Kluyvera spp	%id=32.6 T=0.67 (LDC 25%)(SOR 25%)		Kluyvera ascorbata	100%	+	98%	40%
	(SAC 89%)		Kluyv.cryocrescens	100%	-	94%	6%

---

5 144 562 TRES BONNE IDENTIFICATION VERY GOOD IDENTIFICATION SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG 5 144 562

Escherichia coli 1 %id=99.8 T=0.85 (RHA 82%)

---

5 144 563 FAIBLE DISCRIMINATION LOW DISCRIMINATION UNGENUEGENDE SELEKTIVITAETSID. 5 144 563

				CELac	ASCORB.ac	MDGac	GLYCEROLac
Kluyvera spp	%id=70.2 T=0.63 (LDC 25%)(SOR 25%)		Kluyvera ascorbata	100%	+	98%	40%
	(RHA 93%)		Kluyv.cryocrescens	100%	-	94%	6%
Escherichia coli 1	%id=29.0 T=0.60 (RHA 82%)(AMY 3%)		Escherichia coli	2%	NT	0%	70%

---

5 144 570 TRES BONNE IDENTIFICATION VERY GOOD IDENTIFICATION SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG 5 144 570

Escherichia coli 1 %id=99.5 T=0.68 (ARA 99%)

---

5 144 572 TRES BONNE IDENTIFICATION VERY GOOD IDENTIFICATION SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG 5 144 572

Escherichia coli 1 %id=99.6 T=0.96

---

4. Praktikumsversuch

Untersuchungsmaterial: Mittelstrahlurin

Tag 2	**Demo:** Urotube ansetzen gemäss Anleitung auf **Seite 23** und korrekt beschriften. Gut zuschrauben!	**Pro Person:** Mit kalibrierter Oese (1 µl) MacConkey-Agar beimpfen (nicht fraktioniert!), Platten korrekt beschriften
Tag 3	- Demo: Keimzahl auf CLED-Agar schätzen durch Vergleich mit Angaben auf **Seite 24** - Beurteilung von MacConkey und Enterokokkenagar - nicht weiterverarbeiten	- Kolonien zählen - Koloniemorphologie beurteilen - Keimzahl / ml berechnen - Ansetzen TSI (Triple Sugar Iron) agar - Ansetzen MIO (Motility, Indol, Ornithinde-carboxylase) Weichagar - * Ansetzen API 20 (Anleitung **Seiten 24/25**) * nur für Teilnehmer Tag 6 / 7, welche nicht die Forschungsgruppen besuchen - Ansetzen Resistenzprüfung (siehe **Seite 17**)
Tag 4	- *Ablesen API 20 * nur für Teilnehmer Tag 6 / 7, welche nicht die Forschungsgruppen besuchen - * Identifikation gemäss Liste API-Buch (siehe Auszug auf **Seite 26**) - Beurteilung Beweglichkeit im MIO und des Laktoseverbrauchs im TSI (siehe Seite **34)** - Ablesen Resistenzprüfung (Interpretation nach EUCAST)	

Antibiotikum	**Abkürzung µg**	**Hemmhof (mm)**			**Resultat**	
		R	**I**	**S**	**mm**	**R/I/S**
Ampicillin	AM 10	≤13		≥14	2	
Amoxicillin/Clavulansäure	AMC 20/10	≤15	16-18	≥19		
Ceftriaxon	CRO 30	≤21	22-24	≥25	15	
Ciprofloxacin	CIP 5	≤21	22-24	≥25		
Norfloxacin	NOR 10	≤21		≥22		
Trimethoprim/Sulfameth.	SXT 25	≤10	11-13	≥14		
Tetracyclin (CLSI)	TE 30	≤11	12-14	≥15		
Imipenem	IPM 10	≤16	17-21	≥22		

TABLEAU DE POURCENTAGES / *PERCENTAGE TABLE* / **PROZENTSÄTZE DER POSITIVEN REAKTIONEN**

% de réactions positives après 24-48 h à 35-37°C / *% of positive reactions after 24-48 hrs. at 35-37°C* /**% der positiven Reaktionen nach 24-48 Std. bei 35-37°C**

API 20 E V4.0	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2	N2	MOB	McC	OF/O	OF/F
Buttiauxella agrestis	100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	99	0	92	99	100	0	100	0	100	100	100	100
Cedecea davisae	99	89	0	99	75	0	0	0	0	89	0	100	100	10	0	0	100	0	100	1	0	99	0	87	100	100	100
Cedecea lapagei	99	99	0	0	75	0	0	0	0	90	0	100	99	0	0	0	0	1	100	1	0	99	0	87	100	100	100
Citrobacter braakii	50	45	0	99	75	81	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99	0	100	0	95	100	100	100
Citrobacter freundii	90	24	0	0	75		1	0	1	0	0	100	99	25	99	99	99	82	40	99	0	98	0	95	100	100	100
Citrobacter koseri/amalonaticus	99		0	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	25	99	99	1	1	98	99	0	100	0	95	100	100	100
Citrobacter koseri/farmeri	99	2	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	99	80	99	99	0	100	0	95	100	100	100
Citrobacter youngae	100	50	0	1	80	80	0	0	1	0	0	100	100	0	95	100	1	0	25	100	0	85	0	95	100	100	100
Edwardsiella hoshinae	0	0	100	99	50	94	0	0	99	0	0	100	100	0	0	1	100	0	0	1	0	100	0	100	100	100	100
Edwardsiella tarda	0	0	100	99	1		0	0	99	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	98	100	100	100
Enterobacter aerogenes	99	0	99	98	82	0	1	0	0	85	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	97	100	100	100
Enterobacter amnigenus 1	99	25	0	99	40	0	0	0	0		0	100	100	0	1	100	99	99	99	99	0	100	0	92	100	100	100
Enterobacter amnigenus 2	99	80	0	99	80	0	0	0	0		0	100	100	0	99	100	1	99	99	99	0	100	0	100	100	100	100
Enterobacter asburiae	100	25	0	99	80	0	0	0	0	10	0	100	99	25	100	0	99	0	100	100	0	100	0	95	100	100	100
Enterobacter cancerogenus	100		0	99	99	0	0	0	0	89	0	100	100	0	1	100	1	1	100	100	0	100	0	99	100	100	100
Enterobacter cloacae	98	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	12	90	85	96	90	99	99	0	100	0	95	100	100	100
Enterobacter gergoviae	99	0	32	100		0	99	0	0	90	0	100	99	23	1	100	99	100	99	100	0	100	0	90	100	100	100
Enterobacter intermedius	99	0	0	99	1	0	0	0	0	2	0	100	97	0	88	99	40	100	99	99	0	100	0	92	100	100	100
Enterobacter sakazakii	100	96	0	91	94	0	1	0	25	91	10	100	100	75	8	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100	100	100
Escherichia coli 1	90	1	74	70	0	1	3	0	89	0	0	99	98	1	91	82	36		3	99	0	100	0	95	100	100	100
Escherichia coli 2	26	1	45	20	0	1	1	0	50	0	0	99	90	1	42	30	3	3	1	70	0	98	0	5	100	100	100
Escherichia fergusonii	96	1	99	100	1	0	0	0	99	0	0	100	99	1	0	87	0	1	99	99	0	100	0	93	100	100	100
Escherichia hermannii	100	0	1	100	1	0	0	0	99	0	0	100	100	0	0	99	25	0	99	99	0	100	0	99	100	100	100
Escherichia vulneris	100	30	50	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	95	95	99	0	100	0	100	100	100	100
Ewingella americana	98	0	0	0		0	0	0	0	95	1	99	99	0	0	1	0	1	50	1	0	100	0	60	100	100	100
Hafnia alvei 1		0	99	98	50	0	10	0	0	50	0	99	99	0	1	99	0	0	25	99	0	100	0	85	100	100	100
Hafnia alvei 2	50	0	99	99	1	0	1	0	0	10	0	99	98	0	1	1	1	0	0	1	0	100	0	0	100	100	100
Klebsiella ornithinolytica	100	0	99	99	99	0	85	0	100	65	0	100	100	99	100	100	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	100
Klebsiella oxytoca	99	0	80	0	89	0	78	0	99	80	0	100	100	99	100	99	99	100	100	100	0	100	0	0	100	100	100
Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae	94	18	25	1	18	0	1	0	0	1	0	99	96	57	66	58	20	80	97	85	0	92	0	0	100	100	100
Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	99	0	73	0	86	0		0	0	90	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	0	100	100	100
Klebsiella pneumoniae ssp rhinoscleromatis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	90	90			1	99	10	0	100	0	0	100	100	100
Klebsiella terrigena	100	0	99	6	52	0	0	0	0		0	99	99	99	99	99	100	100	100	99	0	100	0	0	100	100	100
Kluyvera spp	95	0	25	99	60	0	0	0	80	0	0	100	99	0	25	93	89	99	99	99	0	95	0	94	100	100	100
Leclercia adecarboxylata	99	0	0	0	0	0	1	0	99	0	1	100	99	0	2	100	66	99	99	100	0	100	0	100	100	100	100
Moellerella wisconsensis	97	0	0	0	40	0	0	0	15	1	0	100	1	0	0	0	100	99	0	0	0	90	0	0	100	100	100
Morganella morganii	1	0	10	98	1	1	99	93	99	0	0	99	0	0	0	0	1	0	0	0	0	88	0	95	100	100	100
Pantoea spp 1	85	1	0	0	13	0	1	0	1	9	1	100	99	1	26	1	98	26	59	61	0	85	0	85	100	100	100
Pantoea spp 2	99	1	0	0	99	0	1	0	53	62	4	100	99	36	82	90	98	81	99	99	0	85	0	85	100	100	100
Pantoea spp 3	99	1	0	0	21	0	1	0	1	86	15	100	99	34	1	97	93	23	65	97	0	85	0	85	100	100	100
Pantoea spp 4	86	1	0	0	29	0	1	0	59	1	1	99	100	10	32	99	72	89	99	99	0	85	0	85	100	100	100
Proteus mirabilis	1	0	0	99	50		99	98	1	1	82	98	0	0	0	0	1	0	0	0	0	93	0	95	100	100	100
Proteus penneri	1	0	0	0	1	20	100	99	0	0	50	99	0	0	0	0	100	0	1	0	0	99	0	85	100	100	100
Proteus vulgaris	1	0	0	0	12	83	99	99	92	0	74	99	1	1	0	1	89	0	66	1	0	100	0	94	100	100	100
Providencia alcalifaciens/rustigianii	0	0	0	0	80	0	0	100	99	0	0	99	1	1	0	0	1	0	0	1	0	100	0	96	100	100	100
Providencia rettgeri	1	1	0	0	74	0	99	99	90	0	0	98	82	78	1	50	25	0	40	1	0	98	0	94	100	100	100
Providencia stuartii	1	0	0	0	85	0	30	98	95	0	0	98	3	80	0	0	15	0	0	0	0	100	0	85	100	100	100
Rahnella aquatilis	100	0	0	0	50	0	0	1	0	99	0	100	100	0	98	99	100	97	100	98	0	100	0	6	100	100	100
Salmonella arizonae	98		97	98		99	0	0	1	0	0	100	99	0	99	99	1	78	0	99	0	100	0	99	100	100	100
Salmonella choleraesuis	0	15	99	99	6	64	0	0	0	0	0	100	99	0	98	99	0	20	0	0	0	100	0	95	100	100	100
Salmonella gallinarum	0	1	100	1	0	25	0	0	0	0	0	100	100	0	0	1	0	0	0	100	0	100	0	0	100	100	100

API 20 E - 09264 A - 09/97

5. Die Identifizierung von Bakterien mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) (Tag 6 / 7)

Während die klassische Identifikation von Bakterien auf phänotypischen Eigenschaften (z. B. Koloniemorphologie, Geruch etc.) und biochemischen Reaktionen beruht, hat sich in den letzten Jahren das massenspektrometrische MALDI-TOF Verfahren (**M**atrix-**A**ssisted-**L**aser-**D**esorption-**I**onization-**T**ime-**O**f-**F**light) im mikrobiologischen Routinelabor etabliert (siehe Abb. 1 unten). Dabei wird bakterielles Koloniematerial auf einen Stahlträger aufgebracht und in eine Kristallgitterstruktur (Matrix) aus Acetonitril eingebettet („Matrix-assisted"). Anschliessend wird dieses Kristallgitter mit Hilfe eines Lasers angeregt und „gesprengt" („Laser –desorption"). Dabei werden bakterielle Proteine freigesetzt, welche den „Protein-Fingerabdruck" eines Bakteriums bilden. Dieser Vorgang findet in einer Hochvakuumröhre, dem sogenannten Flugrohr statt. Da Proteine eine positive elektrische Ladung tragen, werden sie im Flugrohr zum Detektor gezogen, an dem eine negative Ladung anliegt („Ionization"). Dabei benötigen schwerere Proteine aufgrund der Massenträgheit eine längere Flugzeit als leichtere. Aufgrund der Flugzeit („Time-of-flight") können somit die Proteinmassen bestimmt werden. Es ergibt sich ein Massenspektrum, das als eine Verteilung von „Massenpeaks" in einem Diagramm dargestellt werden kann (siehe Abb. 2 auf Seite 30). Durch den Vergleich mit einer Datenbank von Massenspektren tausender Bakterienspezies kann nun ein fraglicher Bakterienstamm identifiziert werden. Dabei wird aus den Massenspektren ein artifizieller „Score"-Wert errechnet, der die Ähnlichkeit von Bakterienisolaten angibt. Zur Identifizierung auf Spezies- und/oder Genusebene existieren dabei Score-Cutoffs, welche bei unterschiedlichen Bakteriengruppen in gewissem Masse verschieden sein können. Es resultiert eine „Rangliste" von ähnlichen Einträgen in die Massenspektren-Datenbank (siehe Abb. 3 auf Seite 30).

Der Vorteil der MALDI-TOF Technik liegt in ihrer kurzen Zeit, die eine Identifizierung benötigt (in der Regel < 1 Stunde) sowie den verhältnismässig geringen Materialkosten (hingegen ist das Massenspektrumgerät selbst noch sehr teuer). Prinzipiell ist auch eine direkte Identifizierung von Bakterien z.B. aus Blutkulturen möglich.

