

Vergleich der diagnostischen Wertigkeit polyvalenter Sammelseren, O- und H-Phasen Einzelseren zweier Hersteller in der Differentialdiagnostik enteraler Salmonellosen

Comparison of the diagnostic value of polyvalent pooled salmonella antisera, O-phase and H-phase antisera from two manufacturers for differential diagnosis of enteric salmonellosis

R. Siekmeier, S. Albert, V. Schäfer, V. Brade

Abteilung für Medizinische Mikrobiologie, Zentrum der Hygiene, Klinikum der J.W. Goethe Universität, Frankfurt/Main

Zusammenfassung

Aus epidemiologischen und differentialdiagnostischen Gründen ist bei der Diagnostik der durch Salmonellen hervorgerufenen Erkrankungen eine Bestimmung der Serovare erforderlich. Bei der Bestimmung der Serovare kommt der Spezifität der verwendeten polyspezifischen Antisera eine erhebliche Bedeutung zu. Ziel dieser Studie war der Vergleich der diagnostischen Wertigkeit poly- und monovalenter Seren gegen Körper- und Geißelantigene (O- und H-Antigene) zweier Hersteller. Im Rahmen der Routinediagnostik wurden dabei $n = 4740$ Stuhlproben auf Salmonellen untersucht und davon $n = 372$ der aufgrund ihrer biochemischen Differenzierung verdächtigen Keime parallel agglutiniert. Von diesen erwiesen sich $n = 210$ Proben als Salmonella-positiv. Die im Rahmen der Diagnostik eingesetzten polyvalenten Sammelseren beider Hersteller zum Nachweis von Salmonellen der Gruppen A bis E zeigten eine gute Spezifität in ihrem Agglutinationsverhalten, während die Sammelseren zum Nachweis der Gruppen F bis 60 (Behring AG) bzw. F bis 67 (Sifin GmbH) in erheblichem Umfang mit physiologisch vorkommenden Enterobacteriaceae (Sifin GmbH) und Salmonellen der Gruppen A bis E (beide Hersteller) kreuzreagierten. Im Gegensatz dazu zeigten die zum Nachweis der O- und H-Antigene benutzten Einzelseren beider Hersteller eine hohe Übereinstimmung in ihrem Agglutinationsverhalten. Die Ergebnisse der Studie bestätigen darüber hinaus die epidemiologische Bedeutung der Enteritissalmonellen (besonders von *Salmonella enteritidis*, gefolgt von *Salmonella typhimurium*, *Salmonella agona* und *Salmonella virchow*), während alle übrigen Salmonellenspecies in Mitteleuropa nur eine untergeordnete epidemiologische Bedeutung aufweisen.

Schlüsselwörter

Salmonelleninfektionen – Salmonellendiagnostik – Salmonellenepidemiologie

Summary

For epidemiological and differential diagnostic reasons, the serotype must be determined when diagnosing diseases caused by salmonella. The specificity of the polyspecific antisera is of major significance in determining the serovars. The aim of this study was to compare the diagnostic value of two brands of poly- and monovalent sera against O and H antigens. Using routine diagnostic procedures, $n = 4740$ stool samples were examined for salmonella, and $n = 372$ organisms suspicious on account of their biochemical differentiation were agglutinated. Of these $n = 210$ samples tested to be positive for *Salmonella*. The two brands of polyvalent pooled sera used to diagnose salmonella of groups A to E showed good specificity in their agglutination behaviour, whilst the pool sera for detecting groups F to 60 (Behring AG) and F to 67 (Sifin GmbH) showed a considerable amount of cross-reactivity with physiological enterobacteriaceae. These sera showed strongly unspecific reactivity against physiological enterobacteriaceae (Sifin GmbH) and salmonella groups A to E (both brands). In contrast, both brands of monovalent serum used for detecting O and H antigens showed a high measure of agreement in their agglutination behaviour. The study also confirms the epidemiological significance of enteritis salmonella (notably salmonella enteritidis followed by salmonella typhimurium, salmonella agona and salmonella virchow), whereas all remaining salmonella species are of secondary epidemiological significance in Central Europe.

Key words

Salmonella infection – salmonella diagnostics – salmonella epidemiology

Einleitung

Innerhalb der letzten 20 Jahre kam es zu einer weltweiten Zunahme der durch Salmonellen hervorgerufenen Infektionen. Während systemische Salmonellosen wie Typhus und Paratyphus weiterhin rückläufig sind, nehmen die durch Enteritissalmonellen hervorgerufenen Infektionen—bedingt durch die Aufnahme kontaminierter Nahrungsmittel—weiter zu [1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11]. Die dadurch hervorgerufenen Kosten liegen zwischenzeitlich über 2 Milliarden DM jährlich [2, 12]. Sowohl zum Nachweis einer vorliegenden Infektion als auch zur Abklärung möglicher Infektionsquellen und Infektionsketten kommt der Salmonellen-diagnostik erhebliche Bedeutung zu [6, 7, 8, 13].

