

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Einführung
2. Funktionsprinzip
3. Schlüsselreaktionen für Enterobacteriaceen
4. Ergänzung zur Salmonellen-Klassifizierung
5. Zusatztests für Enterobacteriaceen
6. Beschreibung der Zusatztests für Enterobacteriaceen
7. Schlüsselreaktionen für Nonfermenter
8. Zusatztests für Nonfermenter
9. Beschreibung der Zusatztests für Nonfermenter
10. Die häufigsten Code-Nummern
11. Literatur

## 1. Einführung

Das MHK-ID System zur Identifizierung von Enterobacteriaceen und Nonfermenter wurde von der Firma Micro-Media Systems Inc., USA, entwickelt und von Biotest AG auf dem europäischen Markt eingeführt. In der Gruppe der Nonfermenter sind dabei auch andere Oxidase-positive, gramnegative Bakterien enthalten. Das Identifizierungssystem im Mikromaßstab beruht auf den klassischen Reaktionen von Edwards und Ewing. Zusätzlich zu den Daten, die mit dieser Methode erhalten werden, wurde ein breites Spektrum klinischer Isolate mit dem Biotest MHK-ID System überprüft und die Datenbasis entsprechend korrigiert. Diese Korrektur trägt auch Unterschieden zwischen den Ergebnissen des Makro-Röhrchen-Tests und des MHK-ID Mikrotests Rechnung. Die Angaben über positive Reaktionen sind ausschließlich in Verbindung mit dem Biotest MHK-ID System für Enterobacteriaceen und Nonfermenter anwendbar. In der vorliegenden 5. Ausgabe des MHK-ID Codebuches wurden folgende Änderungen der Nomenklatur bzw. Neuaufnahmen von Bakterienspezies berücksichtigt.

Acinetobacter Iwoffii	früher	Acinetobacter Iwoffii
Alteromonas putrefaciens	früher	Shewanella putrefaciens Pseudomonas putrefaciens
Escherichia coli inaktiv	neu	
Ewingella americana	neu	
Flavimonas oryzihabitans	früher	CDC-Gruppe VE2
Klebsiella ornithinolytica	neu	
Kluyvera cryocrescens	neu	
Morganella morgani biotyp 1	neu	
Oligella ureolytica	früher	CDC-Gruppe IVE
Proteus penneri	neu	
Providencia rustigianii	neu	
Salmonella pullorum	neu	
Salmonella subgroup 1	neu	
Salmonella subgroup 2	neu	
Salmonella subgroup 3a	früher	Arizona hinshawii
Salmonella subgroup 3b	früher	Arizona hinshawii
Salmonella subgroup 4	neu	
Salmonella subgroup 5	neu	
Sphingomonas paucimobilis	früher	Pseudomonas paucimobilis
Weeksella virosa	früher	CDC-Gruppe IIF
Xanthomonas maltophilia	früher	Pseudomonas maltophilia

## 2. Funktionsprinzip

Das Biotest MHK-ID System für gramnegative Bakterien kann sowohl zur Identifizierung von Enterobacteriaceen (Dextrose-Fermentierer) als auch für Nonfermenter (Dextrose-nichtfermentierende Bakterien) eingesetzt werden. Der Datenbasis beider Keimgruppen liegen insgesamt 52 Reaktionen zugrunde, wovon für die Identifizierung im Hauptteil 27 biochemische Reaktionen direkt im Testsystem und 3 (Oxidase, Wachstum auf MacConkey und Motilität) außerhalb des Testsystems durchgeführt werden. Die 22 Reaktionen des Nebenteils können bei Bedarf für die eindeutige Unterscheidung von zwei oder mehr Bakterienspezies unter der gleichen Code-Nummer herangezogen werden. Von diesen insgesamt 30 biochemischen Reaktionen des Hauptteils der Identifizierung werden für jede der beiden Keimgruppen 21 zur Erstellung einer 7stelligen Code-Nummer verwendet, die im folgenden aufgeführt sind:

### 1. Enterobacteriaceen:

Oxidase (außerhalb des Testsystems), Dextrose, VP, ONPG, H<sub>2</sub>S, Lysin, Arginin, Ornithin, Urease, Citrat, Malonat, TDA, Indol, Laktose, Saccharose, Arabinose, Raffinose, Rhamnose, Sorbit, Inosit und Adonit.

## 2. Nonfermenter:

Oxidase (außerhalb des Testsystems), Dextrose, VP, ONPG, H<sub>2</sub>S, Lysin, Arginin, Ornithin, Urease, Citrat, Malonat, Indol, Äskulin-Hydrolyse, Acetamid, OF-Dextrose, OF-Maltose, OF-Xylose, Gelatine-Verflüssigung (im Laktose-Näpfchen), Nitrat-Reduktion, Wachstum auf MacConkey-Agar (außerhalb des Testsystems) und Motilität (außerhalb des Testsystems).

Es existieren eine Reihe bakteriologischer Hinweise, die anzeigen, daß ein Keim nicht den Enterobacteriaceen zuzuordnen ist. *Pseudomonas aeruginosa* (der bekannteste Vertreter der Nonfermenter) kann in den meisten Fällen durch Geruch, Kolonie-Aussehen, Pigmentbildung und Oxidasetest erkannt werden. Die Mehrzahl der Nonfermenter sind Oxidase-positiv und die Bedeutung dieses Tests kann nicht stark genug betont werden. Alle Spezies, die im MHK-ID Codebuch im Teil für Enterobacteriaceen aufgeführt sind, sind Oxidase-negativ und Dextrose-positiv. Im Teil der Nonfermenter sind vorwiegend solche aufgeführt, die Oxidase-positiv und Dextrose-negativ sind. Einige wenige Spezies, die Oxidase-negativ und Dextrose-negativ sowie Oxidase-positiv und Dextrose-positiv sind (*Pasteurella multocida*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*) sind ebenfalls im Teil der Nonfermenter aufgeführt.