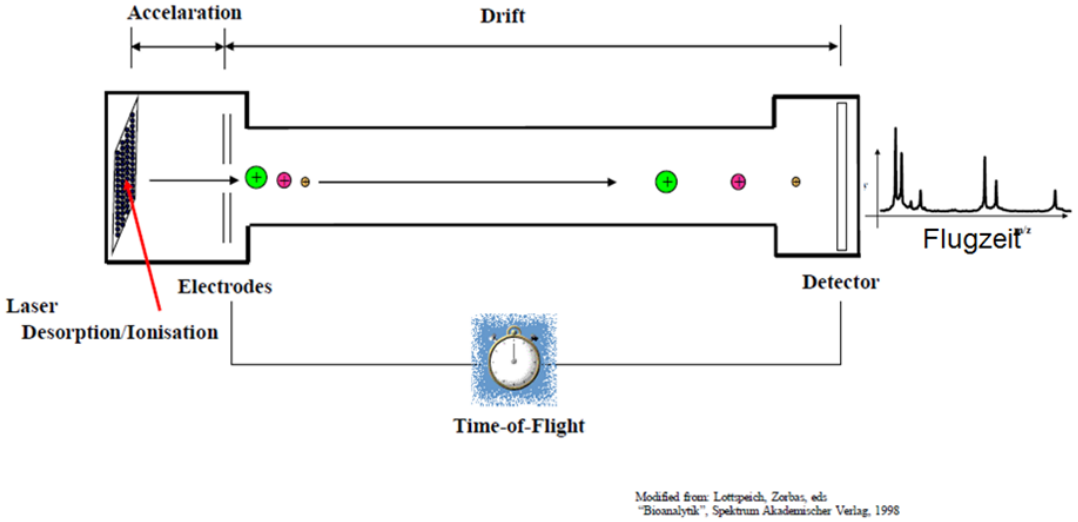


Abb. 1: MALDI-TOF Verfahren (Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-Of-Flight)

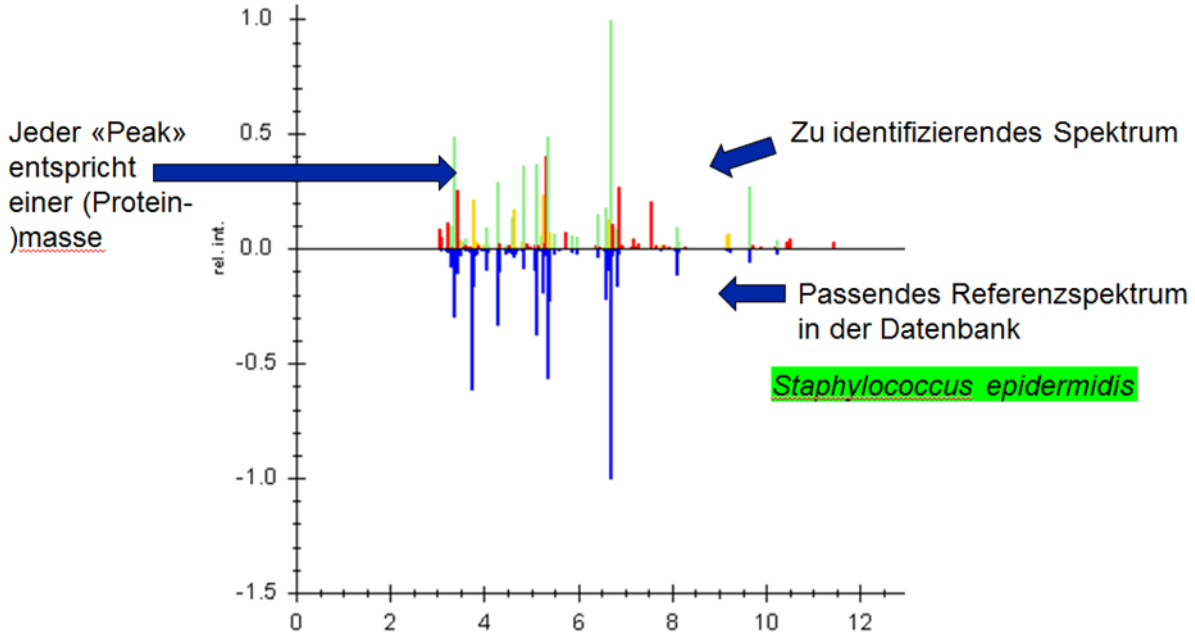


Abb. 2: Vergleich eines gemessenen Massenspekrums mit einem Massenspektrum der Referenzdatenbank

Rank	Matched Pattern	Score Value
1	*Staphylococcus epidermidis* DMS 1798 DSM	2.220
2	*Staphylococcus epidermidis* 10547 CHB	2.218
3	*Staphylococcus epidermidis* DSM 3269 DSM	2.181
4	*Staphylococcus epidermidis* 6b_s ESL	2.139
5	*Staphylococcus epidermidis* 4b_r ESL	2.120
6	*Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990T THL	2.026
7	*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 CHB	1.899
8	*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 THL	1.794
9	*Staphylococcus capitis ssp capitis* DSM 6180 DSM	1.708
10	*Staphylococcus caprae* DSM 20608T DSM	1.566

Abb. 3: „Trefferliste“ eines Vergleichs von „Ähnlichkeits-Scores“ eines gemessenen Massenspekrums mit einem Massenspektrum der Referenzdatenbank

grün - Speciesidentifizierung Score >2.0

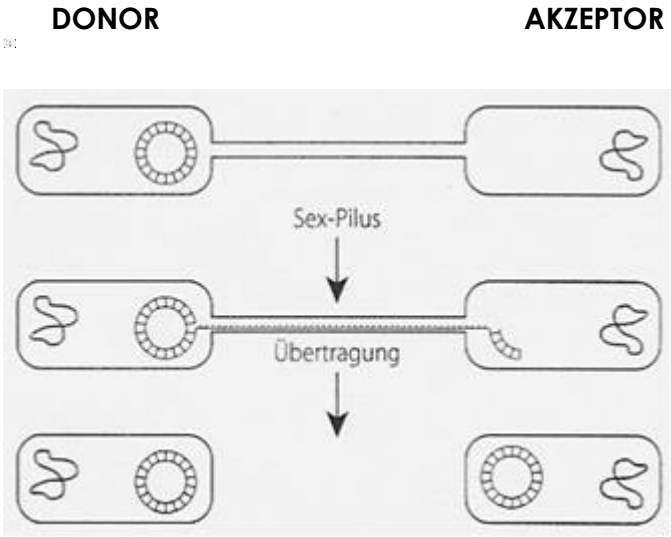
gelb - Genusidentifizierung Score >1.7 und <2.0

rot - keine Identifizierung Score <1.7

Zusätzlich zum Kernäquivalent tragen viele Bakterien ringförmige DNS-Strukturen im Cytoplasma, welche ebenfalls Erbinformation enthalten. Man nennt sie Plasmide. Die kleinsten bekannten Plasmide sind um 800 Basenpaare (bp) lang, die grössten bis zu 300 000 bp. Grössere Plasmide liegen häufig in nur einer Kopie pro Bakterienzelle vor, kleinere können in bis zu 100, in Ausnahmefällen sogar in bis zu 1000 Kopien vorkommen. Die Replikation der Plasmide ist unabhängig von der chromosomalen DNS; bei der Zellteilung werden die vorhandenen Plasmide mehr oder weniger zufällig auf die beiden Tochterzellen verteilt.

In der Gentechnologie spielen Plasmide eine wichtige Rolle als Überträgervehikel (Vektor) von artifiziell eingebrachtem genetischen Material. Auf dem Gebiet der Infektionskrankheiten kommt Plasmiden eine wichtige Bedeutung als Überträger von Virulenzfaktoren und Resistenzmerkmalen gegen Antibiotika zu. Dadurch verschaffen sich diese Organismen einen Selektionsvorteil gegenüber den plasmidfreien Bakterien. Resistenz von Bakterien kann somit nicht nur durch spontane Mutation („vertikale Weitergbe“) erfolgen, sondern auch durch die Aufnahme von DNS (via Transformation, Transduktion oder Konjugation, „horizontale Weitergabe“), welche für einen Resistenzfaktor kodiert.

Abbildung: Resistenzerwerb durch Konjugation



Bakterien können via Sex-Pili Kontakt mit anderen Bakterien aufnehmen. Durch das Hohlrohr (Sex-Pilus) kann ein Plasmid, welches das Resistenzgen trägt, vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden.

Lokalisierung von Resistenzdeterminanten:

Ampicillin	Plasmid
Nalidixinsäure	chromosomal

1. Praktikumsversuch

Tag 3

- Inokulieren der Kontrollplatten mit Donor- resp. Akzeptorbouillon:
  - Platten auf der Unterseite mittels Fettstift in zwei Hälften teilen und beschriften:
    - MacConkey ohne Antibiotikum
    - MacConkey mit Ampicillin (AMP)
    - MacConkey mit Nalidixinsäure (NA)
    - MacConkey mit AMP und NA
  - Die Platten werden mit der Öse beimpft: Öse kurz ins Flüssigmedium eintauchen und die eine Plattenhälfte aller 4 Platten mit der Donor-, die andere Hälfte aller 4 Platten mit der Akzeptorbouillon beimpfen
  - Platten zur Bebrütung (37° C) in den Korb stellen
- Zusammenbringen von Donor und Akzeptor:
  - Ein Röhrchen beschriften
  - Je 500 µl der Donor- und der Akzeptorsuspension mittels Kolbenhubpipette in ein und dasselbe sterile Plastikröhrchen geben
  - Röhrchen zur Bebrütung (37° C) für eine Stunde in den Brutraum stellen; Röhrchen nach vorne bringen.
- Selektieren der Rekombinanten
  Beimpfen von je einer MacConkey-Platte mit dem Donor/Akzeptorgemisch:
    - MacConkey ohne Antibiotikum optional pro Bank
    - MacConkey mit Ampicillin (AMP) optional pro Bank
    - MacConkey mit Nalidixinsäure (NA) optional pro Bank
    - MacConkey mit AMP und NA, zwingend pro Gruppe
  - Dazu die Öse kurz ins Donor/Akzeptorgemisch eintauchen und jede Platte fraktioniert beimpfen
  - Kontrollplatten zur Bebrütung (37° C) in den Korb stellen

Tag 4

- Beurteilung der Kontrollplatten vor Mischung und der Konjugationsplatten am Tag 4

	Donor *E. coli* AMP^R, Lactose +	Akzeptor *E. coli* NA^R, Lactose -	Gemisch von Tag 3
MacConkey ohne Antibiotikum			(Demo-Platten)
MacConkey mit AMP			
MacConkey mit NA			
MacConkey mit AMP und NA			

- Beurteilen der Platten des Konjugatversuches im Vergleich zu den Kontrollplatten von Tag 3
  - Was hat die Konjugation bewirkt?

Darminfektionen manifestieren sich mit einem sehr breiten Spektrum von Symptomen und können schematisch in zwei grosse Gruppen eingeteilt werden. Die nicht-entzündlichen Infektionen führen meist zu Durchfällen ohne gleichzeitiges Fieber und werden durch Toxin bildende Organismen verursacht. Die bedeutendsten Vertreter dieser Gruppe sind *Vibrio cholerae* und die Enterotoxin bildenden *E. coli* (ETEC). Die entzündlichen Infektionen (Dysenteriesyndrom) werden durch Organismen verursacht, welche ins Darmepithel eindringen und dieses zerstören können, was zum klassischen Bild der Dysenterie mit blutig-schleimigen Stühlen von nur mässigem bis kleinem Volumen führt, oft von Fieber und Abdominalschmerzen begleitet. Typische Vertreter dieser Gruppe sind Shigellen / EIEC, Salmonellen und EHEC.

Die klinische Ausprägung der Symptome ist selten so typisch, dass mit grosser Wahrscheinlichkeit auf einen bestimmten Erreger geschlossen werden könnte. In der Praxis werden deshalb epidemiologische Überlegungen stärker gewichtet (Tabelle). Eine primäre Unterscheidung in die drei Gruppen Kinder bis ca. 10 Jahre, Erwachsene sowie Personen mit Reiseanamnese hat sich weitgehend bewährt. Bei nosokomialen Infektionen kommt vorwiegend *Clostridium difficile* in Frage.

	Kinder	Erwachsene	Reise-anam-nese	Diagnostik
Salmonella spp.	+++	+++	(✓)	Stuhlkultur
Shigella spp.	-	-	✓	Stuhlkultur
Campylobacter spp.	+++	+++	(✓)	Stuhlkultur
Yersinia spp.	++	+		Stuhlkultur
Aeromonas spp.	++	+	✓	Stuhlkultur
Plesiomonas shigelloides	-	-	(✓)	Stuhlkultur
Enterotoxin bildende *E. coli* (ETEC)	-	-	✓	PCR von Stuhlkultur
Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)	-	-	✓	PCR von Stuhlkultur
Verotoxin bildende *E. coli* (VTEC/EHEC)	+	+	(✓)	PCR von Stuhlkultur
Enteropathogene *E. coli* (EPEC)	+		(✓)	PCR von Stuhlkultur
Enteroaggregative *E. coli* (EntAggEC)	+++		✓	PCR von Stuhlkultur
Clostridium difficile	in allen Altersgruppen nach vorangehender Antibiotikatherapie			Toxinnachweis im Stuhl
Parasiten	+	+	✓	Mikroskopie Stuhl

Der Nachweis enteropathogener Bakterien erfolgt normalerweise durch Kultur aus dem Stuhl. Das Gram-Präparat gibt keinen Hinweis auf mögliche Erreger. Da die verschiedenen Pathotypen von *E. coli* phänotypisch nicht voneinander unterschieden werden können, müssen die entsprechenden Virulenzfaktoren (oder die dafür kodierenden Gene) nachgewiesen werden. Aus Gründen der Praktikabilität, der Sensitivität und der Geschwindigkeit steht hier die PCR im Vordergrund.
Serologische Untersuchungen sind wegen mangelnder Sensitivität selten hilfreich, haben aber bei extraintestinalen Komplikationen (z.B. postinfektiöse Arthritis) durchaus ihren Stellenwert.

1. Hektoen - Agar

Selektives und differentielles Nährmedium für die Kultur von Salmonellen und Shigellen aus Stuhlproben. Salmonellen bilden farblose Kolonien mit schwarzem Zentrum („Spiegeleier"), während Shigellen farblose bis grünliche Kolonien ohne schwarzes Zentrum bilden. Coliforme Keime (z.B. *E. coli*) sind gelb-orange.

