

Streptokokken-Identifizierungs-Test

Art.-Nr. DR 585

Zur Identifizierung der Streptokokken-Lancefield-Gruppen A, B, C, D, F und G mittels enzymatischer Extraktion.

Beschreibung

Lancefield zeigte, daß die meisten pathogenen Streptokokken spezifische Kohlenhydrat-Antigene besitzen, die eine Klassifizierung in Gruppen erlauben¹.

Diese Streptokokken-Gruppen-Antigene können extrahiert und mithilfe von Latexpartikeln nachgewiesen werden, die mit gruppenspezifischen Antikörpern beladen sind. Die beladenen Latexpartikel agglutinieren in Gegenwart der entsprechenden Antigene, bleiben bei deren Abwesenheit jedoch in der Suspension verteilt.

Der Streptokokken-Identifizierungs-Test ist ein solcher Latex-Agglutinationstest zur Identifizierung der Streptokokken-Gruppen und enthält Reagenzien zum Nachweis der Gruppen A, B, C, D, F und G. Eine neues Extraktionsenzym (Englisches Patent Nr. 8414273) verbessert insbesondere bei Streptokokken der Gruppe D die Antigengewinnung und -ausbeute²⁻⁷.

Fast alle β -hämolsierende Streptokokken, die bei menschlichen Infektionen isoliert wurden, weisen Kohlenhydrat-Antigene auf, die in serologischen Reaktionen nachgewiesen werden können. Es wurde versucht, dieses Verfahren auf nicht- β -hämolsierende Streptokokken zu erweitern. Dies blieb mit Ausnahme von Streptokokken der Gruppen B, D, und N erfolglos, wobei Streptokokken der Gruppe N bei Infektionen des Menschen bisher nicht nachgewiesen wurden⁵.

Die folgende Übersicht beschreibt das Verfahren zur Identifizierung von Streptokokken mit dem Streptokokken-Identifizierungs-Test.

Vor der serologischen Identifizierung sollten folgende Charakteristika festgestellt werden.

- Hämolyse^{a, c}
- Zellmorphologie^{b, c}
- Reinheit und Anzahl der gewachsenen Kolonien^d

In letzter Zeit wurde von Isolaten der Gruppe D berichtet, die außer dem Gruppe D-Antigen ein Polysaccharid aufweisen, das serologisch nicht vom spezifischen Antigen der Referenzkulturen der Gruppe G zu unterscheiden ist. Somit kann es zu falschen Resultaten kommen, speziell mit einigen der üblicherweise eingesetzten Antigen-Extraktionssysteme.

Proteolytische Fraktionen aus *Streptomyces griseus*-Kulturen sind oft unzureichend zum Extrahieren der Gruppe D, obwohl sie das Antigen der Gruppe G problemlos extrahieren. Ein ähnliches System wurde anhand von 22 Streptokokken-Stämmen getestet, die sowohl als Gruppe D bekannt waren, aber sowohl Antigen der Gruppe D als auch G besaßen. Man erhielt einen Antigen-Extrakt, der eindeutig zuerst mit dem Gruppe G-Reagenz reagierte, und beim Gruppe D-Antigen verspätete oder schwache Reaktionen zeigte. Mit dem neuartigen OXOID Extraktionsenzym zubereitete Antigen-Extrakte der gleichen Stämme reagierten eindeutig und korrekt mit dem Reagenz der Gruppe D und wurden richtig in die Lancefield-Gruppe D eingestuft.

Bestandteile des Tests	Art.-Nr.
Latex-Identifizierungsreagenz A	DR 586
Latex-Identifizierungsreagenz B	DR 587
Latex-Identifizierungsreagenz C	DR 588
Latex-Identifizierungsreagenz D	DR 589
Latex-Identifizierungsreagenz F	DR 590
Latex-Identifizierungsreagenz G	DR 591
Polyvalente Positivkontrolle	DR 592
Extraktionsenzym	DR 593
Einweg-Reaktionskarten	DR 500
Rührstäbchen	

Die Latexreagenzien sind blau gefärbt, so daß die Agglutination auf den weißen Reaktionskarten gut sichtbar ist. Die Latexreagenzien sollten bei Raumtemperatur verwendet werden. Vor Gebrauch sind sie kräftig zu schütteln, bis die Latexpartikel homogen suspendiert sind.

Das Extraktionsenzym wird in gefriergetrockneter Form geliefert, es muß mit dem auf dem Etikett angegebenen Volumen Aqua dest. gelöst werden.

Die Positivkontrolle enthält Extrakte aller sechs Gruppen-Antigene.