Falls ein Nonfermenter erwartet wird, sollte gleichzeitig mit dem Identifizierungssystem eine MacConkey-Agarplatte (Biotest Art.-Nr. 902 100) sowie für die Motilitäts-Prüfung eine Stichkultur in CASO-Agar mit 0,3% Agar-Agar (siehe auch 5. Beschreibung der Zusatztest für Enterobacteriaceen Punkt g) Motilität) angelegt werden. Falls die Motilitäts-Prüfung im hängenden Tropfen durchgeführt wird, kann das Testmaterial mit einer Öse direkt aus der Wachstumskontrolle oder einem beliebigen Zucker-Näpfchen der bebrüteten Testplatte entnommen werden. Für den Nachweis des Enzyms Gelatinase wird nach etwa 16 stündiger Bebrütung ein Gelatine-Teststreifen (Biotest Art.-Nr. 934 125) in das Laktose-Näpfchen eingelegt. Die Code-Nummer des Biotyps entsteht durch Zuordnung unterschiedlicher Zahlenwerte zu allen positiven Reaktionen. In dem nachfolgend dargestellten Auswertebblatt, welches jedem Testsystem mitgeliefert wird, sind die Reaktionen und die ihnen zugeordneten Zahlenwerte bei positiver Reaktion angegeben. Jede negative Reaktion erhält den Zahlenwert 0. Auf dem Auswertebblatt sind in der oberen Reihe die zur Auswertung der Enterobacteriaceen bestimmten Reaktionen und in der unteren Reihe die zur Auswertung der Nonfermenter aufgeführt. Dabei ergeben jeweils 3 biochemische Reaktionen einen Zahlenwert für die siebenstellige Code-Nummer des Biotyps. Innerhalb eines jeden Triplets ist jeweils die erste biochemische Reaktion dem Zahlenwert 4, die zweite dem Zahlenwert 2 und die dritte dem Zahlenwert 1 zugeordnet. Die Zahlenwerte innerhalb eines Triplets werden aufaddiert und in die Spalte für die Code-Nummer des Biotyps eingetragen. Hierdurch ergibt sich die siebenstellige Code-Nummer für den Biotyp. Alle Code-Nummern der möglichen Biotypen der Enterobacteriaceen-Gruppe sind in Volume 1, alle möglichen Code-Nummern der Nonfermenter-Gruppe sind in Volume 2 des Codebuches aufgelistet. Eine verkürzte Aufstellung der häufigsten Code-Nummern ist unter Punkt 9. dieser Einleitung aufgeführt und kann zur ersten Orientierung herangezogen werden.

Auswertungsbeispiel für Enterobacteriaceen:

Test	Ox	Dx	VP	ON	H <sub>2</sub> S	Ly	Ag	Or	Ur	Ci	Ma	TDA	Ind	La	Sa	Ar	Ra	Rh	So	In	Ad
Reaktion	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
(+)-Wert	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Code-Nr. des Biotyps	2			5			5			0			1			7			3		
(+)-Wert	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Reaktion																					
Test	Ox	Dx	VP	ON	H <sub>2</sub> S	Ly	Ag	Or	Ur	Ci	Ma	Ind	ÄH	Ac	OFD	OFM	OFX	Gel	Ni	Mac	Mot

ENTERO-  
BACTERIA-  
CEEN

NON-  
FERMENTER

Auswertungsbeispiel für Nonfermenter:

Test	Ox	Dx	VP	ON	H <sub>2</sub> S	Ly	Ag	Or	Ur	Ci	Ma	TDA	Ind	La	Sa	Ar	Ra	Rh	So	In	Ad	} ENTERO- BACTERIA- CEEN
Reaktion																						
(+)-Wert	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
Code-Nr. des Biotyps	4			0			1			2			5			1			4			} NON- FERMENTER
(+)-Wert	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
Reaktion	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	
Test	Ox	Dx	VP	ON	H <sub>2</sub> S	Ly	Ag	Or	Ur	Ci	Ma	Ind	ÄH	Ac	OFD	OFM	OFX	Gel	Ni	Mac	Mot	

In beiden Teilen des Codebuches sind auf jeder Seite jeweils 3 Spalten von Code-Nummern aufgeführt. Jeder Code-Nummer folgen die dazugehörigen Bakterienspezies sowie die relative Wahrscheinlichkeit in % (RP%) und eventuell notwendige Zusatztests (ADD.TEST POS. %). Die relative Wahrscheinlichkeit ist dabei ein Maß dafür, ob die Identifizierung des Keimes korrekt ist. Wenn mehr als eine Möglichkeit einer Keimspezies angegeben ist, gibt die relative Wahrscheinlichkeit die Häufigkeit an, mit der dieser Keim der aufgeführten Biotyp-Nummer zuzuordnen ist. Eine Wahl wie z. B. *E. coli* 98 % und *Serratia liquefaciens* 2 % gibt an, daß die Wahrscheinlichkeit für *E. coli* sehr hoch ist. Dies bedeutet jedoch nicht, daß der Keim nicht auch *Serratia liquefaciens* sein kann. Hierbei können dann zusätzliche Tests notwendig werden, um eine eindeutige Identifizierung zu erhalten. In den Teilen 4. Zusatztests für Enterobacteriaceen und 7. Zusatztests für Nonfermenter finden Sie weitere biochemische Reaktionen zur eindeutigen Unterscheidung von zwei oder mehr Bakterienspezies. In dem oben aufgeführten Beispiel genügt es zu wissen, daß die meisten *Serratia liquefaciens*-Stämme Gelatine verflüssigen, während *E. coli* zu 100 % negativ sind.

Im Codebuch ist weiterhin zu beachten, daß bei einer Vielzahl von Code-Nummern die Endziffer mit einem Bindestrich und einer weiteren Ziffer versehen ist. Dies bedeutet, daß den dazwischenliegenden Endziffern derselben Bakterienspezies die gleiche relative Wahrscheinlichkeit zuzuordnen ist.

**Als Beispiel:**

BIOTYPE NUMBER	ORGANISM NAME	RP %
2504051-3	<i>Klebsiella ozaenae</i>	99
bedeutet		
2504051	<i>Klebsiella ozaenae</i>	99
2504052	<i>Klebsiella ozaenae</i>	99
2504053	<i>Klebsiella ozaenae</i>	99

Die meisten Enterobacteriaceen und Nonfermenter wachsen im Biotest MHK-ID System genügend schnell, um eine Identifizierung nach 18 bis 24 Stunden Wachstum zu ermöglichen. In einigen Fällen jedoch, insbesondere bei Nonfermentern laufen einige biochemische Reaktionen langsamer ab und benötigen daher 48 Stunden Wachstum, um ein positives Ergebnis zu liefern. Das Identifizierungssystem kann in folgenden Fällen für weitere 24 Stunden inkubiert werden:

1. Wenn ein Keim innerhalb von 24 Stunden nicht wenigstens 3 positive Reaktionen zeigt.
2. Um bei der gleichen Code-Nummer die Wahlmöglichkeit zwischen verschiedenen Bakterienspezies einzuschränken, besonders wenn innerhalb 24 Stunden weniger als 3 positive Reaktionen auftreten.
3. Wenn die ermittelte Code-Nummer nach 24 Stunden Wachstum nicht im Codebuch vorhanden ist.