Gallensalze 9 g/L (MacConkey-Agar nur 1.5 g/L)	Hemmung der meisten Gram-positiven Mikroorganismen sowie (in der Konzentration von 9 g/L) von vielen Enterobakteriazeen; gutes Wachstum von Salmonellen und Shigellen
Lactose / Saccharose	Lac+ und/oder Sac+ → gelbe Kolonien
Natrium-Thiosulfat / Fe-Ammonium-citrat	Bildung von H_2S aus Na-thiosulfat, führt zusammen mit Fe-Ammoniumcitrat zu einem schwarzen Präzipitat (FeS)

2. Tetrathionat-Bouillon

Selektivbouillon zur Anreicherung von Salmonellen. Gallensalze hemmen die Gram-positiven Keime. Tetrathionat inhibiert die meisten Enterobakteriazeen.

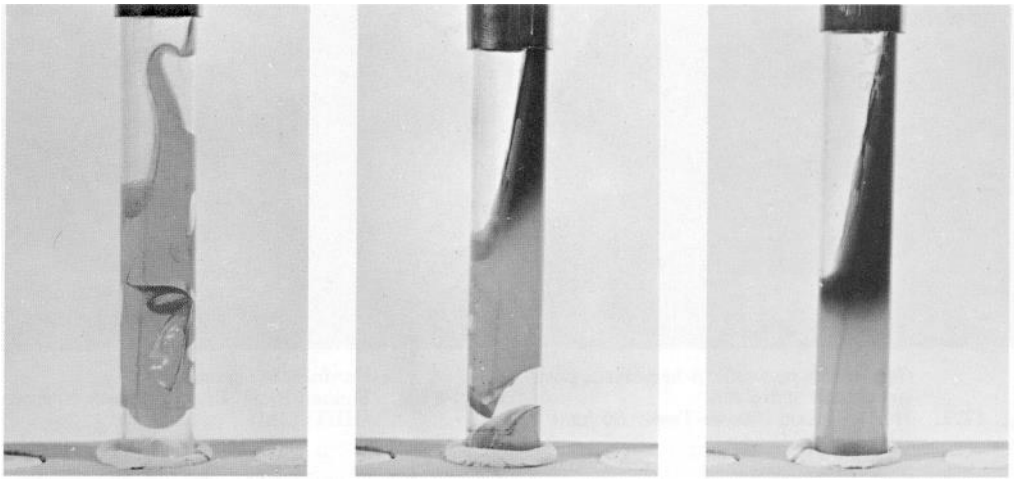
3. TSI-Schrägagar / MIO-Röhrchen

Identifikationsmedium, welches gleichzeitig die Prüfung der Säurebildung aus Glucose (0.1%) und Laktose/Saccharose (je 1%), der Gasbildung und der H_2S-Produktion erlaubt. Als pH-Indikator wird Phenolrot verwendet, welches im sauren Bereich eine gelbe, im alkalischen Bereich eine rote Farbe aufweist. Der TSI-Schrägagar ist eines der raffiniertesten Medien zu Identifikation von Bakterien.
Peptonabbau (nur in der obersten Schrägschicht, weil dazu Sauerstoff benötigt wird) führt zu einer Alkalinisierung. Wird nur Glucose fermentiert, reicht die damit verbundene Ansäuerung nicht aus, um die Alkalinisierung auf der Schrägfläche zu kompensieren. Die Schrägfläche ist rot. Die Hochschicht (Stich) hingegen ist gelb, weil unter den dortigen anaeroben Bedingungen das Pepton nicht abgebaut wird und damit keine Alkalinisierung erfolgt. Die Fermentation von Laktose und/oder Saccharose führt zu einer bedeutend grösseren Säurebildung, so dass auch die Schrägfläche sauer und damit gelb wird. Eine Gasentwicklung zeigt sich durch Blasenbildung in der Hochschicht und die Entwicklung von Schwefelwasserstoff (H_2S) durch eine Schwarzfärbung (Ausfällung von Eisensulfid).

Beimpfung: Mit der Impfnadel eine kleine Menge der zu untersuchenden Bakterienkolonie abnehmen und in das Kondenswasser am Grunde der Schrägfläche eintauchen. Von da aus die Schrägfläche in einer Wellenlinie bis zum oberen Rand beimpfen und mit der Nadel in der Mitte des Röhrchens bis zum Boden in den Agar einstechen (Reihenfolge nicht entscheidend).
Zusätzlich MIO (Motility, Indol, Ornithindecarboxylase) beimpfen (bis auf Boden einstechen)

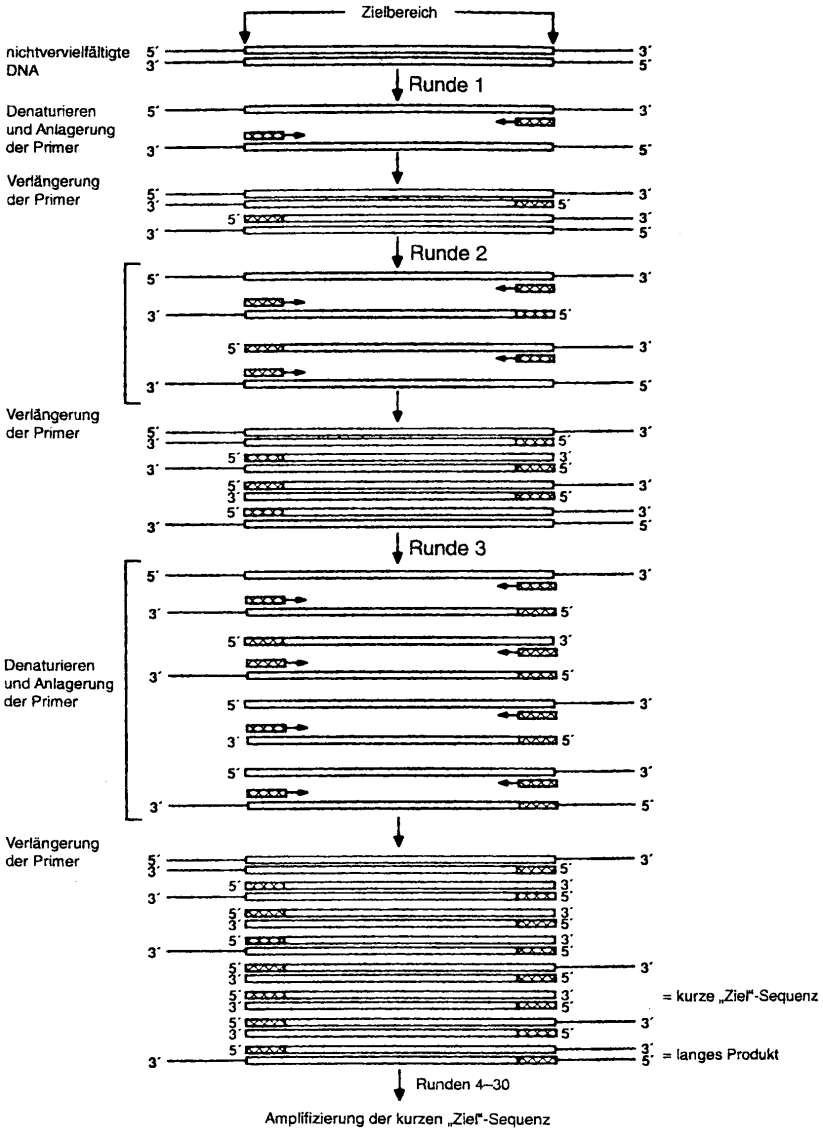
Hochschicht	Schrägagar	Gas-bildung	Beweg-lichkeit	Indol	Ornithinde-carboxylase	H2S-Bildung	Identifikation
gelb	gelb	+	+	+	+	-	*E. coli*
gelb	gelb	+	-	-	-	-	*K. pneumoniae*
gelb/schwarz	rot	Variabel = v	+	v	v	+	*Salmonella* sp.
gelb	rot	-	-	v	v	-	*Shigella* sp.
lachsrot-rot	rot-violett	-	Nicht an-wendbar=na	na	-	-	*Pseudomonas* sp., Oxidase +
lachsrot	lachsrot	-	na	na	na	-	unbeimpft

TSI-Schrägagar
(Triple-Sugar-Iron /
Dreizucker-Eisen-Agar)



4. Polymerase – Kettenreaktion (PCR) (Demo Tag 6)

Die PCR erlaubt die millionenfache selektive Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz. Die Spezifität dieser Reaktion für eine ausgesuchte Sequenz in der Ziel – DNA wird durch die Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden (Primer) erreicht, welche die ausgesuchte Sequenz sowohl auf dem (+)- als auch auf dem (-)-Strang der Ziel – DNA begrenzen. Nach Aufschmelzen durch Hitze (Denaturierung) der Ziel – DNA in zwei Einzelstränge lagern sich die Primer an ihre komplementären Sequenzen an und die zugesetzte DNA – Polymerase synthetisiert ausgehend von den beiden Primern neue DNA – Stränge. Dieser Vervielfältigungsschritt kann in einem Reaktionsansatz mehrfach wiederholt werden, da durch die Thermoresistenz der verwendeten DNA - Polymerase (*Taq*Polymerase, stammt von dem aus heissen Quellen isolierten thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*) die neu synthetisierten DNA-Stücke wieder aufgeschmolzen werden können, ohne dass das Enzym inaktiviert würde. Nach 40 Zyklen liegen etwa 10^9 Kopien der ausgesuchten DNA-Sequenz vor.



5. DNA-Sequenzierung (Demo Tag 6 / 7)

Die Bestimmung der Basenabfolge der DNA ist die detaillierteste Analyse eines PCR-Amplifikationsproduktes. Automatisierte Verfahren ermöglichen die routinemässige Durchführung von DNA Sequenzierungen. Die ermittelten DNA Sequenzen werden mit Referenzsequenzen oder Sequenzen, die in öffentlichen Datenbanken abgelegt sind, verglichen. Dieser Sequenzvergleich erlaubt die Identifikation von Mikroorganismen, den Nachweis von Mutationen, welche Antibiotikaresistenzen vermitteln, oder die Entdeckung neuer Spezies.

6. Bakterielle Breitspektrum PCR (Demo Tag 6 / 7)

Die Sequenzanalyse des 16S-rRNA-Gens ist eine universell einsetzbare Technologie für die Identifikation von Bakterien. Der Keimnachweis mittels bakterieller Breitspektrum-PCR beruht auf der Gen-Amplifikation mittels hochkonservierter Teile des 16S-rRNA-Gens. Da die PCR Primer an hochkonservierte Teile des 16S-rRNA-Gens binden, wird theoretisch jedwedes bakterielle 16S-rRNA-Gen amplifiziert (Breitspektrum). Die DNA Sequenzbestimmung der variablen Teile erlauben eine Identifizierung **(siehe Figur 1 auf der nächsten Seite 37)**. Wegen der hohen Sensitivität besteht immer die Gefahr von Umwelt- und Laborkontaminationen. Die Breitspektrum PCR ist in der Regel nicht geeignet für nicht sterile, klinische Materialien oder für die Analyse von Mischinfektionen.

7. Real-Time PCR (Demo Tag 6 / 7)

Die Real-Time (RT) PCR-Verfahren zeichnen sich dadurch aus, dass während des PCR-Ablaufs die Produktion des Amplifikates nachverfolgt wird (real time). Das Amplifikat wird direkt mit Hilfe von in DNA interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffen oder indirekt mit Sonden (Oligonukleotiden), die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind, nachgewiesen. RT-PCR Verfahren bringen Vorteile bezüglich Sensitivität, Spezifizität, Quantifizierbarkeit, Zuverlässigkeit und Geschwindigkeit mit sich **(siehe Figur 2 auf der nächsten Seite 37)**. RT-PCR Verfahren werden vielfach in der Diagnostik von Krankheitserregern eingesetzt.

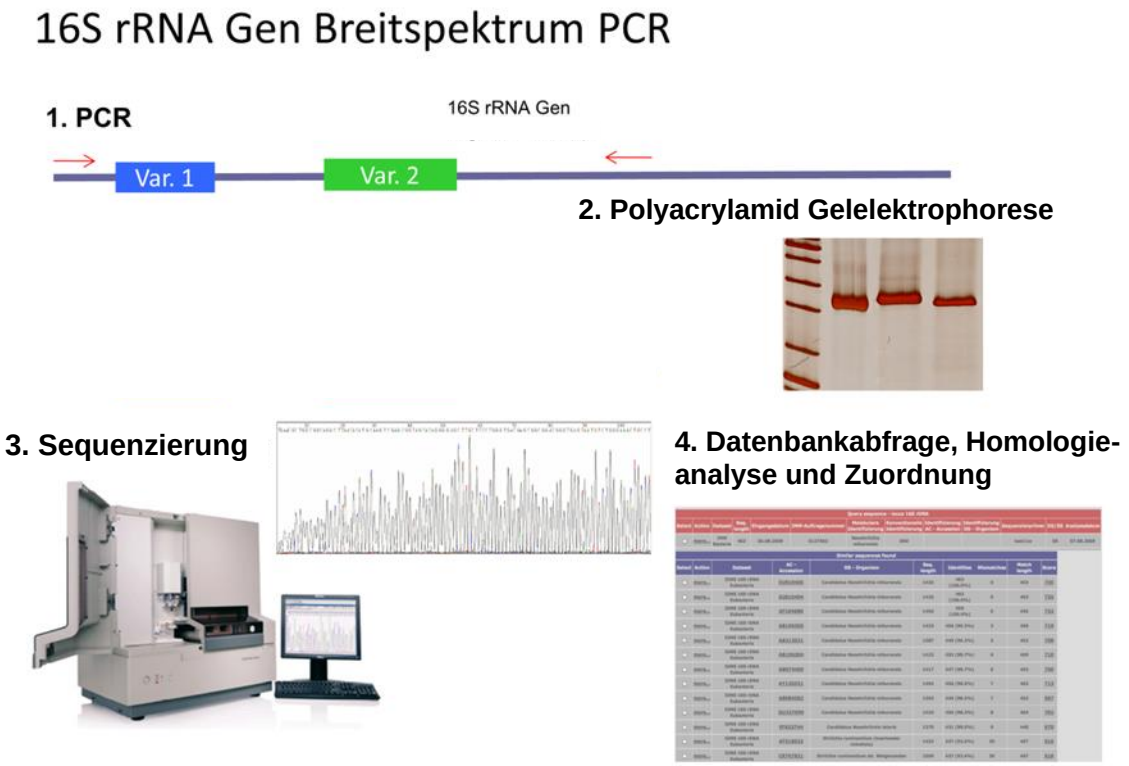


Fig. 1. 16S-rRNA-Genamplifikation und Sequenzanalyse. Die PCR amplifiziert ein Fragment des Zielgens, welches hypervariable Regionen beinhaltet. Das so erzeugte Amplifikat wird sequenziert; die Sequenz wird dann mit Hilfe von Sequenzdatenbanken einer bestimmten Spezies, einem Genus oder einer Familie zugeordnet.