Üblicherweise erfolgt der Salmonellennachweis in einem mehrstufigen Verfahren sowohl kulturell als auch serologisch. Für den direkten Erregernachweis dient im allgemeinen Stuhl als Untersuchungsmaterial. Bei Verdacht auf Typhus oder Paratyphus sollten während der ersten Krankheitswoche auch Blutkulturen abgenommen werden. Zunächst erfolgt die Anzucht mit Hilfe flüssiger und fester Selektivnährmedien. Die aufgrund ihrer biochemischen Stoffwechseleigenschaften Salmonella-verdächtigen (Lactose-negativen) Einzelkolonien werden anschließend auf ein polytropes Differenzierungsmedium (z. B. Kligler-Hochschicht-Schrägagar) überimpft und nach einer Bebrütung von 18 bis 24 Stunden serologisch mittels Objektträger-Agglutination differenziert.

Für die Differenzierung der Salmonella-Serovare nach dem Kauffmann-White-Schema ist die Identifizierung sowohl der Körper-Antigene (O-Antigene) als auch der Geißel-Antigene (H-Antigene) erforderlich. Die zur Objektträger-Agglutination erforderlichen O- und H-Antiseren sind kommerziell erhältlich. Allgemein handelt es sich um polyklonale Antiseren, die durch Immunadsorption abgesättigt werden (Methode nach Castellani). Die verschiedenen Antiseren können sich aufgrund ihrer Gewinnung und Aufreinigung prinzipiell in ihrer Spezifität unterscheiden. Darüberhinaus kommt einer Kreuzreaktivität gegenüber in ihrer Struktur ähnlichen Antigenen physiologisch vorkommender Enterobacteriaceae erhebliche Bedeutung zu.

Ziel dieser Studie war daher der Vergleich von polyvalenten Sammelseeren sowie von monovalenten O- und H-Antiseren zweier Hersteller in Hinblick auf deren diagnostische Wertigkeit. Als Untersuchungsmaterial dienten die während des Untersuchungszeitraumes in die Abteilung für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsklinik Frankfurt eingesandten Stuhlproben.

Material und Methoden

Kultur

Während des Untersuchungszeitraumes vom 13. 1. 1994 bis 15. 3. 1994 wurden insgesamt 4740 Stuhlproben zur

Untersuchung auf enteropathogene Keime in die Abteilung für Medizinische Mikrobiologie eingesandt. Von allen Stuhlproben wurden sowohl eine Flüssiganreicherung (Selenit- und Preuss-Brühe) als auch mehrere Selektivnährmedien (SS-Agar, Leifsonagar, Brilliantgrünagar) angelegt. Von den aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften Salmonella-verdächtigen (Lactose-negativen) Einzelkolonien wurden jeweils Zweizucker-Eisen-Agar Kulturen nach Kligler angelegt ($n = 372$) und 18 bis 24 Stunden bebrütet.

Serotypisierung

Zunächst wurden die verdächtigen Bakterien mit O-Sammelseeren der Firma Behring AG (TPE [Gruppen A bis 60], Poly-I [Gruppen A bis E₄] bzw. Poly-II [Gruppen F bis 60]; Behring AG, Marburg, FRG) und der Firma Sifin GmbH (Poly-I [Gruppen A bis E₄] bzw. Poly-II [Gruppen F bis 67]; Sifin, Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, Berlin) agglutiniert. Im Falle einer positiven Reaktion erfolgte die weitere Differenzierung mit den gegen einzelne O- und H-Antigene gerichteten Antiseren beider Hersteller. Bei der Durchführung der Objektträgeragglutination wurde die epidemiologische Häufigkeit der einzelnen Serovare berücksichtigt und zuerst auf *S. enteritidis* und anschließend auf *S. typhimurium* bzw. *S. virchow* agglutiniert. Falls erforderlich wurde ein sogenanntes Hemm-Schwärmverfahren durchgeführt [4]. Die dabei nachgewiesenen H-Phasen wurden zwar bei der Typisierung der Serovare, nicht jedoch bei der Auswertung des Methodenvergleichs berücksichtigt.