Diese Reinkubation kann nicht nur zu mehr positiven Reaktionen führen und so eine exaktere Bestimmung des Erregers erlauben, sondern sie ermöglicht auch, konkurrierende Keime auszuschließen und die Wahrscheinlichkeit des getesteten Keimes zu erhöhen.

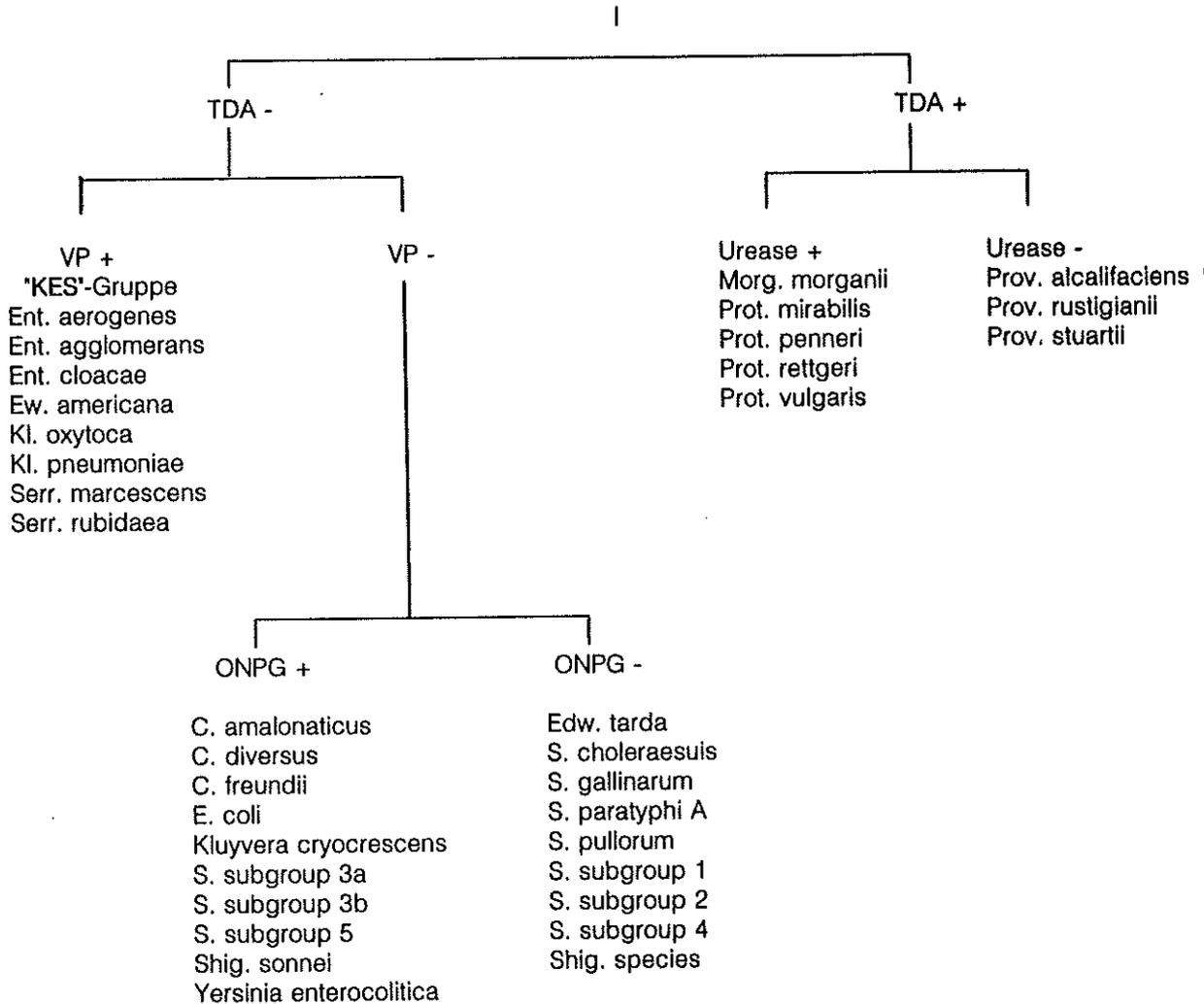
**Ein Beispiel:**

Moraxella spezies, eine Keimgruppe die nur sehr langsam reagiert, zeigt nach 18 bis 24 Stunden Inkubation nur eine positive Oxidasereaktion, die zu einem Biotyp mit der Nummer 4000000 und einer Wahrscheinlichkeit von 62 % führt. 2 andere Bakterien ergeben die gleiche Biotyp-Nummer. Nach 48 Stunden Inkubation zeigt Moraxella spezies immer noch nur die positive Oxidasereaktion und führt somit zur gleichen Code-Nummer. Jedoch ein signifikanter Prozentsatz jeder der beiden konkurrierenden Spezies hat bis dahin eine andere positive Reaktion gezeigt, so daß die Wahrscheinlichkeit für Moraxella spezies nach 48 Stunden steigt.

Falls eine Biotyp-Nummer keine eindeutige Identifizierung zuläßt, können Zusatztests herangezogen werden. Diese sind jedoch nicht in der siebenstelligen Code-Nummer berücksichtigt. Im Codebuch sind diese Zusatztests zur Bestätigung einer Identifizierung unter "ADD.TEST" angegeben. Diese Bestätigungstests, sowie deren Abkürzungen und positive Reaktionen für die einzelnen Keimspezies, sind im folgenden für Enterobacteriaceen und Nonfermenter getrennt beschrieben.

### 3. Schlüsselreaktionen für Enterobacteriaceen

Dextrose: Fermentierer  
 Oxidase: Negativ  
 NO<sub>3</sub>: → NO<sub>2</sub>  
 MacConkey: Positiv



#### 4. Ergänzung zur Salmonellen-Klassifizierung

Erreger aus der Salmonella-Arizona Gruppe unterliegen historisch bedingt fortlaufenden Änderungen hinsichtlich ihrer Nomenklatur. Daher überrascht es nicht, daß gerade in diesem Bereich der Identifizierung von Enterobacteriaceen Unklarheit bezüglich der Einteilung in Spezies, Subspezies oder Serotypen besteht.