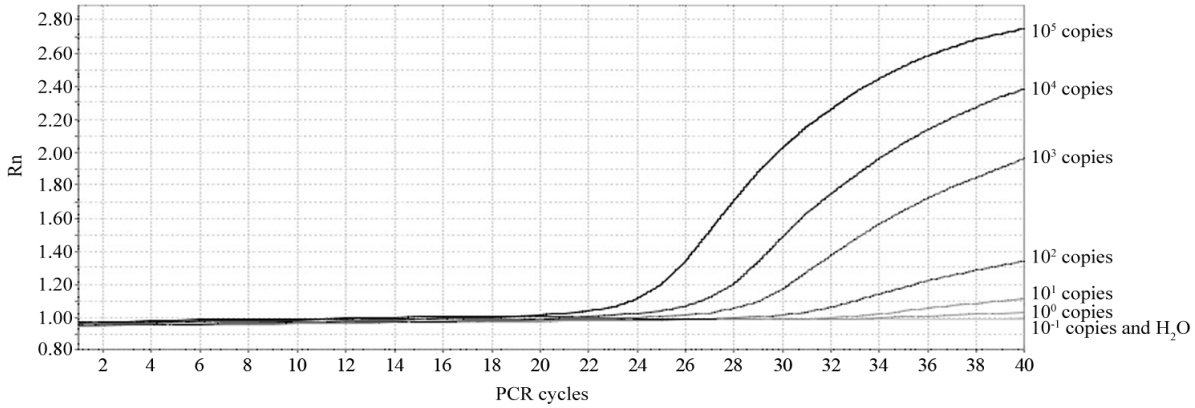


Fig. 2. Analytische Sensitivität einer real time PCR für den Nachweis von *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis mit dem 16S-rRNA-Gen als Zielsequenz (Maurer F et al. (2013) J Clin Microbiol 51:169-76).

8. Line-Probe Assay (Tag 6 / 7)

Das Prinzip des Line-Probe Assays (Streifentest) beruht auf der Hybridisierung (nicht kovalente Bindung) von PCR-Amplifikaten mit verschiedenen spezifischen Zielsequenzen (DNA-Sonden), die an eine Membran gebunden sind (oft Nylonstreifen). Die verschiedenen Sonden sind als Banden auf dem Streifen angebracht. Nach Hybridisierung werden die hybridisierten PCR-Amplifikate sichtbar und das entstandene Bandenmuster kann wie ein Barcode ausgelesen werden.
Line-Probe Assays werden zum Beispiel zur Spezies-Identifikation oder zum Nachweis von Genen oder Mutationen, die mit Antibiotikaresistenzen assoziiert sind (molekulare Resistenztestung; Fig. 3), eingesetzt.

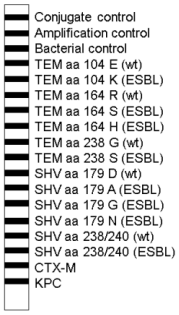


Fig. 3. Line-Probe Assay zum Nachweis von ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) und KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) Antibiotikaresistenz-genen. Die Streifen enthalten Sonden zum Nachweis von ESBL-Mutationen in TEM und SHV-Lactamase-Genen sowie Sonden zum Nachweis von CTX-M ESBL Genen. KPC ist eine Carbapenamase, die bei *K. pneumoniae* und anderen *Enterobacteriaceae* vorkommt.

9. Whole Genome Sequencing (WGS) (Tag 6 / 7)

Die Sequenzierung eines kompletten Genoms (Whole Genome Sequencing) wird dank jüngster technologischer Entwicklungen (z.B. Next Generation Sequencing, NGS) immer besser und schneller. Mittlerweile sind Genomsequenzen von hunderten verschiedenen Bakterienspezies bestimmt worden. Aktuell kostet die Bestimmung einer Genomsequenz rund CHF 300-2000. Die bioinformatische Analyse von Genomsequenzen stellt eine grosse Herausforderung dar. Die Genomsequenzierung wird immer häufiger für medizinische Fragestellungen angewendet, zum Beispiel bei einer Epidemie wie 2011 in Deutschland (*E. coli* O104:H4) oder bei viralen Infektionsausbrüchen wie Ebola oder MERS. In der Routinediagnostik wird die Whole Genome Sequenzierung, abgesehen von der HIV-Diagnostik, noch wenig eingesetzt, vor allem wegen des Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwandes.

10. Praktikumsversuch

Untersuchungsmaterial: Stuhlprobe eines Patienten mit Brechdurchfall und Bauchkrämpfen

Tag 2	Stuhlprobe - fraktioniertes Beimpfen Hektoen-Agar 1 und MacConkey-Agar 1 - Beimpfung Tetrathionat-Bouillon (1 Öse Stuhlprobe)	
Tag 3	Überimpfung der Tetrathionat-Bouillon auf Hektoen-Agar 2 und MacConkey-Agar 2	Beurteilung Kulturen 1 - Koloniemorphologie - Verhältnis der verschiedenen Keime Hektoen-Agar 1 MacConkey-Agar 1 - TSI-Schrägagar von Hektoen-Agar beimpfen - Ansetzen MIO (Motility, Indol, Ornithindecarboxylase) Weichagar
Tag 4	Beurteilung Kulturen 2 - Koloniemorphologie - Verhältnis der verschiedenen Keime Hektoen-Agar 2 MacConkey-Agar 2	- Beurteilung TSI-Schrägagar - Beurteilung von MIO-Röhrchen - Vergleich Hektoen 1 mit Hektoen 2 sowie Mac Conkey 1 mit Mac Conkey 2

Infektionen der Luftwege gehören beim Menschen zu den häufigsten Erkrankungen und weisen unterschiedliche Lokalisationen sowie ein breites Erregerspektrum (vor allem Viren, Bakterien) auf.

Oberer Respirationstrakt

Dazu zählen die Atemwege bis zur Epiglottis. Die Lokalisation des Infekts ist für die Frage der Kolonisationsflora von Bedeutung. In den Nasennebenhöhlen ist z. B. eine solche Flora nicht vorhanden. Das Keimspektrum des oberen Respirationstraktes umfasst verschiedenste fakultativ pathogene Mikroorganismen aus Mund, Rachen und Nase. Dagegen sind obligat pathogene Krankheitserreger (*Corynebacterium diphtheriae*) selten.

– *Erkältung/Grippaler Infekt*
  Akute Rhinopharyngitis und Katarrh mit leichten Beschwerden, ggf. Fieber.
  Erreger: Rhinoviren, Respiratory Syncytial Virus, Coronaviren, Parainfluenza-, Adeno-, Reo-, Entero- und Influenza-Viren

– *Otitis media*
  Ansammlung von Flüssigkeit im Mittelohr mit akuten Krankheitszeichen als Komplikation einer viralen Rhinitis. Initial Vorliegen eines serösen Exsudates, welches bei bakteriologischer Infektion eitrig werden kann.
  Erreger: Häufig Sekundärinfektion durch Bakterien (*Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus*)
  Chronische Otitis media: Oft polymikrobiell (*Pseudomonas aeruginosa, S. aureus, Enterobacteriaceae,* Anaerobier*)*.

– *Sinusitis*
  Infektion der Nasennebenhöhlen, ebenfalls meistens als Komplikation einer viralen Rhinitis.
  Erreger: *S. pneumoniae, H. influenzae, M. catarrhalis, S. pyogenes*, *S. aureus*, Anaerobier, Viren. Häufig Mischinfektion.
  Chronische Sinusitis: *P. aeruginosa*

– *Weitere Erkrankungen des oberen Respirationstraktes*
  Akute Pharyngitis (Viren, Streptokokken Gr. A)
  Tonsillitis (Streptokokken Gr. A)
  Diphtherie (*Corynebacterium diphtheriae)*
  Epiglottitis (*H. influenzae*)
  Otitis externa (*S. aureus, S. pyogenes;* u.U. *P. aeruginosa*; *Aspergillus* spp.)

– Bei der selbstlimitierenden Erkältung (grippaler Infekt) ist ein Erregernachweis überflüssig, nicht aber bei schweren Krankheitsverläufen oder bakteriellen Superinfektionen.

Unterer Respirationstrakt

Dazu zählen u.a. ambulant oder nosokomial erworbene Pneumonien, Bronchitiden, Lungenabszesse und Tuberkulose.

- *Ambulant erworbene Pneumonie*
  Je nach Alter des Patienten kommen verschiedene Erreger in Frage! Beim Neugeborenen stehen Streptokokken der Gr. B im Vordergrund, bis zum Alter von ca. 3 Monaten dominieren *S. pneumoniae*, *H. influenzae* oder Viren. Bei Kindern und Jugendlichen können vorwiegend *S. aureus, S. pneumoniae, H. influenzae*, *M. pneumoniae* oder Viren Pneumonien verursachen, zwischen 18 und ca. 45 Jahren häufig auch Chlamydien.

Pneumonien bei älteren Patienten werden hingegen eher durch *S. pneumoniae*, *Legionella* spp., *S. aureus* oder Gram-negative Erreger verursacht. Prädisponierende Faktoren für eine ambulant erworbene Pneumonie sind u.a. Cystische Fibrose, COPD (chronic obstructive pulmonary disease) oder auch Alkoholismus.

- *Nosokomial erworbene Pneumonie*
  Das Erregerspektrum ist abhängig von lokalen Faktoren! Häufig bei intubierten Patienten sind *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp.), *S. aureus*.

- *Bronchitis*
  Erreger: Hauptsächlich Viren (Influenza-, Parainfluenza-, Adeno-, Rhino-, Corona-Viren etc.), seltener Bakterien (*M. pneumoniae, Bordetella pertussis, L. pneumoniae, H. influenzae, M. catarrhalis*).
  Die akute Exazerbation einer chronischen Bronchitis wird durch Bakterien, welche sich im vorgeschädigten Respirationstrakt ansiedeln, verursacht: *S. pneumoniae, H. influenzae, S. aureus, Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*.

- *Lungenabszess*
  Bei Aspiration dominiert Mischflora aus der Mundhöhle (z. B. Anaerobier), bei nekrotisierender Pneumonie *S. aureus und Klebsiella pneumoniae,* bei granulomatöser Pneumonie *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp., bei septischen Metastasen der jeweilige Sepsiserreger (z. B. *S. aureus, E. coli*).

M. tuberculosis und nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) werden in Kap. 12 behandelt

Infektionen mit *P. aeruginosa* treten bei immunkompetenten Patienten nur selten auf. Man beobachtet sie vor allem bei intubierten Patienten, Patienten mit Cystischer Fibrose, Verbrennungswunden, maligner Otitis externa etc.
P. aeruginosa bildet auf SBA üppige, graue Kolonien, welche 'Metallglanz' haben. Auf MacConkey-Agar bilden sie transparente, Lactose-negative Kolonien. Häufig ist ein grünliches Pigment (Pyocyanin) sichtbar. *P. aeruginosa* weist ausserdem einen charakteristischen süsslichen Geruch auf.

1. Untersuchungsmaterialien

- Eine bakteriologische Untersuchung von Sputum ist nur dann sinnvoll, wenn das Sputum nicht übermässig mit Mundflora kontaminiert ist. Mikroskopisches Kriterium: < 25 Mundepithelzellen pro Blickfeld bei einer Vergrösserung von 100x (10 x 10).
- Für Sputum wie auch für Tracheal- und Bronchialsekret gilt, dass die Materialien bis zum Transport bei 4 °C gekühlt werden müssen, um ein Überwuchern der Keime der Mundflora zu verhindern.
- Wird Lungenpunktat entnommen, ist an die Anaerobier zu denken, d.h., das Material muss in einem entsprechenden Versandmedium (z. B. eSwab®) eingesandt werden.
- Nachweisverfahren für *Nocardia* sp., *Legionella* sp., *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Actinomyces* sp. sowie Mykobakterien sind Spezialuntersuchungen und werden von der Bakteriologie nicht 'automatisch' abgedeckt. Sie müssen vom Arzt speziell angefordert werden!

2. Praktikumsversuch 1

Untersuchungsmaterial I: Sputum eines Patienten mit einer Lobärpneumonie

<table>
<tr><td>Tag 4</td><td colspan="2">- Gram-Färbung eines vorbereiteten Präparates (Anleitung Seite 2)
• Sputumqualität (Anwesenheit von Epithelzellen)
• Leukocyten
• Mikroorganismen
- Fraktioniertes Beimpfen einer Schafblutplatte und eines MacConkey Agars</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Tag 5</td><td colspan="2">- Beurteilung der Medien
- Fraktionierungsqualität
- Zeichnung, Beschreibung der Kolonien</td></tr>
<tr><td>Schafblutagar</td><td>MacConkey Agar</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
</table>

3. Praktikumsversuch 2

Untersuchungsmaterial II: Sputum eines Patienten mit Cystischer Fibrose

Tag 4

- Gramfärbung eines vorbereiteten Präparates (Anleitung **Seite 2**)
  - Sputumqualität (Anwesenheit von Epithelzellen)
  - Leukocyten
  - Mikroorganismen
- Fraktioniertes Beimpfen einer Schafblutplatte und eines MacConkey Agars

Tag 5

- Beurteilung der Medien
- Fraktionierungsqualität
- Zeichnung, Beschreibung der Kolonien
- Demonstration: Oxidase-Test von *Pseudomonas aeruginosa* – verdächtigen Kolonien: Nachweis der Cytochromoxidase mittels Tetramethyl-p-phenylendiamin dihydrochlorid. Mit Öse wenig Kolonienmaterial von der SBA-Platte auf 'Dry Slide Oxidase' streichen. Bei positiver Reaktion tritt sofort (innerhalb von maximal 10 Sekunden) eine Violettfärbung ein.
  Im Gegensatz zu *P. aeruginosa* (Oxidase-positiv) sind Enterobakteriazeen Oxidase-negativ (Negativ-Kontrolle).

Schafblutagar	MacConkey Agar
Oxidase *P. aeruginosa*: Negativkontrolle mit *E. coli*:	

- Ablesung der Resistenzprüfung von *P. aeruginosa* gemäss folgender Tabelle (Demoplatte)

Antibiotikum	**Abkürzung µg**	**Hemmhof (mm)**			**Resultat**	
		R	**I**	**S**	**mm**	**R/I/S**
Ampicillin	AM 10	Keine Hemmhöfe, weil nach Richtlinien als resistent zu betrachten				**R**
Cefalotin	CF 30					**R**
Ceftriaxon	CRO 30					**R**
Ceftazidim	CAZ 30	≤16	17-49	≥50		
Cefepim	FEP 30	≤20	21-49	≥50		
Piperacillin/ Tazobactam	TZP 10	≤17	18-49	≥50		
Imipenem	IMP 10	≤19	20-49	≥50		

Prinzipiell können alle Bakterien eine Sepsis hervorrufen, die Häufigkeit einzelner Erreger variiert jedoch je nach Patienten-Population. Ausserdem besteht das Problem einer Kontamination, vor allem bei Blutentnahme durch i.v. Katheter (Beispiele: Koagulase-negative Staphylokokken, Propionibakterien, Corynebakterien als typische Hautkontaminanten).