In den Fällen, in denen bei Agglutination mit Sammelseeren, nicht jedoch bei Agglutination mit Einzelseeren ein positives Agglutinationsergebnis vorlag, wurde eine biochemische Keimdifferenzierung nach dem Prinzip der bunten Reihe durchgeführt (Api20E; bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich; BBL Crystal Enteric; Becton Dickinson, Heidelberg, FRG).

Ergebnisse

Von den $n = 372$ unter Salmonellenverdacht agglutinierten Kligler-Kulturen erwiesen sich $n = 162$ (43,5 %) als negativ und $n = 210$ (56,5 %) als positiv. Kulturen, die bei Agglutination mit mindestens einem der Sammelseeren (Behring TPE, Behring Poly-I, Behring Poly-II, Sifin Poly-I, Sifin Poly-II), nicht jedoch bei Agglutination mit O- bzw. H-Einzelseeren ein positives Agglutinationsergebnis zeigten, wurden biochemisch weiterdifferenziert. Als falsch positiv, bedingt durch Kreuzreaktion mit physiologisch vorkommenden Enterobacteriaceae, erwiesen sich bei Verwendung der Sammelseeren Behring TPE, Behring Poly-I, Behring Poly-II und Sifin Poly-I lediglich bis zu 3,7 % der Agglutinationen. Dagegen waren bei Verwendung des Sammelserums Sifin Poly-II 54,3 % der

Tabelle 1. Unspezifische Kreuzreaktion der Sammelseeren bei n = 162 Salmonella-verdächtigen Kligler-Kulturen.

Antiserum	Hersteller	Häufigkeit falsch positiver Reaktionen [%]	nachgewiesener Keim der Gattung
TPE	Behring AG	3.7	Citrobacter Escherichia Proteus
Poly-I	Behring AG	1.9	Citrobacter Proteus
Poly-II	Behring AG	1.9	Citrobacter Enterobacter Escherichia
Poly-I	Sifin GmbH	2.5	Citrobacter
Poly-II	Sifin GmbH	54.3	Citrobacter Enterobacter Escherichia Hafnia Proteus

positiven Agglutinationsreaktionen durch unspezifische Kreuzreaktionen bedingt (s. Tabelle 1).

Als Salmonella-positiv erwiesen sich nach Agglutination n = 210 (56.5 %) der Kligler-Kulturen. Bei diesen waren am häufigsten die Serovare *S. enteritidis* (59.0 %), *S. typhimurium* (15.7 %), *S. agona* (5.2 %), *S. virchow* (4.8 %), *S. brandenburg* (4.3 %) und *S. hadar* (2.9 %) nachweisbar, während den übrigen Serovaren eine z. T. nur geringe Bedeutung zukam (s. Tabelle 2).

Die am häufigsten vorkommenden Serovare wurden sowohl mit den jeweiligen polyvalenten Sammelseeren, als auch mit den monovalenten O- bzw. H-Einzelseeren beider Hersteller agglutiniert. Die epidemiologische Häufigkeit der einzelnen Serovare wurde dabei insoweit mit-

Tabelle 2. Häufigkeit der nachgewiesenen Salmonella-Serovare in n = 210 Salmonella-positiven Kligler-Kulturen.

Serovar	Kauffmann-White Gruppe	Häufigkeit n	[%]
<i>S. enteritidis</i>	D	124	59.0
<i>S. typhimurium</i>	B	33	15.7
<i>S. agona</i>	B	11	5.2
<i>S. virchow</i>	C1	10	4.8
<i>S. brandenburg</i>	B	9	4.3
<i>S. hadar</i>	C2	6	2.9
<i>S. panama</i>	D	4	1.9
<i>S. typhi</i>	D	3	1.4
<i>S. hato</i>	B	2	1.0
<i>S. infantis</i>	C1	2	1.0
<i>S. paratyphi A</i>	A	1	0.5
<i>S. meleagridis</i>	E1	1	0.5
<i>S. bovis morbilligans</i>	C2	1	0.5
<i>S. münchen</i>	C2	1	0.5
<i>S. anatum</i>	E1	1	0.5
<i>S. birmingham</i>	E1	1	0.5
insgesamt:		210	100

berücksichtigt, daß zunächst auf Salmonellen der D-Gruppe (*S. enteritidis*) und anschließend auf Salmonellen der B-Gruppe (*S. typhimurium*, *S. agona*, *S. brandenburg*) und der C-Gruppen (*S. virchow*, *S. hadar*) agglutiniert wurde (s. Tabelle 3). Von den untersuchten polyvalenten Sammelseeren beider Hersteller zeigten TPE und Poly-I insgesamt sehr gute Spezifitäten. Dagegen kam es bei Verwendung des polyvalenten Sammelseerums Poly-II beider Hersteller in erheblichem Umfang zu Kreuzreaktivitäten mit Salmonellen der Gruppen B bis D (s. Tabelle 3). So zeigt beispielsweise *S. enteritidis* bei Verwendung der polyvalenten Seren Poly-I beider Hersteller ein richtiges und in nahezu 100 % aller Fälle übereinstimmendes Agglutinationsverhalten. Dagegen erfolgt bei Verwendung der polyvalenten Sammelseeren Poly-II zu 79 % (Behring AG) bzw. 13.7 % (Sifin GmbH) der Fälle eine unspezifische Agglutination.