Die meisten Serotypen humanmedizinischen Ursprungs gehören zur Subgruppe 1. Gelegentlich können auch Stämme der Subgruppe 3a und 3b isoliert werden; sehr selten jedoch aus Subgruppe 2, 4 oder 5. Hier handelt es sich in erster Linie um Stämme, die in Rohstoffen von Lebensmitteln, Kaltblütern und in der Umwelt vorkommen. Nachfolgend eine Auflistung aller Spezies, die sich mit weiteren Serotypen innerhalb der verschiedenen Subgruppen befinden:

Salmonella subgroup 1	Salmonella choleraesuis Salmonella enteritidis Salmonella paratyphi A,B,C Salmonella typhi Salmonella typhimurium Salmonella gallinarum Salmonella pullorum
Salmonella subgroup 2	Salmonella salamae
Salmonella subgroup 3a	Arizona arizonae
Salmonella subgroup 3b	Arizona diarizonae
Salmonella subgroup 4	Salmonella houtenae
Salmonella subgroup 5	Salmonella bongori

Die serologische Bestätigung von Salmonellen ist in jedem Fall erforderlich und wird mit dem Zusatzvermerk

ADD.TEST POS. % SEROLOGY

im Hauptteil des Codebuches ausgewiesen.

## 5. Zusatztests (% positiv) für Enterobacteriaceen

Spezies	Arabit	Cellulose	Äskulin-Hydrolyse	Gelatine (22°C)	Glycerin	Jordan's-Tartrat	KCN-Test	Lipase
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	0	100	10	0	70	85	95	0
<i>Citrobacter diversus</i>	100	99	2	0	98	75	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	0	55	0	0	98	90	96	0
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0	0	0	30	25	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	100	100	98	0	98	95	98	0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	50	55	60	2	30	25	35	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	15	99	30	0	40	30	98	0
<i>Enterobacter gergoviae</i>	97	99	97	0	100	97	0	0
<i>Enterobacter sakazakii</i>	0	100	100	0	15	1	99	0
<i>Escherichia coli</i>	5	2	35	0	75	95	3	0
<i>Escherichia coli</i> inaktiv	5	2	5	0	65	85	1	0
<i>Ewingella americana</i>	99	10	50	0	24	35	5	0
<i>Hafnia alvei</i>	0	15	7	0	95	70	95	0
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	100	100	100	0	100	100	100	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	98	100	100	0	99	98	97	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	95	92	80	0	65	50	88	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98	98	99	0	97	95	98	0
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	100	100	30	0	50	50	80	0
<i>Kluyvera ascorbata</i>	0	100	99	0	40	35	92	0
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	0	100	100	0	5	19	86	0
<i>Morganella morganii</i>	0	0	0	0	5	95	98	0
<i>Morganella morganii</i> biotyp 1	0	0	0	0	100	100	91	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	1	0	90	70	87	98	92
<i>Proteus penneri</i>	0	0	0	50	55	85	99	45
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	50	91	60	80	99	80
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	1	0	0	15	90	100	0
<i>Providencia rettgeri</i>	100	3	35	0	60	95	97	0
<i>Providencia rustigianii</i>	0	0	0	0	5	50	100	0
<i>Providencia stuartii</i>	0	5	0	0	50	90	100	0
<i>Salmonella choleraesuis</i>	1	0	0	0	0	85	0	0
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	10	0	0	0	100	0	0
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0	5	0	0	10	0	0	0
<i>Salmonella pullorum</i>	0	5	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> subgroup 1	0	5	5	0	5	90	0	0
<i>Salmonella</i> subgroup 2	0	0	15	2	25	50	0	0
<i>Salmonella</i> subgroup 3 a	1	1	1	0	10	5	1	0
<i>Salmonella</i> subgroup 3 b	1	1	1	0	10	20	1	0
<i>Salmonella</i> subgroup 4	5	50	0	0	0	65	95	0
<i>Salmonella</i> subgroup 5	0	0	0	0	0	0	100	0
<i>Salmonella typhi</i>	0	0	0	0	20	100	0	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	0	5	97	90	95	75	90	85
<i>Serratia marcescens</i>	0	5	95	90	95	75	95	98
<i>Serratia rubidaea</i>	85	94	94	90	20	70	25	99
<i>Shigella dysenteriae</i>	0	0	0	0	10	30	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	5	0	0	15	90	0	0
<i>Shigella</i> species ( <i>S.boydii</i> , <i>S.flexneri</i> )	0	0	0	0	10	30	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	40	75	25	0	90	85	2	55
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0	0	95	0	50	50	0	0

## Zusatztests (% positiv) für Enterobacteriaceen (Fortsetzung)

Spezies	Maltose	Mannit	Mannose	Motilität	Mukat	Salicin	Trehalose	Xylose
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	99	100	100	98	98	40	100	99
<i>Citrobacter diversus</i>	100	100	100	95	93	20	100	100
<i>Citrobacter freundii</i>	99	99	100	95	95	5	99	99
<i>Edwardsiella tarda</i>	100	0	100	98	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	99	100	95	97	90	100	100	100
<i>Enterobacter agglomerans</i>	89	100	98	85	40	65	97	93
<i>Enterobacter cloacae</i>	100	100	100	95	75	75	100	99
<i>Enterobacter gergoviae</i>	100	99	100	90	2	99	100	99
<i>Enterobacter sakazakii</i>	100	100	100	96	1	99	100	100
<i>Escherichia coli</i>	95	98	98	95	95	40	98	95
<i>Escherichia coli</i> inaktiv	80	93	97	5	30	10	90	70
<i>Ewingella americana</i>	16	100	99	60	0	80	99	13
<i>Hafnia alvei</i>	100	99	100	85	0	13	95	98
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	100	100	100	0	96	100	100	100
<i>Klebsiella oxytoca</i>	100	99	100	0	93	100	100	100
<i>Klebsiella ozaenae</i>	95	100	100	0	25	97	98	95
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98	99	99	0	90	99	99	99
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	100	100	100	0	0	98	100	100
<i>Kluyvera ascorbata</i>	100	100	100	98	90	100	100	99
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	100	95	100	90	81	100	100	91
<i>Morganella morganii</i>	0	0	98	95	0	0	10	0
<i>Morganella morganii</i> biotyp 1	0	0	95	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	95	0	0	98	98
<i>Proteus penneri</i>	100	0	0	85	0	0	55	100
<i>Proteus vulgaris</i>	97	0	0	95	0	50	30	95
<i>Providencia alcalifaciens</i>	1	2	100	96	0	1	2	1
<i>Providencia rettgeri</i>	2	100	100	94	0	50	0	10
<i>Providencia rustigianii</i>	0	0	100	30	0	0	0	0
<i>Providencia stuartii</i>	1	10	100	85	0	2	98	7
<i>Salmonella choleraesuis</i>	95	98	95	95	0	0	0	98
<i>Salmonella gallinarum</i>	90	100	100	0	50	0	50	70
<i>Salmonella paratyphi</i> A	95	100	100	95	0	0	100	0
<i>Salmonella pullorum</i>	5	100	100	0	0	0	90	90
<i>Salmonella</i> subgroup 1	97	100	100	95	90	0	99	97
<i>Salmonella</i> subgroup 2	100	100	95	98	96	5	100	100
<i>Salmonella</i> subgroup 3 a	98	100	100	99	90	0	99	100
<i>Salmonella</i> subgroup 3 b	98	100	100	99	30	0	99	100
<i>Salmonella</i> subgroup 4	100	98	100	98	0	60	100	100
<i>Salmonella</i> subgroup 5	100	100	100	100	100	0	100	100
<i>Salmonella typhi</i>	97	100	100	97	0	0	100	82
<i>Serratia liquefaciens</i>	98	100	100	95	0	97	100	100
<i>Serratia marcescens</i>	96	99	99	97	0	95	99	7
<i>Serratia rubidaea</i>	99	100	100	85	0	99	100	99
<i>Shigella dysenteriae</i>	30	93	100	0	0	0	80	2
<i>Shigella sonnei</i>	90	99	100	0	10	0	100	2
<i>Shigella</i> species ( <i>S. boydii</i> , <i>S. flexneri</i> )	30	93	100	0	0	0	80	2
<i>Yersinia enterocolitica</i>	75	98	100	2	0	20	98	70
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	85	100	100	0	0	25	100	100