Erreger – Statistik USZ 1997

Mikroorganismus	**Blutkultur-Isolate %**	**Septikämische Episoden %**
Koagulase-negative Staphylokokken	19.2	8.6
Escherichia coli	15.7	21.0
Staphylococcus aureus	14.7	17.1
Streptococcus pneumoniae	3.7	5.7
Andere Streptokokken	9.1	8.8
Klebsiella spp.	4.3	6.0
Enterokokken	3.5	2.0
Pseudomonas aeruginosa	3.0	2.8
Enterobacter spp.	5.0	4.9
Proteus spp.	1.0	1.6
Serratia spp.	0.9	1.0
Andere Gram-negative Stäbchen	5.6	5.2
Pilze	0.9	2.1
Weitere Arten / polymikrobielle Septikämien	13.4	13

Assoziation bestimmter Erreger mit bestimmten Krankheiten:

- Vergründende Streptokokken — Endocarditis
- *Streptococcus anginosus*-Gruppe (früher als *Streptococcus milleri*-Gruppe bezeichnet) — Abszesse
- *Streptococcus bovis* (jetzt *S. gallolyticus* bezeichnet) — Malignom im Gastrointestinaltrakt
- *S. aureus* — Endocarditis bei i.v.-Drogenabusus
- *S. pneumoniae* — HIV, Morbus Hodgkin

1. Blutentnahme für Blutkulturen

- Desinfektion der Gummimembran der Blutkulturflasche
- Desinfektion der Entnahmestelle (Alkohol, Iodophor)
- Venenpunktion ohne weiteres Betasten der Punktionsstelle
- Mit Spritze je 5 – 10 ml venöses Nativblut unter sterilen Kautelen in eine aerobe und anaerobe Kulturflasche mit Bouillon überführen (2 Flaschen entsprechen einem Set)
- Abnahme 2 – 3 mal innerhalb 2 bis 24 Stunden, **vor** Beginn der Antibiotikatherapie!

2. Automatisierte Blutkultursysteme

- Durch kontinuierliche CO_2-Messung wird Wachstum automatisch signalisiert
- Positive Flaschen werden weiter bearbeitet

BacT/ALERT Blutkultursystem (älteres und neues System):

3. Praktikumsversuch

Untersuchungsmaterial: I) Blut von Patient mit akutem Abdomen

II) Blut von Patient mit Verdacht auf Endocarditis lenta

Tag 4	• ***Stopfen der Blutkulturflaschen desinfizieren*** • Blut mit Spezialnadel aus der anaeroben Flasche entnehmen • Von den anaeroben Flaschen eine Blut- und eine MacConkey-Platte beimpfen Demonstration zuerst verfolgen, dann selber machen • Platten in den Korb auf Korpus bringen. Bebrütung bei 37°C (aerob) • Beurteilung der Dauerpräparate (23, 24, 25)
Tag 5	• Platten beurteilen (auch Demoplatte von Blutkultur I, anaerob bebrütet) • Katalase von Kolonien der Blutkultur II

	Blutkultur I		Blutkultur II	
	Kolonien	Gram	Kolonien	Gram
		von aerober Flasche Dauerpräparat Nr. 24 rote Stäbchen		von aerober Flasche Dauerpräparat Nr. 23 Streptokokken (Ketten blauer Kokken) GPKK (gram-positive Kokken in Ketten)
		von anaerober Flasche Dauerpräparat Nr. 25 rote und blaue Stäbchen (rot:Gram-negativ blau:Gram-positiv)		von anaerober Flasche Dauerpräparat Nr. 23
Subkulturen:		GPS: gram-positive Stäbchen (		
MacConkey	von anaerober Flasche, aber aerob bebrütet		von aerober Flasche	
Blutplatte	von anaerober Flasche, aber aerob bebrütet		von aerober Flasche	
Weiterführende Diagnostik	(Biochemie, Resistenzprüfung)		Katalase: (Biochemie, Resistenzprüfung)	

Alter, epidemiologische und prädisponierende Faktoren bestimmen unter anderem die Häufigkeit der einzelnen Erreger:

- *S. pneumoniae* : Kinder, Erwachsene und alte Patienten; Immunsuppression, Alkoholismus, Diabetes mellitus
- *N. meningitidis* : Kinder und vor allem junge Erwachsene; Erkrankungen in Kollektiven (Tröpfcheninfektion!)
- *H. influenzae :* (Serotyp b) Kinder
- *L. monocytogenes* : Neugeborene, Säuglinge, alte Patienten; Schwangere, Immunsuppression
- Gr. B – Streptokokken : Neugeborene und Säuglinge
- *E. coli* : Neugeborene, Kleinkinder, nosokomiale Infektionen

Den häufigsten bakteriellen Meningitis-Erregern – *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae* – ist gemeinsam, dass sie den Nasopharynxraum kolonisieren (asymptomatisches Trägertum). Die bei diesen Erregern vorhandene Polysaccharidkapsel erschwert eine Phagocytose und erleichtert dadurch eine Dissemination.

1. Untersuchungsmaterial und Diagnostik

Liquor	Lumbalpunktion mit steriler Entnahme von mind. 2 ml, möglichst ohne Blutbeimischung
Blutkultur	siehe **Kapitel 10**

<u>Untersuchungsgang für Bakterien:</u> Anreicherung durch Zentrifugation → Sediment →

- Gram- und Methylenblaufärbung: Beurteilung von Mikroorganismen und Leukozyten (polymorphkernig, mononukleär); **wichtige Schnelldiagnostik, welche oft eine präsumtive Erregeridentifikation erlaubt**
- Beimpfung von mindestens Schafblut- und Kochblutagar (Schoggiagar)
- Bebrütung bei 5% CO_2
- Differenzierung und Resistenzprüfung aller gewachsenen Keime; bei Verdacht auf Meningokokken müssen Kulturen in der Sicherheitswerkbank weiter bearbeitet werden!

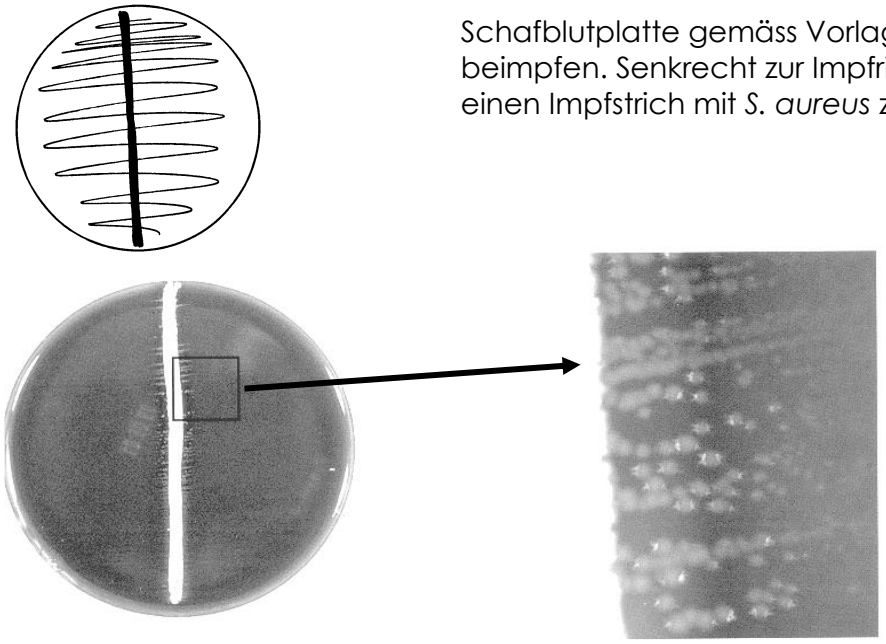
<u>Untersuchungsgang für Pilze:</u> siehe **Kapitel 13**

2. Charakterisierung häufiger Erreger

- *Streptococcus pneumoniae*: Gallelöslichkeit, Katalase -, siehe Vorlesung
- *Neisseria meningitidis*:
  - Gram-negative Diplokokken
  - glatte, grau-opake, flache Kolonien auf SBA
  - Oxidase positiv – Oxidasetestung (Anleitung **Seite 43**)
  - Biochemie
- *Listeria monocytogenes*:
  - kurze bis kokkoide Gram-positive Stäbchen
  - kleine grauweisse Kolonien mit schwacher β-Hämolyse auf SBA
  - Beweglichkeit vorhanden bei Zimmertemperatur, fehlend bei 37°C
  - Biochemie

- *Haemophilus influenzae:*
  - feine, kurze Gram-negative Stäbchen
  - glatte, transparente Kolonien (1 – 2 mm Durchmesser) auf Kochblutagar (auch Schoggi-Plate genannt)
  - Abhängigkeit von X – und V – Faktor
  - Bestimmung von Serotyp b

3. Ammenwachstum (Demoplatte Kurs 4)



Schafblutplatte gemäss Vorlage beimpfen. Senkrecht zur Impfrichtung einen Impfstrich mit *S. aureus* ziehen.

Mit dem Ammenphänomen wird die Abhängigkeit von *H. influenzae* von X- (Hämin) und V-Faktor (NAD bzw. NADP) nachgewiesen. V-Faktor ist in üblichen Blutplatten nur ungenügend vorhanden, wird von einigen Bakterien, z. B. *S. aureus*, jedoch im Überschuss produziert und in das Medium abgegeben. Gleichzeitig bewirkt die Hämolyse durch *S. aureus* die Freisetzung von X-Faktor aus Erythrozyten. In unmittelbarer Nähe von *S. aureus* können deshalb Kolonien von *H. influenzae* wachsen. In der „Schoggiplatte", die durch Zusatz von sorgfältig erhitztem Blut zum Agar und Zufügen von V-Faktor hergestellt werden kann, enthält X- und V-Faktor in genügender Menge, so dass ein gutes Wachstum ohne Amme möglich ist.

	Ammenwachstum V-Faktor (NAD) - Abhängigkeit	X-Faktor –(Hämin) Abhängigkeit	Hämolyse auf SBA
H. influenzae	+	+	-
H. parainfluenzae	+	-	-
H. haemolyticus	+	+	+
H. parahaemolyticus	+	-	+

4. Praktikumsversuch 1

Untersuchungsmaterial I: Liquor von Rekrut mit Kopfschmerzen (Meningitisverdacht)

Tag 5	• Grampräparat beurteilen (Dauerpräparat Nr. 21) • Weitere Demo-Präparate (Methylenblau und Gram) • Kulturen beurteilen • Oxidase testen (Anleitung **Seite 43**)

Mykobakterien sind aerobe, unbewegliche, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien, die sich von den meisten anderen Bakterien durch ihren Gehalt an Wachsen in der Zellwand und durch eine hohe Beständigkeit gegenüber Säuren und Basen unterscheiden.

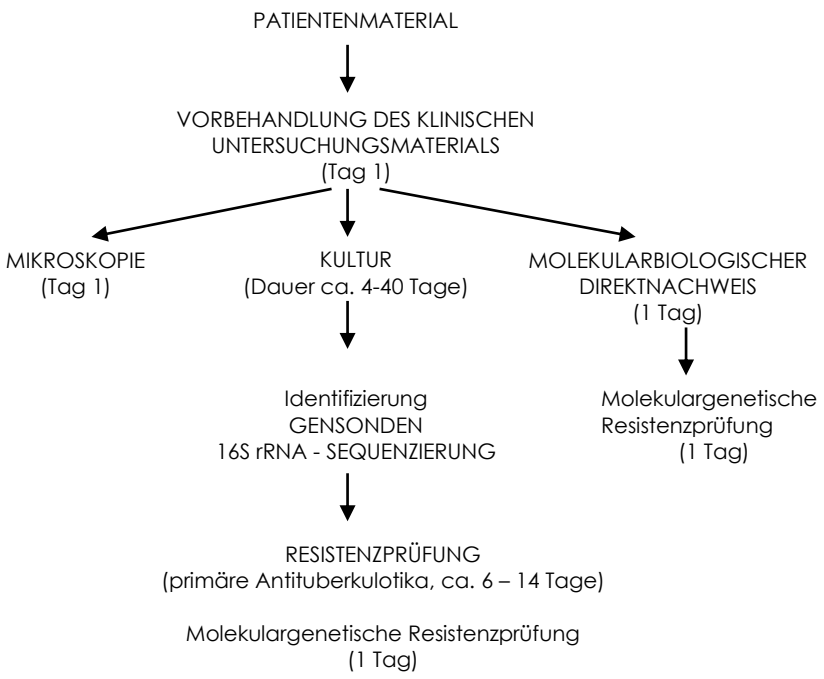
Den Erregern der klassischen Tuberkulose (TB), *M. tuberculosis*-Komplex (*M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti, M. canettii*) und der Lepra (*M. leprae*) werden die nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTM) gegenübergestellt. Diese Bakterien kommen in der Umwelt vor und sind meist fakultativ pathogen. Mykobakteriosen beobachtet man sowohl bei immunsupprimierten Patienten (z.B. AIDS/*M. avium*-Komplex) als auch bei immunkompetenten Individuen (z.B. Bronchiektasen / *M. avium*-Komplex; Schwimmbadgranulom / *M. marinum*). Aufgrund des langsamen Wachstums der meisten Mykobakterien (Generationszeit *M. tuberculosis* ca. 18 h versus *E. coli* 20 min) stellt diese Gruppe spezielle Ansprüche an ein Diagnostiklabor; diese betreffen:

1. Färbemethoden (Ziehl-Neelsen, Auramin)
2. Pathogenität (*M. tuberculosis* ist ein pathogener Organismus der Gruppe 3, besonderes Problem: Aerosolbildung! → Arbeiten unter der Sicherheitswerkbank)
3. Untersuchung nicht sterilen Untersuchungsmaterials, z. B. Sputum und Urin, welches eine spezielle Vorbehandlung (Dekontamination, z. B. mit *N*-Acetyl-L-Cystein-NaOH) erfordert.