Die monospezifischen Antiseren gegen O-Antigene der einzelnen Salmonella-Serovare wiesen insgesamt sehr gute Spezifitäten und eine gute Übereinstimmung im Agglutinationsverhalten auf. Bei Agglutination der Geißelantigene zeigte sich, daß teilweise nur eine Geißelphase exprimiert war. Die gegen die jeweils entsprechende Phase gerichteten H-Antiseren zeigten in den untersuchten Fällen eine hohe Spezifität sowie eine gute Übereinstimmung im Agglutinationsverhalten.

Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse (s. Tabelle 2) bestätigen die überwiegende Bedeutung von *S. enteritidis* bei Auftreten von Salmonelleninfektionen und stehen damit in guter Übereinstimmung zu vorangegangenen epidemiologischen Untersuchungen [1, 3, 5, 8, 9, 11, 12, 13].

Bei der in unserer Vergleichsstudie durchgeführten Serotypisierung der verdächtigen Salmonellen weisen die Spezifitäten der polyvalenten Sammelseeren zum Salmonellennachweis überhaupt bzw. zum Nachweis von Salmonellen der Gruppen A bis E, nach Kauffmann-White (TPE und Poly-I beider Hersteller) eine gute Spezifität und eine nur geringe Kreuzreaktivität gegenüber anderen teilweise antigengleichen Enterobacteriaceae auf (s. Tabelle 1).

Im Gegensatz dazu weist das polyvalente Sammelseerum Poly-II der Sifin GmbH (Gruppen F-67), nicht jedoch der Behring AG (Gruppen F-60) eine ausgeprägte Kreuzreaktivität gegenüber anderen Enterobacteriaceae auf (Behring AG: 1.9 %, Sifin: 54.3 %). Die bei Verwendung des polyvalenten Serums Poly-II der Sifin GmbH nachgewiesenen unspezifischen Kreuzreaktionen umfassen die Bakterien der Gruppen Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Hafnia und Proteus. Darüberhinaus sind nach Angaben des Herstellers Kreuzreaktionen mit Bakterien der Shigella-, Ballerup- und Alkalescens-Gruppe möglich. Im Gegensatz dazu weist das Sammelseerum Poly-II der Behring AG mit 1.9 % eine nur geringe Kreuz-

Tabelle 3. Agglutinationsverhalten der 6 häufigsten Salmonella-Serovare bei Agglutination (jeweils Angabe der positiven Agglutinationen in %) mit polyvalenten Sammelseeren und monovalenten O- bzw. H-Einzelseren (BEH: Behring AG, SIF: Sifin, ÜB: jeweils auf n bezogene prozentuale Übereinstimmung).

	S. enteritidis (D) n = 124			S. typhimurium (B) n = 33			S. agona (B) n = 11			S. virchow (C ₁) n = 10			S. brandenburg (B) n = 9			S. hadar (C ₂) n = 6		
	BEH [%]	SIF [%]	ÜB [%]	BEH [%]	SIF [%]	ÜB [%]	BEH [%]	SIF [%]	ÜB [%]	BEH [%]	SIF [%]	ÜB [%]	BEH [%]	SIF [%]	ÜB [%]	BEH [%]	SIF [%]	ÜB [%]
TPE	100.0			100.0			100.0			100.0			100.0			100.0		
Poly-I	99.2	100.0	99.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Poly-II	79.0	13.7	27.4	33.3	78.8	42.4	100.0	9.1	9.1	20.0	80.0	30.0	77.8	0.0	22.2	16.7	66.7	50.0
O-4	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	100.0
O-5	---	---	---	93.9	97.0	97.0	0.0	0.0	0.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---
O-7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	100.0	100.0	100.0	---	---	---	---	---	---
O-8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.0	0.0	100.0	---	---	---	---	---	---
O-9	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0
H-2	---	---	---	30.3	30.3	100.0	---	---	---	40.0	40.0	80.0	---	---	---	---	---	---
H-5	---	---	---	---	---	---	0.0	0.0	100.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H-m	99.2	96.0	96.7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H-q	0.8	1.6	97.6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H-r	---	---	---	---	---	---	100.0	90.0	90.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H-t	0.8	0.8	100.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

reaktivität auf und bestätigt damit die vom Hersteller angegebene hohe Spezifität gegenüber Stämmen der Shigella-, Alkalescens-, Dispar-, Citrobacter-, Escherichia-, und Proteus-Gruppe (s. Tabellen 1 und 3).