## 6. Beschreibung der Zusatztests für Enterobacteriaceen

(In Klammern die im Hauptteil des Codebuches verwendeten Abkürzungen)

### a) Kohlenhydrat-Verwertung

Arabit (**AROL**), Cellobiose (**CELL**), Glycerin (**GYOL**), Mannit (**MANN**), Trehalose (**TREH**), Salicin (**SALI**)

Für diesen Test wird eine Phenolrot-Bouillon benötigt, die wie folgt hergestellt wird:

<b>Lösung A</b>	Pepton	10,0	g
	Natriumchlorid	5,0	g
	Phenolrot	0,018	g
	destilliertes bzw. deionisiertes Wasser	800	ml
	pH-Wert auf 7,4 einstellen		

<b>Lösung B</b>	gewünschtes Kohlenhydrat	10,0	g
	destilliertes bzw. deionisiertes Wasser	200	ml

Die Lösungen A und B werden getrennt für 15 Minuten bei 121° C autoklaviert, nach dem Abkühlen gemischt und unter aseptischen Bedingungen in sterile Röhrchen abgefüllt. Eine positive Reaktion wird durch Gelbfärbung des Mediums angezeigt.

Die Ergebnisse der Kohlenhydrat-Verwertung für Maltose (**MALT**) und Xylose (**XYLO**) können direkt im Nonfermenter-Teil des Testsystems abgelesen werden.

### b) Äskulin-Hydrolyse (**ESCL**)

Dieser Test kann ebenfalls im Nonfermenter-Teil des Testsystems abgelesen werden.

### c) Gelatine-Verflüssigung (**GELT**)

Die Gelatine-Verflüssigung wird ebenfalls im Testsystem durchgeführt. Hierbei ist die Gebrauchsanleitung zu beachten. Es muß darauf hingewiesen werden, daß der Test bei 22° C durchgeführt werden muß. Hierzu kann der Gelatine-Teststreifen, Biotest Art.-Nr. 934 125 unter aseptischen Bedingungen in das Laktose-Näpfchen der Testplatte eingelegt und bei Raumtemperatur inkubiert werden.

### d) Jordan's Tartrat (**JTAR**)

Zusammensetzung:

Pepton	10,0	g
Natrium-Kalium-Tartrat	10,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Agar-Agar	15,0	g
Phenolrot	0,024	g
destilliertes Wasser	1000	ml
End-pH-Wert 7,8		

Die Lösung wird zum Kochen erhitzt und zu 3 bis 5 ml in Röhrchen mit Schraubverschluß aufgeteilt. Danach werden die Röhrchen 15 Minuten bei 121° C autoklaviert und anschließend in aufrechter Position abgekühlt. Das Medium wird durch tiefes Einstechen beimpft und für 18 - 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Positive Reaktionen werden durch Entwicklung einer Gelbfärbung angezeigt.

### e) KCN-Test (**KCNT**)

Für diesen Test wird folgende Bouillon hergestellt:

Proteose Pepton Nr. 3	3,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
KH <sub>2</sub> PO	0,225	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	5,64	g
destilliertes Wasser	1000	ml
End-pH-Wert 5,6		

Nach Lösung werden 1 ml im Röhrchen mit Schraubverschluß verteilt und für 15 Minuten bei 121° C autoklaviert. Das Medium muß anschließend im Kühlschrank aufbewahrt werden. K

vor Beimpfung werden 0,014 ml einer frisch zubereiteten 0,5%igen KCN-Lösung (in kaltem, sterilisiertem Wasser, **vorsicht giftig!**) zugefügt. Nach der Beimpfung wird die Verschlusskappe locker aufgesetzt und die Röhren für 18 - 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Ein positiver Test wird durch Wachstum angezeigt.

f) Lipase (**LASE**)

Zusammensetzung:

Pepton	10,0	g
Hefeextrakt	3,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Agar-Agar	20,0	g
Viktoriablau, 1:500	100	ml
destilliertes Wasser	900	ml
Maisöl	50	ml

End-pH-Wert 7,8

Nach Lösung werden 3 bis 5 ml in Röhren mit Schraubverschluss aufgeteilt und für 30 Minuten bei 113° C autoklaviert. Danach in schräger Position abkühlen lassen. Die Schrägfläche wird dann mit dem Testkeim beimpft und für 18 - 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Lipase-positive Keime bilden in dem Medium eine dunkelblaue Farbe. Da die Lipase-Reaktion bei einigen Keimen verzögert sein kann, sollten unbeimpfte Röhren als negativ-Kontrollen mitbebrütet werden.

g) Motilität (**MOTL**)

Da die Bestandteile verschiedener Beweglichkeitsmedien sehr unterschiedlich sind, wird empfohlen, die Beweglichkeit mit dem 'hängenden Tropfen-Test' oder durch Färbung der Geiseln durchzuführen. Wenn ein Beweglichkeitstest im Agarröhrchen erforderlich ist, wird das folgende Medium empfohlen:

Hefeextrakt	3,0	g
Pepton aus Casein	10,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Agar-Agar	3,0	g
destilliertes Wasser	1000	ml
Triphenyl-Tetrazoliumchlorid, 1%ig	5,0	ml

End-pH-Wert 7,2

Die Lösung wird zum Kochen erhitzt und zu je 4 ml in Röhren mit Schraubverschluss aufgeteilt. Danach wird für 15 Minuten bei 121° C autoklaviert. Anschließend in senkrechter Position abkühlen lassen. Zur Beimpfung wird mit einer geraden Impfnadel in das obere Drittel des Mediums gestochen, wobei dies möglichst im Zentrum des Röhrens geschehen soll. Danach wird für 24 bis 48 Stunden bei 37° C bebrütet. Bewegliche Mikroorganismen können sich sichtbar in den Agar hinein bewegen (Trübung des Agars vom Stichkanal ausgehend).