Die Vorbehandlung eliminiert nicht erwünschte (rascher wachsende) Keime und erlaubt dadurch das Wachstum von Mykobakterien. Schliesslich verlangen Mykobakterien spezielle Nährmedien (z. B. Middlebrook-Agar). Auf den in der Bakteriologie üblichen Medien wachsen sie in der Regel nicht, d.h. bei Verdacht auf TB muss vom Arzt eine mykobakteriologische Diagnostik gezielt angefordert werden.

Spezies (ausgewählte Beispiele)	**Krankheiten**
OBLIGAT PATHOGEN	
M. tuberculosis-Komplex	Tuberkulose
M. leprae	Lepra
M. ulcerans	Haut (z.B. Buruli-Ulkus)
FAKULTATIV PATHOGEN	
<u>Langsamwachsende nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM)</u>	
M. avium/intracellulare	Lymphknoten, Lunge; generalisierte Mykobakteriose (AIDS)
M. genavense	Lymphknoten; generalisierte Mykobakteriose (AIDS)
M. haemophilum	Haut, Lunge
M. kansasii	Lunge, Lymphknoten
M. lentiflavum	Lunge, Lymphknoten
M. marinum	Haut (Schwimmbad!)
M. malmoense	Lunge, Lymphknoten
M. scrofulaceum	Lymphknoten, Lunge
M. simiae	Lunge
M. szulgai	Lunge
M. xenopi	Lunge
<u>Schnellwachsende NTM</u>	
M. abscessus	Lunge, Abszesse (iatrogen)
M. chelonae	Hautinfektionen, Abszesse (iatrogen)
M. fortuitum	Lunge, Abszesse (iatrogen)

Flussdiagramm der mykobakteriologischen Diagnostik



1. Diagnostik – Traditionelle Methoden

Die Einführung von Flüssigmedien (MGIT, MB/BacT, ESP Culture System II etc.) hat die Kulturdauer von Mykobakterien erheblich verkürzt (Vergleich: Löwenstein-Jensen, 4-8 Wochen; Flüssigmedium, 1-3 Wochen). Die traditionellen biochemischen Methoden, welche über Jahrzehnte für die Identifizierung von Mykobakterien eingesetzt worden sind, haben im Diagnostiklabor praktisch ausgedient. Hauptgründe sind die lange Zeitdauer (mehrere Wochen!) bis zur Verfügbarkeit der Resultate und vor allem der Umstand, dass die biochemischen Tests viel zu wenig zwischen den einzelnen Spezies zu diskriminieren vermögen. Heutiger Standard ist deshalb die molekularbiologische Identifizierung (siehe unten).

2. Diagnostik – Molekulargenetische Methoden

Mit der Anwendung molekularbiologischer Verfahren hat in der Tuberkulose-Diagnostik in den letzten 20 Jahren ein Durchbruch stattgefunden. Neue Wege stehen offen für eine rasche Identifizierung von Mykobakterien, für den Direktnachweis einer TB oder einer Mykobakteriose, für molekulargenetische Resistenzprüfungen und für epidemiologische Fragestellungen.

2.1. Identifizierung von Mykobakterien

Ab Kultur können Gensonden eingesetzt werden, welche eine Speziesidentifizierung innert kürzester Zeit (ca. 2 h) liefern. Allerdings gibt es nur für wenige Taxa / Arten solche kommerziell erhältlichen Sonden (*M. tuberculosis*-Komplex, *M. avium*-Komplex, *M. avium*, *M. intracellulare, M. kansasii, M. gordonae*).
Den grössten Stellenwert in der modernen Identifizierung von Mykobakterien nimmt die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens ein. Zu diesem Zweck wird die DNA in einem ersten Schritt extrahiert. Die gewünschten Genfragmente werden anschliessend mittels einer Genamplifikationsreaktion (z.B. PCR) amplifiziert (vermehrt). Die Analyse der Amplifikationsprodukte kann dann via Ermittlung der Nukleinsäuresequenz erfolgen (Fig. 1). Grundlage dieser Technik ist das Vorhandensein von Sequenzabschnitten, in welchen die Mykobakterien eine speziesspezifische Nukleinsäurensequenz aufweisen (Fig. 2).

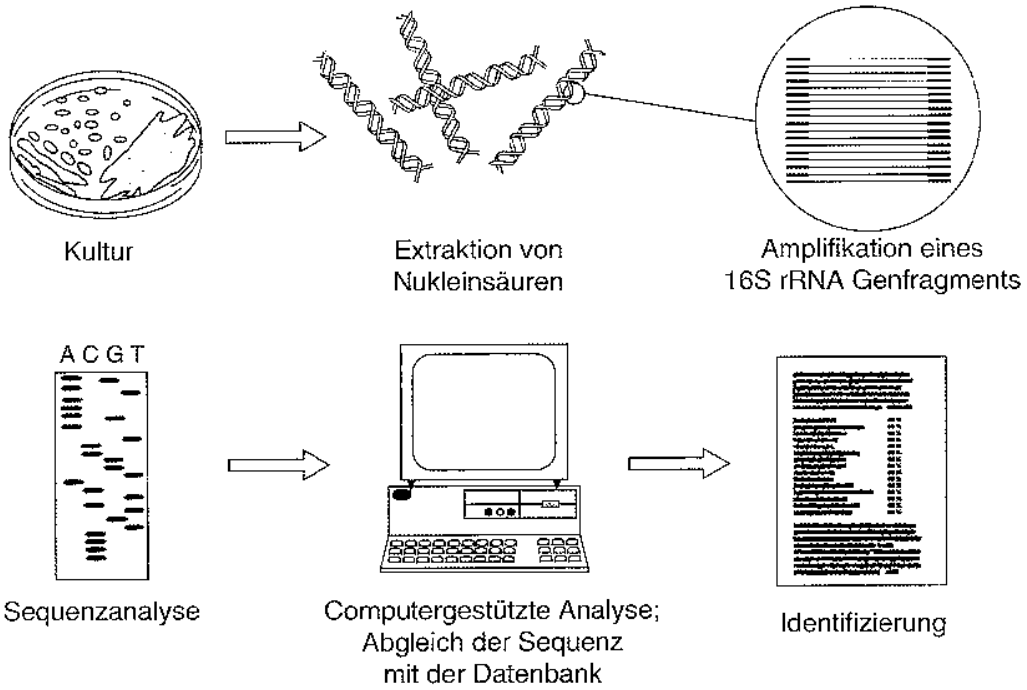


Fig. 1. Identifizierung von Mykobakterien mittels 16S rDNA-Sequenzanalyse

```
TACCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCT-TGTGGT        M. tuberculosis-Komplex
................TT.GC.....G..-......        M. simiae
.....A........G.AT.C......GTG-......        M. nonchromogenicum
...............T...........TC-......        M. terrae
...............TTCTGC......GG-G.....        M. xenopi
.....A..........A...CA......C-......        M. gordonae
.....................T......C-......        M. marinum
................TT.GC.....C..-......        M. scrofulaceum
..............C..A.GC.....C..-..G...        M. malmoense
................TT.GC.....C..-......        M. kansasii
..............T.AA..C........-.C....        M. avium
..............TTTA.GC........-.TA...        M. intracellulare
..............T.TC.GC.....C..AG.A...        M. intermedium
.........T........A.C......T.-......        M. genavense
..............T..A.GC.....C..-......        M. interjectum
```

Fig. 2. Eine für Mykobakterien typische Signaturregion der 16S rDNA

Böttger EC (1996) Approaches for identification of microorganisms. ASM News 62:247-50

2.2 Direktnachweis von Mykobakterien im Patientenmaterial

In den letzten Jahren sind erhebliche Fortschritte mit diversen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren erzielt worden, welche den Nachweis von Mykobakterien direkt im klinischen Untersuchungsmaterial ermöglichen. Dies bedeutet für den Arzt, dass er nicht die viel Zeit beanspruchende Kultur abwarten muss, sondern das Resultat bereits innerhalb von 1-2 Tagen zur Verfügung hat. Neben einer Vielzahl von Eigenentwicklungen sind auch kommerziell vertriebene Systeme zum direkten Nachweis einer TB aus klinischen Untersuchungsmaterialien erhältlich.

3. DNA-Fingerprinting

Zur Aufdeckung von möglichen Übertragungswegen (Transmission) einer TB oder bei vermuteter Kontamination (z. B. Bronchoskop, Diagnostiklabor), muss der Erreger typisiert werden.
Die dabei angewendete Methode des DNA-Fingerprinting basiert auf der Tatsache, dass im Genom von *M. tuberculosis* verschiedene repetitive Elemente, sog. Insertionssequenzen (IS) vorkommen, welche molekularbiologisch gut charakterisiert sind. Am bekanntesten ist die IS6110. Schneidet man solche IS-Elemente mit Restriktionsenzymen ('genetische Scheren'), so zeigt jeder Stamm eine für ihn charakteristische Anzahl Kopien, welche ihrerseits von genau definierter Grösse (Fragmentlänge) sind. Aufgrund dieses sog. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) sind einzelne Isolate voneinander leicht unterscheidbar (Fig. 3).

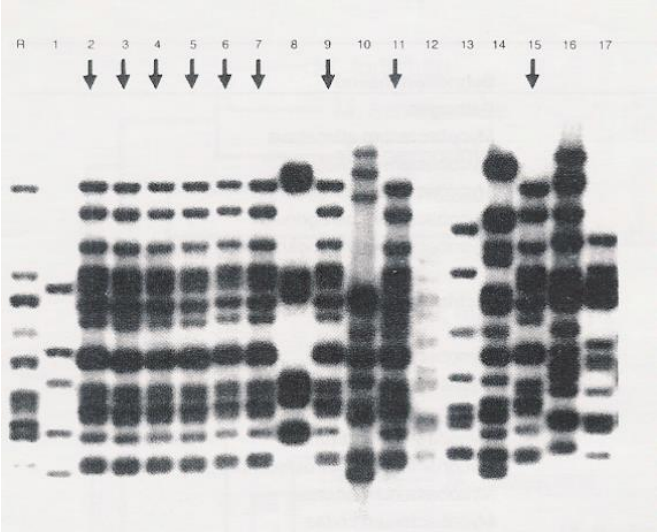
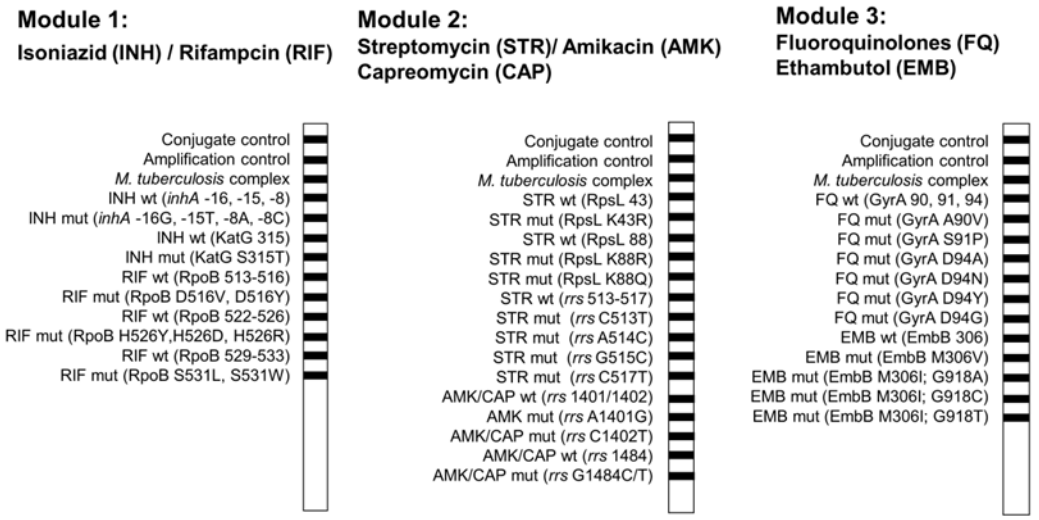


Fig. 3.
RFLP-Analyse von *M. tuberculosis*-Stämmen basierend auf der IS6110. Identische Bandenmuster (Nr. 2-7, 9, 11, 15) weisen in diesem Fall auf eine Übertragung hin (aus Edlin BR et al. (1992) NEJM 326:1514-21).

4. Line-Probe Assay für den Resistenznachweis bei *Mycobacterium tuberculosis*

Das Prinzip des Line Probe Verfahrens ist auf Seite 38 beschrieben. Dieser Line-Probe Assay (AID Diagnostika) dient zum Nachweis von Mutationen in *Mycobacterium tuberculosis*, welche Resistenz gegen Tuberkulostatika vermitteln. Es gibt unterschiedliche Streifen (Module 1- 3) zur Bestimmung von Resistenzen für first-line (Rifampicin und Isoniazid) und second-line (Amikacin, Capreomycin, Streptomycin, Fluoroquinolone und Ethambutol) Tuberkulostatika (Ritter C et al. (2014) J Clin Microbiol 52:940-6).



Note:
1. RpoB numbering according *E. coli*; all other protein / gene numbering according *M. tuberculosis* strain H37Rv.
2. *M. tuberculosis* H37Rv positions 513, 514, 515, 517, 1401, 1402 and 1484 correspond to *rrs E. coli* positions 522, 523, 524, 526, 1408, 1409 and 1491, respectively.

5. Praktikumsversuch 1

Untersuchungsmaterial III: Sputum eines Patienten mit Infiltrat und Kaverne im re OL

Tag 5	- Demopräparat Nr. 16 bereits gefärbtes ZN-Präparat (Beschreibung Seite 3) - Beurteilung: Zur Zeit wird für Notfälle der GeneXpert eingesetzt.

6. Praktikumsversuch 2

Tag 4	**Kultur: *M. bovis* BCG (Demonstrationsplatte)** Aus Sicherheitsgründen ist nicht *M. tuberculosis*, sondern *M. bovis* BCG angezüchtet worden.
	Beurteilung der Kultur: Dieses Mykobakterium gehört ebenfalls zum *M. tuberculosis*-Komplex. Die übrigen Mitglieder dieses Taxons sind *M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti* und *M. canettii.* TB-Bakterien erkennt man auf Middlebrook 7H10-Agar an ihrer nicht pigmentierten, rauhen, erhabenen Kolonieform. Die Tuberkulose wird überwiegend (> 97%) durch *M. tuberculosis* verursacht, selten durch *M. bovis* (< 2%); sehr selten werden bei uns *M. africanum* und *M. canettii* isoliert. Die Identifizierung der einzelnen Species innerhalb des *M. tuberculosis*-Komplexes erfolgt über molekularbiologische Methoden.
	Kultur *Mycobacterium gordonae* (Demonstrationsplatte) Beurteilung der Kultur:
	Dieser gelb pigmentierte (skotochromogene, d.h. ohne Belichtung gelb) Organismus gehört zu den NTM. Er wird häufig, jedoch ohne pathogene Signifikanz, aus Sputum und Magensaft isoliert, ebenso aus Leitungswasser.