Bei Untersuchung Salmonella-positiver Kligler-Kulturen weisen die Poly-II Sammelseeren beider Hersteller eine ausgeprägte Kreuzreaktivität mit Salmonellen der Gruppen B bis D auf. Dabei bestehen offensichtlich zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Salmonella-Serovaren (Behring Poly-II: bis 100.0 %, Sifin Poly-II: bis 80 %; s. Tabelle 3).

Die bei Agglutination der epidemiologisch häufigsten Salmonella-Serovare untersuchten Einzelseren beider Hersteller gegen O- und H-Antigene weisen in allen Fällen eine sehr hohe Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf (s. Tabelle 3)

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen zusammenfassend eine insgesamt hohe Spezifität der untersuchten Sammelseeren Poly-I (Gruppen A-E) sowie der untersuchten O- und H-Einzelseren gegen Antigene der epidemiologisch häufigsten Salmonella-Serovare. Bei Anwendung der polyvalenten Sammelseeren Poly-II beider Hersteller sind jedoch prinzipiell deren z. T. geringe Spezifität gegenüber anderen Enterobacteriaceae und Salmonellen der Gruppen A-D zu berücksichtigen.

Korrespondenz-Adresse:

Dr. med. R. Siekmeier
Abteilung für Medizinische Mikrobiologie
Zentrum der Hygiene
Klinikum der J. W. Goethe Universität
Paul-Ehrlich-Straße 40
60590 Frankfurt/Main

Literatur

1. Albert S, Weindel M, Schäfer V, Schneider C, Brade V, Doerr HW (1992) Salmonellosen: Zur serologischen Diagnostik und epidemiologischen Situation. *Diagnose & Labor* 42, 91-98
2. Baird-Parker AC (1990) Foodborne illness - Foodborne salmonellosis. *Lancet* II, 1231-1235
3. Burow H (1993) Zunahme der Infektionen durch Salmonella enteritidis - Ursachen und Interventionsmöglichkeiten. *Gesundh Wes* 55, 285-293
4. Hallmann H, Burkhardt F (eds.) *Klinische Mikrobiologie*, 1974, S. 117
5. Hof H (1991) Epidemiologie der Salmonellose im Wandel. *Dtsch med Wochenschr* 116, 545-547
6. Kühn H, Rabsch W, Tschäpe H (1989) Diagnostik der Salmonellosen. *Z. gesamte Hyg.* 35, 681-683
7. Kühn H, Rabsch W, Hartung M, Helmuth R, Schroeter A (1992) Das nationale Referenzzentrum für Salmonellosen. *Bundesgesundheitsbl* 35, 620-621
8. Kühn H, Rabsch W, Gericke B, Reissbrodt R (1993) Infektionsepidemiologische Analysen von Salmonellosen, Shigellosen und anderen Enterobacteriaceae-Infektionen. *Bundesgesundheitsbl* 36, 324-333

9. Loos M, Wassenaar TM (1994) Pathogenitätsfaktoren von enteritischen Salmonellen. *Immun Infekt* 22, 14–19
10. Mishu B, Koehler J, Lee LA, Rodrigue D, Brenner FH, Blake P, Tauxe RV (1994): Outbreaks of Salmonella enteritidis infections in the United States, 1985–1991. *J Infect Dis* 169, 547–552
11. Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B (1990) International increase in Salmonella enteritidis: A new pandemic? *Epidemiol Infect* 105, 21–27
12. Schroeter A, Pietzsch O, Steinbeck A, Bunge C, Böttcher U, Ward LR, Helmuth R (1991) Epidemiologische Untersuchungen zum Salmonella enteritidis-Geschehen in der Bundesrepublik Deutschland 1990. *Bundesgesundheitsbl* 34 147–151
13. Schroeter A, Hartung M, Pietzsch O, Rabsch W, Helmuth R (1992) Zum Salmonella-enteritidis-Geschehen in der Bundesrepublik Deutschland. *Bundesgesundheitsbl* 35, 377–383
14. Stephan R (1990) Feindifferenzierung von Salmonella-Bakterien. Eine wichtige Methode zur Verhütung und Bekämpfung von Salmonellen-Infektionen bei Tier und Mensch. *Bundesgesundhbl* 9, 415–417