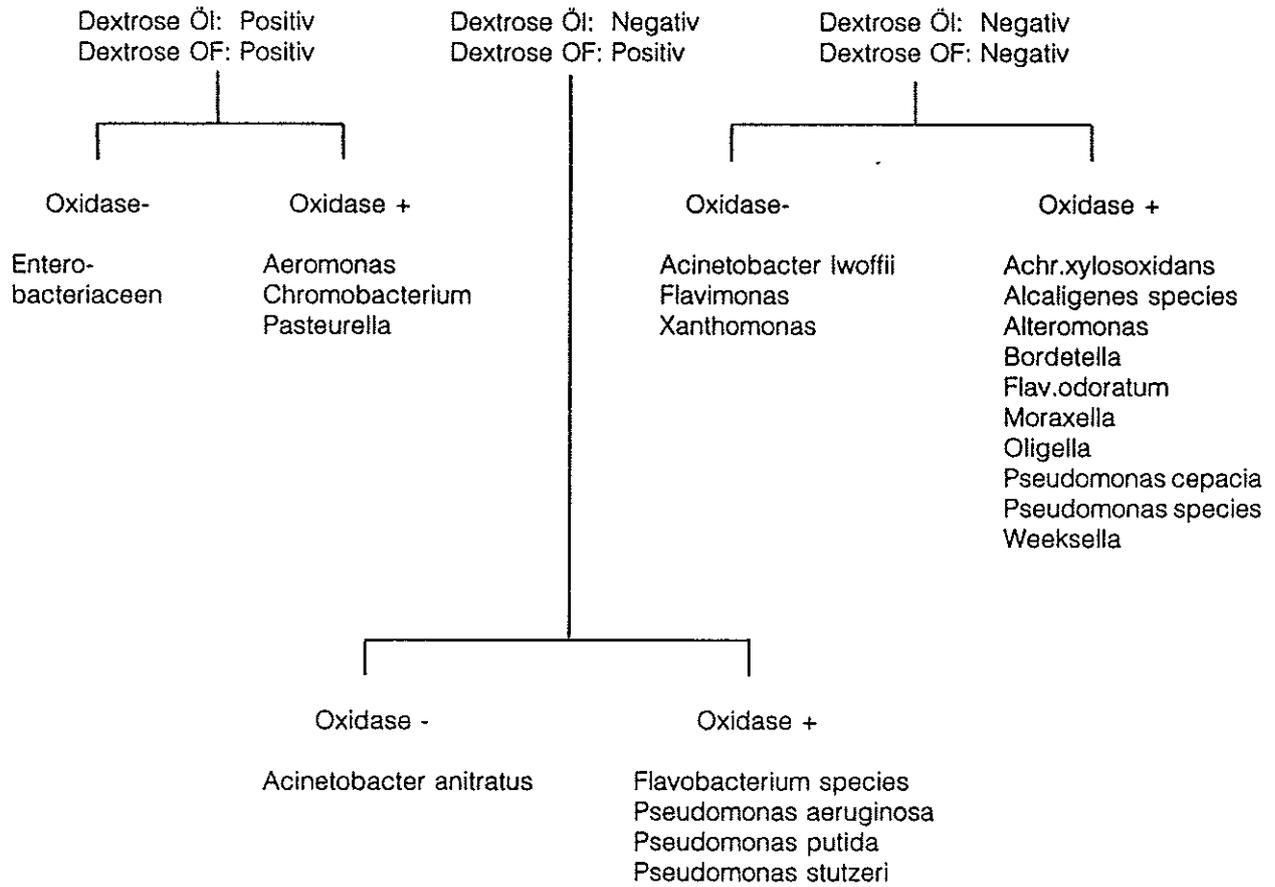
h) Mukat (**MUTE**)

Für den Mukat-Test wird folgende Bouillon hergestellt:

Pepton	10,0	g
1/10 N NaOH-Lösung	ca. 8,5	ml
destilliertes Wasser	1000	ml
Bromthymolblau-Lösung, 0,2%ig	12,0	ml
Natriummukat	10,0	g

Das Pepton und das Natriummukat werden in destilliertem Wasser gelöst und die Lösung mit der 1/10n NaOH-Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Danach wird die Bromthymolblau-Lösung zugesetzt, in Röhren zu je 4 ml abgefüllt und 20 Minuten im Dampftopf erhitzt. Zum Test werden je 2 Röhren mit einer 18 - 24-stündigen Bouillonkultur beimpft, 7 bis 14 Tage bei 37° C bebrütet und die Farbreaktion täglich überprüft. Eine positive Reaktion wird angezeigt durch einen Farbumschlag über grüngelb nach weiß, der sich dann zum Teil wieder nach blau zurückentwickeln kann.

## 7. Schlüsselreaktionen für Nonfermenter



## 8. Zusatztests (% positiv) für Nonvermenter

Spezies	Cetrimid	DNase	Fluoreszenz	Wachstum 42°C	Wachstum SS-Agar	Inosit	Lecithinase
<i>Achromobacter species</i>	0	0		40	100		0
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	100	0	0	96	100		0
<i>Acinetobacter anitratus</i>	0	0		98	1		0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0	0		62	1		8
<i>Aeromonas hydrophila</i>	30					0	
<i>Alcaligenes species</i>			0		33		0
<i>Alteromonas putrefaciens</i>	0			79	69		0
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0		0	64	48		0
<i>Chromobacterium violaceum</i>				85			
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	20		0	47	13		0
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	0	100		45	0		0
<i>Flavobacterium odoratum</i>		100		31			
<i>Flavobacterium species</i>	0	0		30	0		0
<i>Moraxella species</i>	0	0		40	0		0
<i>Oligella ureolytica</i>	0	0		0	30		0
<i>Pasteurella multocida</i>							
<i>Plesiomonas shigelloides</i>						100	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90		99	100	87		10
<i>Pseudomonas cepacia</i>	64		0	69	9		30
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	95		99	0	97		92
<i>Pseudomonas putida</i>	88		99	0	96		0
<i>Pseudomonas species</i>							
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0		0	92	85		1
<i>Shingomonas paucimobilis</i>	0			12	0		0
<i>Vibrio cholerae</i>		93(25°C)					
<i>Vibrio cholerae el tor</i>							
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		92(25°C)					
<i>Weeksella virosa</i>	0	0		70	0		0
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	0		0	59	0		0