Anwendung

Probenvorbereitung

1. Die zu untersuchenden Keime auf einem Blutagar über Nacht bei 36°C kultivieren.
2. Hämolytische Reaktionen begutachten und Gramfärbung sowie Katalase-Test durchführen. Anwesenheit grampositiver, Katalase-negativer Kokken bestätigen^{2, 3}.
3. Teströhrchen beschriften und mit 0,4 ml Extraktionsenzym füllen.
4. 2–5 Testkolonien auswählen, mit einer Impföse von der Platte abnehmen und im Extraktionsenzym sorgfältig suspendieren. Bei Mischkulturen Kontaminationen vermeiden.
5. 10 Minuten bei 36 °C z. B. im Wasserbad inkubieren. Nach 5 Minuten Teströhrchen 2–3 Sekunden kräftig schütteln oder kurz auf einen Vortex stellen, dann die Inkubation fortsetzen. Der Extrakt ist anschließend gebrauchsfertig.

Durchführung des Latex-Agglutinationstests

1. Latexreagenzien auf Raumtemperatur bringen. Die Tropfpipetten völlig in die Fläschchen entleeren und die Reagenzien kräftig schütteln.
2. Von jedem Latexreagenz einen Tropfen auf das entsprechende Feld auf der Reaktionskarte geben. Werden weniger als sechs Tests durchgeführt, kann der unbenutzte Abschnitt der Reaktionskarte abgeschnitten und für weitere Tests verwendet werden.
3. Jeweils einen Tropfen Bakterienextrakt mit einer Pasteurpipette in die sechs Felder pipettieren.
4. Mit den mitgelieferten Rührstäbchen jeweils die beiden Tropfen vermischen und über die gesamte Feldfläche verteilen. Für jedes Feld ein frisches Stäbchen verwenden.
5. Die Reaktionskarte vorsichtig hin- und herbewegen. Die Agglutination in einem oder mehreren Feldern tritt üblicherweise innerhalb von 30 Sekunden auf.

Diagnostische Reagenzien

6. Die Reaktionskarte sollte nicht länger als eine Minute bewegt werden. Für die Auswertung keine Lupe zu Hilfe nehmen.
7. Reaktionskarte mit einem geeigneten Desinfektionsmittel entsorgen.

Ergebnisse

Der Test wird als **positiv** betrachtet, wenn mit einem Gruppenreagenz eine Agglutination auftritt oder wenn ein Gruppenreagenz eine wesentlich schwächere Reaktion als die anderen fünf zeigt.

Der Test wird als **negativ** angesehen, wenn keine Agglutination sichtbar wird. Suspendiertes Untersuchungsmaterial kann körnig erscheinen, dies ist von einer Agglutination zu unterscheiden.

Konservierungsstoffe

Die Latexreagenzien und die Positivkontrolle enthalten jeweils 0,1% Natriumazid.

Das gelöste Extraktionsenzym enthält 0,1% Thiomersal.

Lagerung und Haltbarkeit

Reagenzien: aufrecht stehend bei 2–8°C.

Haltbarkeiten: siehe Etikett.

Die Reagenzien dürfen nicht eingefroren werden.

Das gelöste Extraktionsenzym ist drei Monate bei 2–8°C haltbar.

Qualitätskontrolle

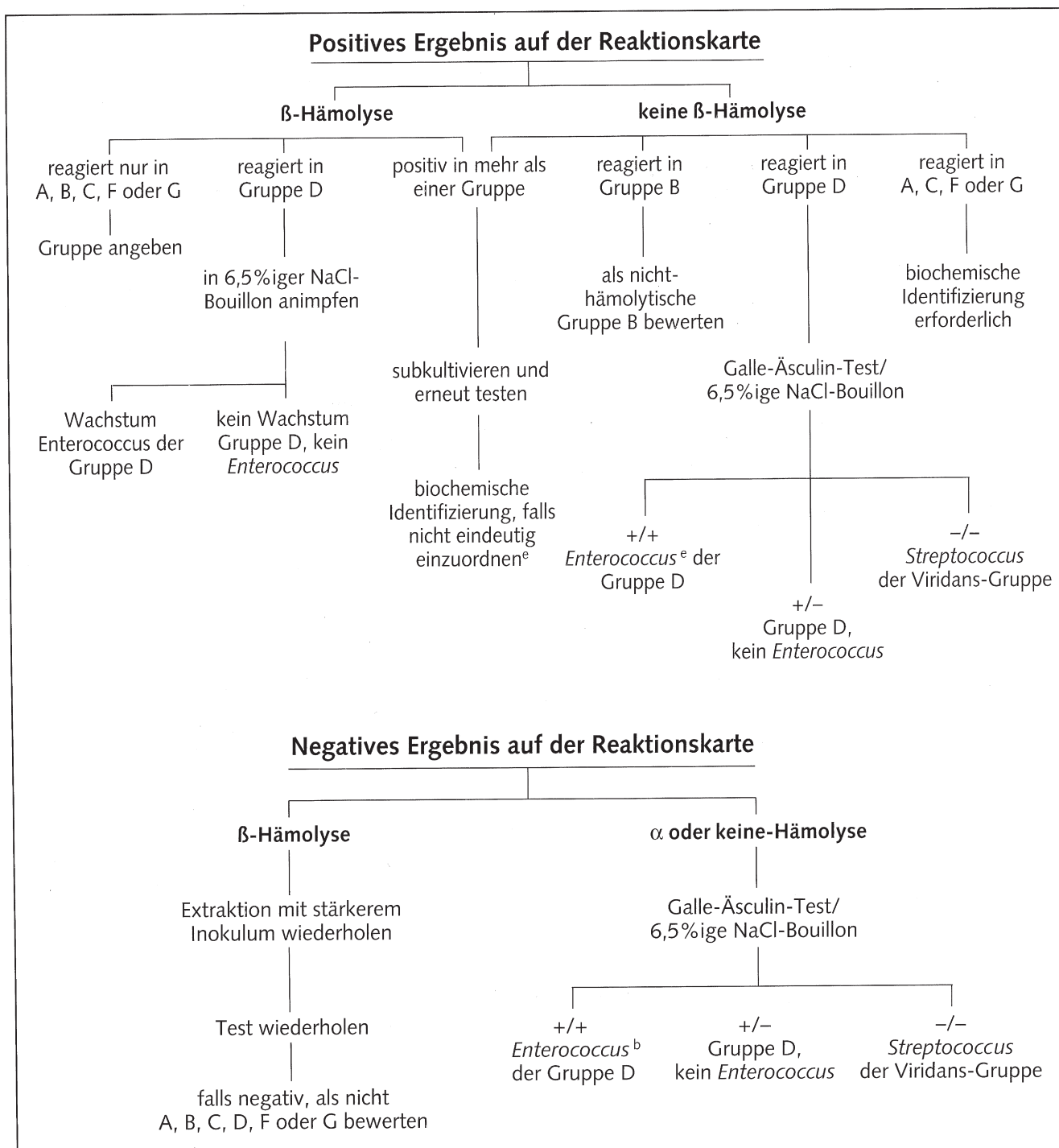
Die Positivkontrolle wie beschrieben durchführen.