Definitionen

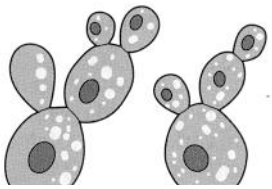
Pilze sind eukaryontische Mikroorganismen, d. h. ihr Genom ist in einem echten Kern mit einer Kernmembran organisiert. Sie verfügen über eine Zellwand wie Pflanzen, sind aber chlorophyllfrei und deshalb C – heterotroph: saprophytäre Pilze beziehen die notwendigen Kohlenstoff-Verbindungen von organischen Rückständen, während Parasiten oder Symbionten einen lebenden Organismus benötigen. Die Zellwand besteht vor allem aus Glukanen (aus Glukose aufgebaute Polysaccharide), Mannan und Chitin. Die Zytoplasmamembran enthält Ergosterol, welches einen wichtigen Angriffspunkt für Antimykotika bildet.

Vermehrung

Bei Pilzen unterscheidet man verschiedene Vermehrungsformen:

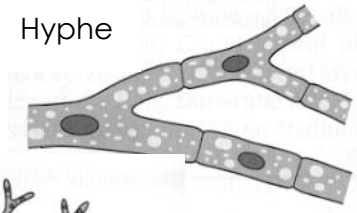
a) Vegetativ

- Wachstum durch **Sprossung**, die charakteristische Vermehrungsweise von Hefen. Runde/ovale Einzelzellen bilden eine kleine Ausstülpung, die zu einer neuen Hefezelle heranwächst. Tochterzellen können sich ablösen oder mit der Mutterzelle in Verbindung bleiben. Langgezogene, miteinander verbundene Hefezellen bilden ein **Pseudomyzel**.
- Für Schimmelpilze typisch ist die Vermehrung durch **Hyphen**: Bildung septierter oder unseptierter Pilzfäden mit Längenwachstum und Verzweigungen. Ein Geflecht solcher Pilzfäden bildet ein **Myzel**.

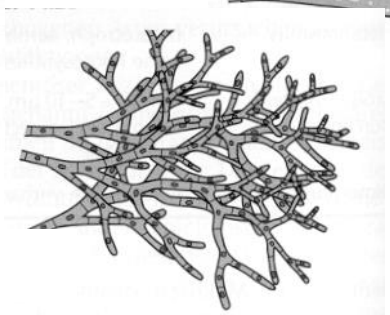


Sprosszellen (Blastoconidien)

Pseudohyphen



Hyphe



Myzel

b) Fruktifikation (Bildung von Fruchtformen)

- **asexuell / Nebenfruchtform(= anamorphe Form)** Vermehrung ohne Kernphasenwechsel (keine Meiose). Diese Nebenfruchtformen dienen einerseits der Verbreitung in der Umwelt und sind anderseits die Grundlage für die morphologische Identifizierung der meisten in der Humanmedizin wichtigen Pilze.
  Konidien: durch Sprossung einer spezialisierten Zelle oder Teilung einer Hyphe entstandene, ein- oder mehrzellige Vermehrungspartikel, z. B. Blastokonidien, Arthrokonidien.
  Sporangiosporen: Im Innern eines Behälters (z. B. Sporangium) entstandene einzellige Vermehrungspartikel.
- **sexuell / Hauptfruchtform (= teleomorphe Form):** Durch Meiose entstehen haploide sexuelle Sporen. Vermehrung durch Verschmelzung zweier haploider Zellen zu diploider Zygote.

Viele Pilze können beide Vermehrungsformen ausbilden. Für die meisten der in der Humanmedizin wichtigen Pilze ist eine sexuelle Vermehrung jedoch nicht bekannt, sie werden deshalb als Fungi imperfecti bezeichnet.

Epidemiologie

Von den ca. 150'000 verschiedenen Arten sind nur ca. 200 als Krankheitserreger beim Menschen bekannt:

- Obligat pathogene Pilze : Dermatophyten, dimorphe Pilze
- Opportunisten: Erreger einheimischer Mykosen, die normalerweise als Saprophyten der Umwelt (*Aspergillus* spp., Zygomyzeten) oder als Kommensalen des Menschen (*Candida* spp.) vorkommen, bei gegebener Prädisposition aber exogene bzw. endogene Infektionen verursachen können.

- **Obligat pathogene Pilze**

  - Dermatophyten: *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Epidermophyton floccosum*. Keratinophile, meist ubiquitäre Pilze.

    - *T. rubrum* — Onychomykosen, Tinea der Haut
    - *T. mentagrophytes* — Onychomykosen, Tinea der Haut

    } häufigste Erreger von Haut / Nagelmykosen

    - *T. tonsurans* — Tinea capitis
    - *T. verrucosum* — Tinea capitis, Tinea der Haut
    - *T. violaceum* — Tinea capitis, Tinea der Haut
    - *M. canis* — Tinea capitis, Tinea der Haut
    - *M. audouinii* — Tinea capitis, Tinea der Haut
    - *E. floccosum* — Tinea der Haut

  - Dimorphe Pilze:
    Pilze mit unterschiedlicher Morphologie in der saprophytären Phase (Schimmelpilz) und der parasitären Form (Hefeform im Wirt); häufig asymptomatische Infektionen. Endemiegebiete: Asien für *Penicillium marneffei*; *Sporothrix schenckii* weltweit; Nord-, Mittel- und Südamerika für übrige dimorphe Pilze.

    - *Blastomyces dermatitidis*
    - *Coccidioides immitis*
    - *Histoplasma capsulatum*
    - *Paracoccidioides brasiliensis*
    - *Penicillium marneffei*

    } Pulmonal oder systemisch mit Befall verschiedener Organe. Diese Pilze gehören zu Mikroorganismen der Risikoguppe 3 (wie auch *Cryptococcus neoformans*, siehe unten) und müssen unter erhöhten Sicherheitsbedingungen bearbeitet werden.

    - *Sporothrix schenckii* — Subcutan, selten pulmonal oder Meningitis

- **Opportunistische Pilze bei HIV –Patienten**
  - *Candida albicans / Candida* spp. — Mundsoor, Oesophagitis
  - *Pneumocystis jirovecii* (früher *P. carinii*) — Pneumonie
  - *Cryptococcus neoformans* — Meningitis, disseminierte Infektion

- **Opportunistische Pilze bei anderen Prädispositionen**

  Hefen
  Mit Ausnahme von *C. neoformans* oft kommensalische Besiedlung der Schleimhaut von Pharynx, Darm und Vagina, v.a. durch *C. albicans*. Davon ausgehend endogene Infektionen.
  Prädispositionen: T–Zell–Defekte, Neutropenie, Diabetes mellitus, intravenöser Drogenabusus, Antibiotika-Therapie, invasive Massnahmen (Chirurgie, Intensivstation)

- *Candida albicans*
- *Candida glabrata*
- *Candida tropicalis*
- *Candida krusei*
- *Candida* spp.
- *Blastoschizomyces capitatus*
- *Trichosporon* spp.

} lokale Infektion, Fungämie oder disseminierte Infektion mit Befall verschiedener Organe

Schimmelpilze
Ubiquitäre Saprophyten
Prädispositionen: Neutropenie, Steroidtherapie, Kavernen, Diabetes mellitus

- *Aspergillus fumigatus*
- *Aspergillus* spp.
- *Fusarium* spp.
- *Paecilomyces* spp.
- *Rhizopus* spp.
- *Scedosporium* spp.
- u.a.

} Lokale Infektionen in der Lunge, in den Nasennebenhöhlen, in den Ohren (besonders durch *Aspergillus* spp.). Dissemination in anderen Organen möglich. Diese Pilze können auch Kontaminationen einer Probe sein.

- *Penicillium* sp. — Praktisch immer Kontamination

1. Untersuchungsmaterialien

Für mikroskopisch – kulturellen Nachweis

- Abstriche: Watteträger in Transportmedium (für Mikroskopie nur bedingt geeignet)
- Biopsie: in sterilem phys. NaCl
- Blut: 8 ml in Blutkulturflaschen. Keine Mikroskopie. Eignet sich für die Diagnostik einer Fungämie mit Hefen
- Haare, Haut, Nägel: nativ und trocken (z.B. in Dermapak)
- Knochenmark: Aspirat mit Heparin versetzt
- Liquor: 2 – 5 ml!
- Punktate : nativ in sterilem Röhrchen
- Respiratorische Proben: Sputum, Bronchialsekret, Bronchoalveloäre Lavage

Für Antigen-/Antikörpernachweis

• Nativblut für	Antigen – Nachweis	*C. albicans* *C. neoformans* *H. capsulatum*
	Antikörper – Nachweis	*C. albicans* *H. capsulatum* *C. immitis* *B. dermatitidis*
• Liquor	Antigen – Nachweis	*C. neoformans*
• Urin	Antigen – Nachweis	*H. capsulatum*

2. Untersuchungsmethoden

Direktmikroskopie (Spezialfärbungen)

- Feuchtpräparat: nativ, mit KOH 20% oder mit TAAOH (Tetra-aethyl-ammonium-hydroxid) — alle Pilze ausser *P. jirovecii*
- Tuschepräparat — *Cryptococcus neoformans*
- PAS – Färbung — alle Pilze ausser *P. jirovecii*
- Calcofluorwhite – Fluoreszenz — alle Pilze
- Grocott – Silberfärbung (Pathologie) — alle Pilze

Ein direktmikroskopischer Nachweis von Pilzen, vor allem Hyphen und Pseudohyphen, in klinischen Proben korreliert oft mit klinischer Signifikanz.

Kulturmedien

- Selektivmedien mit Antibiotika: z. B. Sabouraudagar — alle Pilze ausser *P. jirovecli* und *Malassezia furfur*
- Selektiv-/Identifizierungsmedium mit Antibiotika: CHROMagar Candida — vor allem für Hefen geeignet
- BHIB / BHI -Agar mit Antibiotika — für alle Pilze, insbesondere für dimorphe Pilze
- Mycosel-Agar (mit Cycloheximid) — für Dermatophyten und dimorphe Pilze
- Inkubation
  - 25 – 37°C / 5 (-28)d — für Hefen
  - 25 – 42°C / bis 28 d — für andere Pilze
  - 25 – 37° C / bis 8 Wochen — dimorphe Pilze

Die Relevanz eines Isolates muss im Zusammenhang mit dem Resultat der Direktmikroskopie, der isolierten Spezies und v.a. der Klinik beurteilt werden. Es sind sowohl falsch positive Kulturen (v.a. durch Schimmelpilze) als auch falsch negative Kulturen (insbesondere Blutkulturen) möglich.

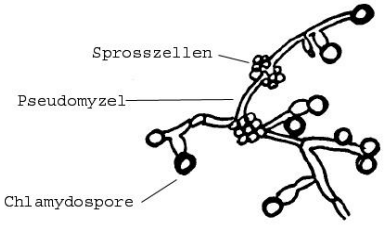
In Analogie zu der Identifizierung von Bakterien mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) können mit dieser Methode auch Hefen und Schimmelpilze identifiziert werden. Ebenso können in Analogie zu der bakteriellen Breitspektrum PCR auch Pilze mit einer panfungalen PCR nachgewiesen und identifiziert werden.

3. Identifizierung von Hefen

- Koloniemorphologie auf CHROMagar Candida:

grün – türkis; glatt	*C. albicans*
pink - lila; glatt	*C. glabrata*
weiss-rosa; rauh	*C. krusei*
blaugrau; glatt oder rauh	*C. tropicalis*

- Mikromorphologie auf Reisagar:



	Sprosszellen	Pseudomyzel	Chlamydosporen
C. albicans	+	+	+
C. krusei	+	+	-
C. glabrata	+	-	-
C. neoformans	+ mit Kapsel	-	-

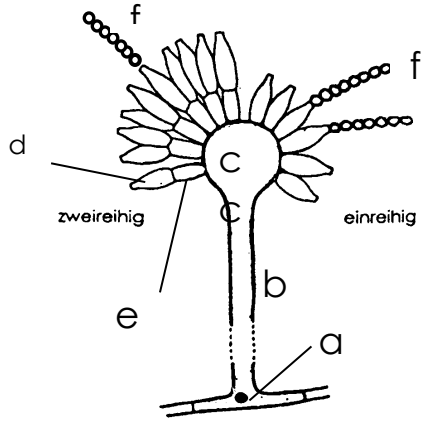
- Biochemie
- MALDI-TOF
- Sequenzierung

4. Identifizierung von Schimmelpilzen

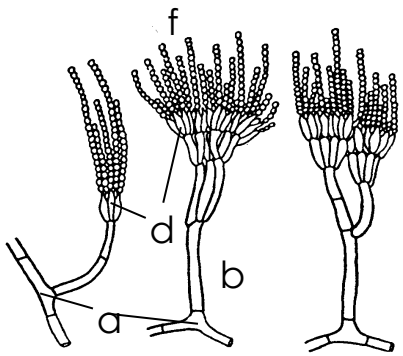
- makroskopische Morphologie der Kolonie
- mikroskopische Morphologie der asexuellen Fruktifikationsstrukturen
- Temperaturoptima
- selten biochemische Parameter
- MALDI-TOF (nicht so einfach wie bei Hefen)
- Sequenzierung (für Schimmelpilze und dimorphe Pilze)

Mikromorphologie

<u>*Aspergillus* spp.</u>



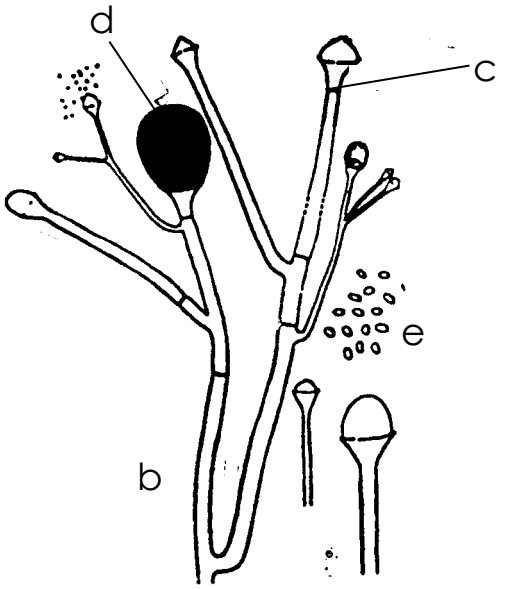
<u>*Penicillium* spp.</u>

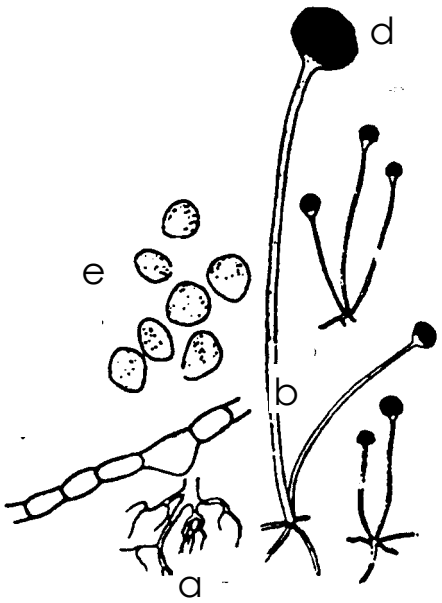


a) Fusszelle
b) Konidienträger (Konidiophor)
c) Vesikel
d) konidienbildende Zelle (Phialid)
e) Phialidtragende Zelle auf Vesikel (Metula)
f) Konidien

Aspergillus spp., *Penicillium* spp. und andere Schimmelpilze werden aufgrund ihrer asexuellen Fruktifikationsstrukturen identifiziert: Typische morphologische Elemente für *Aspergillus* spp. sind der Konidienträger (Konidiophor), der basal mit einer Fusszelle in der Trägerhyphe verankert ist und terminal eine blasenförmige Auftreibung (Vesikel) von je nach Spezies variabler Grösse und Form aufweist. Auf der Vesikel sitzen ein- oder zweireihige Stielchen (Sterigmata), die aus der konidienbildenden Zelle (Phialid) bzw. aus Verbindungszelle (Metula) und Phialid bestehen. Die Konidien entstehen durch Sprossung des Phialiden und bilden lange Ketten. Grösse, Form und Farbe der Konidien sind speziesspezifisch variabel. Bei *Penicillium* spp. fehlen Vesikel und Metulae.