## Zusatztests (% positiv) für Nonvermenter (Fortsetzung)

Spezies	OF-Fruktose	OF-Laktose	OF-Mannose	OF-Rhamnose	Phenylalanin-Deaminase	Stärke-Hydrolyse	Polymixin-Empfindlichkeit
<i>Achromobacter</i> species	100	0	75	75		0	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	4	0	67	0		0	
<i>Acinetobacter anitratus</i>	0	100	99	99		0	
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0	0	0	0		0	
<i>Aeromonas hydrophila</i>							
<i>Alcaligenes</i> species	0	0	0	0			
<i>Alteromonas putrefaciens</i>	19	7	4	7	0	0	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0	0	0	0	0		
<i>Chromobacterium violaceum</i>							
<i>Flavimonas oryzae</i>	100	0	100	93		40	
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	100	81	100	0	0	0	
<i>Flavobacterium odoratum</i>							
<i>Flavobacterium</i> species	97	0	97	1		100	100
<i>Moraxella</i> species	0	0	0	0	0	0	
<i>Oligella ureolytica</i>	0	0	0	0	100		
<i>Pasteurella multocida</i>							
<i>Plesiomonas shigelloides</i>							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91	0	83	24		1	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	100	100	100	0		0	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98	19	98	60	0	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	99	20	98	42	2	2	
<i>Pseudomonas</i> species							
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	0	93	42	92	92	
<i>Shingomonas paucimobilis</i>	94	97	100	41	3	3	
<i>Vibrio cholerae</i>					0		0
<i>Vibrio cholerae</i> el tor							100
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>					1		
<i>Weeksella virosa</i>	0	0	0	0	0		
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	99	89	98	0	0	0	

## 9. Beschreibung der Zusatztests für Nonfermenter

(In Klammern die im Hauptteil des Codebuches verwendeten Abkürzungen)

a) Cetrimid (**CETR**)

Die Wachstumsprüfung erfolgt auf Cetrimid-Agar, Biotest Art.-Nr. 902 270

c) DNase (**DASE**)

Der Nachweis des Enzyms DNase erfolgt auf DNase-Testagar, Biotest Art.-Nr. 902 635. Hierzu wird die Testplatte kräftig mit der zu untersuchenden Kultur beimpft und 18 - 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Anschließend wird die Platte mit 1 N HCl (vorsicht ätzend!) überflutet. Eine helle Zone um die Kolonien zeigt eine positive DNase-Reaktion an.

d) Fluoreszenz (**FLUR**)

Die Fähigkeit zu fluoreszieren kann mit der Primärkultur unter Zuhilfenahme einer UV-Lampe nachgewiesen werden.

e) Wachstum 42° C (**G42C**)

Die Wachstumsprüfung bei 42° C kann sowohl in flüssigen als auch auf festen Nährböden durchgeführt werden. Zu empfehlen ist CASO-Agar, Biotest Art.-Nr. 901 050.

f) Wachstum SS-Agar (**GRSS**)

Die Wachstumsprüfung erfolgt auf Salmonellen-Shigellen-Agar, Biotest Art.-Nr. 902 110.

g) Inosit (**INOS**)

Die Testung erfolgt im Inosit-Näpfchen des Enterobacteriaceen-Teils des Identifizierungssystems.

h) Lecithinase (**LECT**)

Der Lecithinase-Test wird auf Eigelb-Agar folgender Rezeptur untersucht:

Proteose-Pepton Nr. 2	40,0	g
Dinatriumphosphat	5,0	g
Monokaliumphosphat	1,0	g
Natriumchlorid	2,0	g
Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	0,1	g
Dextrose	2,0	g
Häminlösung 5 mg/ml	1,0	g
Agar-Agar	20,0	g
destilliertes Wasser	1000	ml

Alle Substanzen werden suspendiert und der pH-Wert auf 7,6 eingestellt. Danach wird die Suspension durch Kochen gelöst und 14 Minuten bei 118° C autoklaviert. Nach Abkühlen auf 50° C werden dann zu 90 ml Medium 10 ml einer 1:1 Eigelb-Kochsalz-Emulsion zugesetzt und in Platten abgefüllt. Für den Test werden die Platten mit einem einzigen Strich beimpft und für 18 - 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Danach wird nach einer wolkig-opaleszierenden Zone in der Umgebung des Ausstrichs untersucht.

i) Kohlenhydrat-Verwertung

OF Fruktose (**OFFR**), OF Laktose (**OFLA**), OF Mannose (**OFMO**), OF Rhamnose (**OFRH**)

Die Prüfung erfolgt unter Verwendung von OF-Basalmedium. Hierzu werden 9,4 g in kaltem, destilliertem Wasser suspendiert und zur vollständigen Lösung erhitzt. Danach werden Mengen von 100 ml abgefüllt und für 15 Minuten bei 121° C autoklaviert. Zu diesen 100 ml sterilem Basalmedium werden dann alternativ 10 ml einer 10%igen sterilen Fruktose-, Laktose-, Mannose- bzw. Rhamnose-Lösung zugefügt und gründlich durchmischt. Nach Abkühlen des Mediums auf ca. 45° C werden 3-5 ml in Röhrchen mit Schraubverschluß verteilt und abkühlen gelassen. Die Röhrchen werden dann als Stichkultur beimpft. Eine positive Reaktion wird durch Gelbfärbung des Mediums angezeigt.

j) Phenylalanin Deaminase (**PADA**)

Der Phenylalanin Deaminase-Test wird in folgendem Medium durchgeführt:

Hefeextrakt	3,0	g
DL-Phenylalanin	2,0	g
Dinatriumphosphat	1,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Agar-Agar	15,0	g
destilliertes Wasser	1000	ml

Die Substanzen werden durch Erhitzen gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Nach Abfüllen in Röhrchen wird der Nährboden für 10 Minuten bei 121° C autoklaviert und in Schräglage abkühlen gelassen. Zum Test wird die Schrägfläche kräftig beimpft. Die Röhrchen werden dann für 18 - 24 Stunden bebrütet. Die Oberfläche wird dann mit einigen Tropfen einer 10%igen FeCl<sub>3</sub>-Lösung beträufelt. Eine positive Reaktion wird durch eine grüne Verfärbung der Kolonien angezeigt.