Zusätzliche Hinweise

Es sollte beachtet werden, daß das Latex-Identifizierungsreagenz D bei einigen Stämmen von *Streptococcus bovis* nicht reagiert; sie sollten weiter getestet werden.

Literatur

1. Lancefield, R.C. (1938) Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 38, 473.
2. Facklam, R.R. "Manual of clinical microbiology". (1980) 3rd Ed. ASM, Washington, D.C. 88-110.
3. McIlmurray, M.B. (1984) Lancet I. 1353.
4. Birch, B.R., Keaney, M.G.L. und Ganguli, L.A. (1984) Lancet I. 856-857.
5. Facklam, R.R. und Carey, R.B. (1985) in: Lennette, E.H. et al. (Hrsg.) "Manual of clinical microbiology". 4th Ed., ASM, Washington, D.C. 154-175.
6. Kloos, W.E. und Jorgensen, J.H. in: Lennette, E.H. et al. (Hrsg.) "Manual of clinical microbiology". (1985) 4th Ed., ASM, Washington, D.C. 143-153.
7. Bortolussi, R., Schlech, W.F. und Albritton, W.L. in: Lennette, E.H. et al. (Hrsg.) "Manual of clinical microbiology". (1985) 4th Ed., ASM, Washington, D.C. 205-208.
8. Burkhardt, F. (Hrsg.) "Mikrobiologische Diagnostik." (1992) Thieme Verlag, Stuttgart. 66.
9. Facklam, R.R. und Washington II, J.A. (1991) in: Balows, A. (Hrsg.) "Manual of clinical microbiology". 5th Ed., ASM, Washington, D. C. 238-257.



^a *Streptococcus pneumoniae* ausschließen. Dieser Keim zeigt α-Hämolyse, ist Galle-löslich und Optochin-empfindlich⁹.

^b *Aerococcus viridans* bildet keine β-Hämolyse, wächst in Anwesenheit von 6,5% NaCl, verhält sich im Galle-Äsculin-Test variabel und ist meist Bacitracin-empfindlich. *Aerococcus viridans* ist oft in Diploformen und Tetraden gelagert, besonders in Flüssignährböden. Enterokokken kommen dagegen häufig als Diplokokken oder kurze Ketten vor. Des Weiteren wächst *Aerococcus viridans* weder bei 10°C noch bei 45°C, was ihn von den Enterokokken unterscheidet^{8,9}.

^c Staphylokokken und Listerien bilden häufig eine β-Hämolyse, die aber u. U. schwer erkennbar ist. Sie können von den Streptokokken z. B. anhand der Morphologie und Katalase-Reaktion unterschieden werden^{6,7}.

^d Wenn die verdächtige Kolonie überwachsen oder schlecht gewachsen ist, sollte vor der serologischen Testung eine Subkultur angelegt werden.

^e Es sind Stämme gefunden worden, die anscheinend sowohl das Antigen der Gruppe D als auch das der Gruppe G aufweisen⁴.