Mucoraceae:





Absidia sp. *Rhizopus* sp.

a) Wurzeln (Rhizoide)
b) Sporenträger (Sporangiophor)
c) Auftreibung des Sporangiophors unterhalb Sporangium (Apophyse)
d) Sporenbildender Behälter (Sporangium)
e) Sporangiosporen

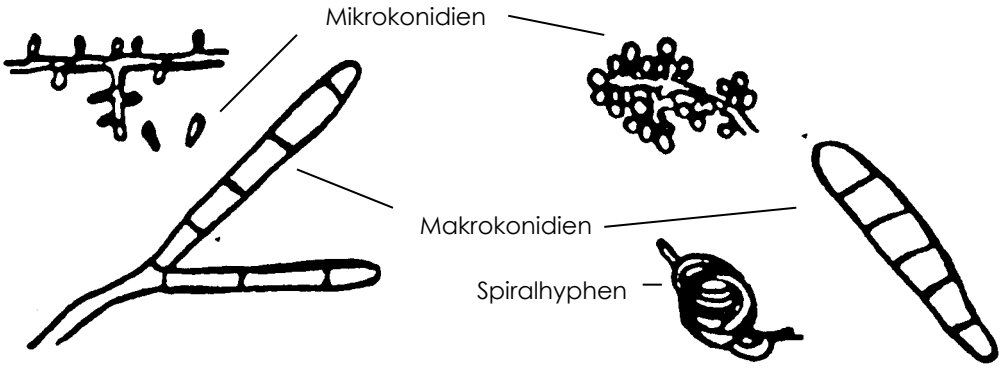
Mucoraceae zeigen typischerweise zusätzlich zum Hyphengeflecht direkt auf der Agaroberfläche (Substratmyzel) ein in die Höhe wachsendes Myzel (Luftmyzel), das die ganze Petrischale füllt. Merkmale zur Identifizierung: Unverzweigte (*Rhizopus* spp.) oder verzweigte (*Absidia* spp.) Sporenträger (Sporangiophoren). Die trichterförmige Auftreibung des Sporangiophors (Apophyse) ist typisch für *Absidia* spp. und fehlt bei *Rhizopus* spp. Die Verankerung des Sporangiophors im Agar mittels Wurzeln (Rhizoide) wiederum ist typisch für *Rhizopus* spp.

- **Dermatophyten**

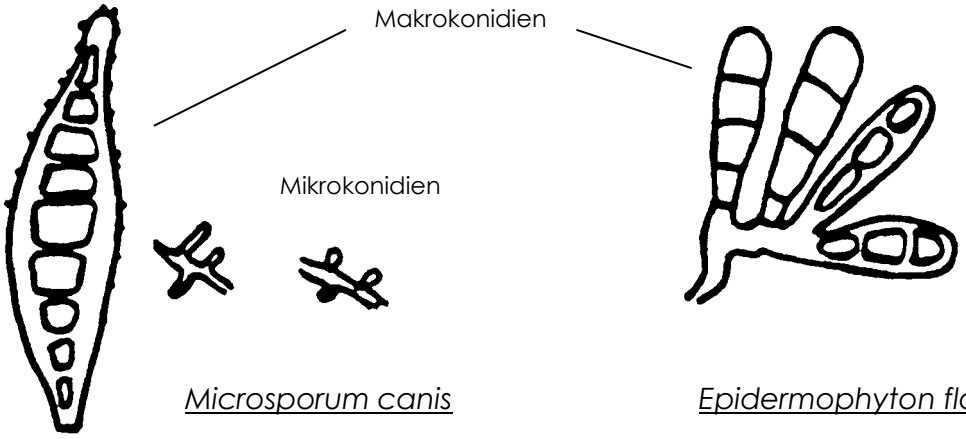
  - Makroskopische Morphologie der Kolonie
  - Mikroskopische Morphologie der Fruktifikationsstrukturen
  - Biochemische/physiologische Parameter

Konidien: - Asexuelle Vermehrungselemente
- Produziert ein Pilz sowohl septierte wie auch nicht septierte Konidien, so spricht man meist von Makro- resp. Mikrokonidien

Mikromorphologie



Trichophyton rubrum *Trichophyton mentagrophytes*



Microsporum canis *Epidermophyton floccosum*

5. Praktikumsversuch 1

Untersuchungsmaterial: Vaginalabstrich von junger Frau mit Frage nach Soor

Tag 4	Watteträger auf CHROMagar-Candida-Platte ausstreichen: • 1. Fraktion mit Watteträger dicht beimpfen • Mit Öse 2. und 3. Fraktion beimpfen • Bebrütung bei 37°C
	Gram-Präparat herstellen und beurteilen (Anleitung **Seite 2**):
Tag 5	CHROMagar-Candida Platte beurteilen: • Koloniefarbe • Koloniebeschaffenheit
	Kulturpräparat von *C. albicans* beurteilen (Gram-Färbung / Dauerpräparat Nr. 17): • Morphologie • Gram-Verhalten
	Beurteilung der Morphologie von *C. albicans* und *Candida* spp. auf Reisagar: • Platte ohne Deckel auf Kreuztisch legen • Hellfeld bei Kondensorblende Position 4 benutzen • Mit Objektiv 10x Schicht suchen und Gesamtbild beurteilen Sprosszellen Pseudomyzel Chlamydosporen

6. Praktikumsversuch 2 (Tag 6 / 7)

- Patient mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und pulmonalen Infiltraten
  Untersuchungsmaterial: Grocott-Färbung eines Trachealsekrets
- Patient mit Frontalsyndrom bei Diabetes mellitus (Demokultur *Rhizopus rhizopodiformis*)
- Kulturen verschiedener Schimmelpilze

Tag 6	Beurteilung der Grocott – Färbung (Dauerpräparat Nr. 20) • Zellen • Pilzelemente (Vergleich mit *Actinomyces* -Präparat)
	Lactophenolblaupräparat von Schimmelpilzen • 1 Tropfen Lactophenolblau auf Objektträger geben • Mit Spatel einen kleinen Block der Kultur ausschneiden bzw. bei *Rhizopus rhizopodiformis* Luftmyzel abzupfen • In Lactophenolblau geben • Mit Spatel und Nadel sorgfältig zerkleinern • Deckglas auflegen, evt. leicht andrücken • Beurteilung im Hellfeld, erst Objektiv 10x, dann Objektiv 40x, <u>ohne Immersionsöl</u>

	A. fumigatus	***Penicillium* sp.**
Kolonie makroskopisch:		
Mikroskopie:		
Konidien	Sterigmata	Konidien
Phialiden	Sterigmata	
Metulae	Sterigmata	Phialiden
Vesikel		
Konidiophor		Konidiophor
Hyphen		Hyphen

Anhang 1: Liste der abgegebenen Dauerpräparate für die Mikroskopie

01 *Staphylococcus aureus* (Eiter) / Gram-Färbung
02 *Streptococcus pyogenes* (Eiter) / Gram-Färbung
03 Streptokokken Gr. A / Gram-Färbung
04 *Streptococcus pneumoniae* / Methylenblaufärbung
05
06 *Staphylococcus aureus* / Gram-Färbung
07
08
09 *Corynebacterium diphtheriae* / Gram-Färbung
10 *Corynebacterium diphtheriae* / Neisser-Färbung
11 *Listeria monocytogenes* / Gram-Färbung
12
13
14
15 *Actinomyces israelii* (Eiter)/ Gram-Färbung
16 *Mycobacterium bovis* BCG (Sputum) / Ziehl-Neelsen-Färbung
17 *Candida albicans* (Kulturpräparat) / Gram-Färbung
18
19
20 *Aspergillus fumigatus* (respir. Probe) / Grocott-Färbung
21
22
23 Blutkultur II, Gram-Färbung
24 Blutkultur I aerob, Gram-Färbung
25 Blutkultur I anaerob, Gram-Färbung

Immer das ganze Präparat durchmustern, damit allfällige Unregelmässigkeiten (z. B. ungenügende Entfärbung, Artefakte) erkannt werden können.

Anhang 2: Liste der Demonstrationskulturen

Jeweils 1 Kultur pro Person

		an folgenden Kurstagen verfügbar					
	Beschreibung	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
1	*S. aureus* und Koagulase-neg. Staphylokokken (auf gleicher Blutplatte) (Kontrollen für Katalase/Koagulase)		x				
2	Streptokokken Gruppe A / vergrünende Streptokokken / *E. faecalis* (auf gleicher Blutplatte) (Kontrollen für Katalase) (Demo von Agglutination für Lancefield-Gruppen-Antigen)		x				
3	Agardiffusionstest		x				
4	Mischflora Urin auf Blutagar (*Corynebacterium, Stapylococcus. epidermidis,* Enterokokken; reflektiert normale Urethralflora!)			x			
5	muköse *Klebsiella* (auf MacConkey-Platte) (bei langer Inkubation werden rote Kolonien langsam wieder gelb)			x			
6	*Proteus mirabilis*, schwärmend (auf Blutagar)			x			
7	*Salmonella / E. coli* (auf gleicher MacConkey-Platte)			x			
8	*Salmonella / E. coli* (auf gleicher Hektoen-Platte)			x			
9	TSI-Röhrchen: unbeimpft, *E. coli, Proteus, Pseudomonas aeruginosa*				x		
10	*Corynebacterium diphtheriae* auf CTBA-Platte				x		
11	Pneumokokken mit Optochin / muköse Pneumokokken / vergrünende Streptokokken mit Optochin (auf gleicher Blutplatte)					x	
12	*Rhizopus rhizopodiformis* (auf Sabouraud)						x
13	Resistenzprüfung *Pseudomonas aeruginosa*					x	
14	*Haemophilus influenzae* auf "Schoggi-Platte"					x	
15	*Haemophilus influenzae* mit *Staphylococcus aureus*-Amme auf Schafblutagar					x	
16	*E. coli* und *Clostridium perfringens* anaerob bebrütet, Schafblutagar					x	

Anhang 2: Liste der Demonstrationskulturen

		an folgenden Kurstagen verfügbar					
	Beschreibung	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
17	*Mycobacterium bovis* BCG (auf Middlebrook)					x	
18	*Mycobacterium gordonae* (auf Middlebrook)					x	
19	*Aspergillus fumigatus* (auf Sabouraud)						x
20	*Penicillium* sp. (auf Sabouraud)						x
21	*Candida albicans* (auf Sabouraud)					x	
22	*Candida albicans* Chlamydosporen (Reisagar mit Deckglas)					x	

Anhang 3: Wichtige Identifizierungsmerkmale der bearbeiteten Erreger

Einteilung	Spezies	Im Kurs behandelte Identifizierungsmerkmale	Weiterführende Tests
Gram-positive Kokken	Koagulase-neg. Staph. (SKN)	Katalase + / Koagulase – (oder Clumping Factor –)	- MALDI-TOF
	Staphylococcus aureus	Katalase + / Koagulase + (oder Clumping Factor +)	
	β-hämolytische Streptokokken	β-Hämolyse + / Katalase - / Agglutination	- Biochemie
	vergrünende Streptokokken	α-Hämolyse + / Katalase -	
	Pneumokokken	α-Hämolyse + / Katalase - / Gallelöslichkeit +	- Sequenzierung
Gram-negative Kokken	*Neisseria* spp.	Oxidase +	
Gram-positive Stäbchen	*Listeria monocytogenes*		
	Clostridium spp.	obligat anaerobes Wachstum, Sporenbildung	
Gram-negative Stäbchen	*Escherichia coli*	Lactose + / Biochemie API 20	
	Salmonella enterica	Lactose - / TSI-Agar mit H_2S-Bildung	
	Pseudomonas aeruginosa	Oxidase + / grünes Pigment / Geruch	
	Haemophilus influenzae	Ammenphänomen +	
Säurefeste Stäbchen	*Mycobacterium tuberculosis*	Säurefestigkeit in der Ziehl-Neelsen-Färbung	
Pilze	*Candida albicans*	Morphologie auf CHROMagar / Chlamydosporen auf Reisagar	
	Cryptococcus neoformans	Kapsel + (Tusche)	
	Aspergillus spp.	Mikromorphologie (Vesikel mit Phialiden, Konidien)	
	Penicillium spp.	Mikromorphologie (Phialiden ohne Vesikel, Konidien)	
	Rhizopus rhizopidiformis	Mikromorphologie (Rhizoide, Sporangien mit Sporen)	
	Microsporum canis	Kultur- und Mikromorphologie (Makrokonidien)	