k) Stärkehydrolyse (**STAR**)

Dieser Test kann in Mueller-Hinton-Bouillon durchgeführt werden. Bei Verwendung der MHK-ID-Combo kann dies direkt in der Wachstumskontrolle erfolgen, bei Verwendung von ID-GNI und ID-Trident muß dies außerhalb der Testplatte durchgeführt werden. Nach Inokulation des Mediums und Wachstum für 18 - 24 Stunden wird ein Tropfen Lugol'sche Lösung zugefügt. Die sofortige Entwicklung einer blauen Farbe bedeutet eine negative Reaktion. Keine Farbveränderung bedeutet eine positive Reaktion, d.h. die Stärke im Mueller-Hinton-Medium wurde durch den Testkeim hydrolisiert.

l) Polymixin Empfindlichkeit (**SPMX**)

Hierzu können handelsübliche Testblättchen mit 50 IE/units Polymixin im Agardiffusionsverfahren getestet werden.

## 10. Die häufigsten Code-Nummern

Code-Nummer	Spezies	Intraspezies-Häufigkeit	Code-Nummer	Spezies	Intraspezies-Häufigkeit
2015413	PRET	27,4%	2540774	ECOL	1,0%
2031400	MMOR	83,0%	2560654	ECOL	1,2%
2122050	HALV	13,7%	2560674	ECOL	1,5%
2211500	PVUL	38,6%	2560754	ECOL	1,5%
2225000	PMIR	2,6%	2560714	ECOL	1,7%
2225100	PMIR	0,5%	2614054	CFRE	8,3%
2231000	PMIR	19,5%	2614254	CFRE	5,3%
2235000	PMIR	16,1%	2654054	CFRE	6,5%
2235100	PMIR	4,2%	2654254	CFRE	4,2%
2237000	PMIR	0,3%	3122050	HALV	23,1%
2364054	SENT	25,0%	3125100	PMIR	0,7%
2420654	ECOL	0,8%	3225000	PMIR	2,7%
2420674	ECOL	0,9%	3231000	PMIR	11,6%
2420754	ECOL	0,9%	3235000	PMIR	19,7%
2420774	ECOL	1,1%	3235100	PMIR	5,2%
2430546	YENT	9,0%	3237000	PMIR	0,4%
2436455	CDIV	12,2%	3406361	SRUB	11,8%
2436655	CDIV	8,1%	3424166	SLIQ	5,0%
2474654	CAMA	13,2%	3464372	ESAK	47,0%
2474754	CAMA	16,1%	3464374	ENCL	1,8%
2476455	CDIV	20,0%	3464375	ENCL	0,7%
2476655	CDIV	13,3%	3466374	ENCL	7,8%
2500554	ECOL	0,4%	3466375	ENCL	3,2%
2500644	ECOL	0,7%	3474374	ENCL	4,5%
2500654	ECOL	3,5%	3474375	ENCL	1,8%
2500674	ECOL	4,3%	3476374	ENCL	19,0%
2500744	ECOL	0,8%	3476375	ENCL	7,8%
2500754	ECOL	4,1%	3506361	SRUB	18,4%
2500774	ECOL	4,8%	3514376	KPNE	0,8%
2516376	KPNE	0,5%	3514377	KPNE	6,8%
2516377	KPNE	3,9%	3514777	KOXY	6,8%
2520454	ECOL	0,5%	3516376	KPNE	7,6%
2520474	ECOL	0,6%	3516377	KPNE	61,1%
2520554	ECOL	0,6%	3516776	KOXY	7,6%
2520644	ECOL	1,1%	3516777	KOXY	61,1%
2520654	ECOL	5,6%	3524106	SMAR	18,8%
2520674	ECOL	6,6%	3524107	SMAR	17,4%
2520744	ECOL	1,3%	3524166	SLIQ	8,9%
2520754	ECOL	6,6%	3524377	EAER	16,5%
2520774	ECOL	7,8%	3526377	EAER	49,4%
2524166	SLIQ	8,9%	3534106	SMAR	12,0%
2540654	ECOL	0,8%	3534107	SMAR	11,0%
2540674	ECOL	0,9%	3536270	EGER	24,8%
2540754	ECOL	0,9%	3536270	EGER	17,9%

## 11. Literatur

1. Edwards, P.R., and W. H. Ewing. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Co. Minneapolis.
2. Brenner, D. J., J. J. Farmer II, F. W. Hickman, M. A. Asbury, A. G. Steigerwalt. 1977. Taxonomic and Nomenclature Changes in Enterobacteriaceae. U. S. Department of Health, Education & Welfare (HEW Publication No. [CDC] 78-8356). Atlanta, GA, 30333.
3. Ewing, W. H., Differentiation of Enterobacteriaceae by Biochemical Reactions. Revised 1973. Dept. Health, Education & Welfare (HEW Publication No. [CDC] 75-8720. Atlanta, GA. 30333.
4. Ewing, W. H. and R. Hugh. Aeromonas. In E. H. Lennette, E. H. Spalding and J. P. Truand, eds., Manual of Clinical Microbiology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1974.
5. Sonnenwirth, A. C. Yersinia, IBID.
6. Le Minor, L., and F. Ben Hamida. 1962. Avantages de la Recherche de la  $\beta$ -Galactosidase Sur Celle de la Fermentation du Lactose en Milieu Complexe Dans le Diagnostic Bacteriologique, en Particulier des Enterobacteriaceae. Ann. Inst. Pasteur, 102.267-277.
7. Borchardt, K. A., and J. Gibson, 1977. Comparison of Enteric Identification Systems. Health Laboratory Science, 14, 1, 5-9.
8. Kelly, S. A. and J. A. Washington. 1979. Evaluation of the Micro-Media System for Identification of Enterobacteriaceae. J. Clin. Micro. 10:4, 515-518.
9. Barry, A. L., R. E. Badal, and L. J. Effinger. 1979. Identification of Enterobacteriaceae in Frozen Microdilution Trays Prepared by Micro-Media Systems. J. Clin. Micro. 10:4, 492-496.
10. Lindberg, A. A., L. Le Minor: Serology of Salmonella. In Bergan, T.: Methods in Microbiology, Vol. 15. Academic Press, London 1984 (pp. 1-64).
11. Le Minor, L., M. Y. Popoff: Antigenic formulae of the Salmonella serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris 1987.
12. Table of biochemical reactions, Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1991, 361-364.