

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie befaßt sich mit der Entwicklung eines semi-automatischen biochemischen Identifizierungs-Systems für Clostridien (Titertek), bei dem die Beimpfung der Testplatte manuell erfolgt, die Absorptionsmessung der Tests und die anschließende Analyse der Meßwerte computergesteuert sind.

Die Bebrütung der Testplatte erfolgte anaerob 24 Stunden bei 37°C.

Das Testsystem besteht aus einer Kombination von 7 verschiedenen Tests (Indol, H₂S, Esculin, Urease, ODC, ADH, Nitrat), 23 Kohlenhydratfermentationen und 61 chromogenen Substraten zum Nachweis von Glucosidasen, Phosphatasen, Aminopeptidasen und Proteasen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden 222 Stämme 26 verschiedener Clostridium-Species auf die Verwertung dieser 91 Testsubstrate untersucht. Die Ergebnisse dienten als Grundlage für die Errichtung einer Datenbank für das Identifizierungssystem.

Zum Vergleich der Ergebnisse wurden parallel dieselben Stämme auf konventionelle Art in der "Bunten Reihe" getestet.

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

Eindeutigere Ergebnisse wurden erzielt, wenn als Vorkulturen zur Beimpfung der Testplatte Hefeextrakt-Cystein-Blutagar-Kulturen statt Tarozzi-Bouillon-Kulturen verwendet wurden. Bei dieser Verfahrensweise gab es weniger falsch negative Ergebnisse.

Durch Vergleich der Absorptionswerte mit den mit bloßem Auge ermittelten +/- Ergebnissen wurden die Schwellenwerte für die jeweiligen Tests festgelegt, welche als Grundlage für die Auswertung der Reaktionen dienten.

Die Analyse der Testergebnisse zeigte, daß einige Tests keine oder nur geringe Aussagekraft besaßen und nicht zur Identifizierung beitragen. Durch Ermittlung der Trennwerte und durch simulierte Reduktion der Testpalette konnten daraufhin die 91 Ausgangssubstrate auf 24 Tests und den Indoltest reduziert werden. Die endgültige Testpalette besteht somit aus 5 verschiedenen Tests, 9 Kohlenhydratfermentationen und 11 chromogenen Substraten:

IND, H₂S, ESC, ADH, NIT,
GLU, MÄL, FRU, SUC, MAN, GLY, RIB, TRE, CEL,
bGL, bNA, bGA, DCE, bLA, APH, LIP, LEU, PRO, SO₁, PHE.

Mit Hilfe des Titertek-Verfahrens - unabhängig von der Anzahl der Tests - lassen sich folgende Species nicht voneinander abgrenzen:

C.hastiforme	:	C.cochlearium
C.sporogenes	:	C.cochlearium
C.sporogenes	:	C.hastiforme
C.sporogenes	:	C.putrificum
C.subterminale	:	C.putrificum

Von 222 getesteten Stämmen konnten 208 Stämme mit Hilfe des erarbeiteten Identifizierungsprogrammes richtig identifiziert werden. 10 Stämme wurden falsch identifiziert: C.barati (1), C.histolyticum (1), C.cochlearium (3), C.putrificum (1), C.difficile (1), C.malenominatum (2), C.tetanomorphum (1). Bei 4 Stämmen war keine Identifizierung möglich: C.perfringens (1), C.tetanomorphum (3).

Der Vergleich der Ergebnisse der "Bunten Reihe" mit den entsprechenden Testreaktionen auf der Testplatte ergab zum Teil erhebliche Abweichungen (10,7 %). Die häufigsten Abweichungen zeigten der Esculintest und der H₂S-Nachweis.

7. Summary

Kathrin Arias Rodriguez: Development and examination of a semi-automated system for routine identification of clostridia

This study examines the development of a new semi-automated biochemical micromethod identification system (Titertek). Plates were inoculated manually, evaluation was performed by a microplate reader (Multiscan MCC) linked to a personal computer.

The anaerobe inoculation of the microplate was carried out during 24 hours at a temperature of 37°C.

The tests include 7 different tests, 23 sugar fermentation tests, 61 chromogenic substrates for the detection of glycosidases, phosphatases, aminopeptidases, proteolytic enzymes and 5 controls.

These 91 biochemical tests in microplates have been screened with 222 strains which represent 26 Clostridia species. On the basis of these results the database for the identification program was performed. For reasons of comparison the same strains have been screened with the conventional biochemical method.

The following results were obtained:

The procedure, using a cell suspension prepared from growth on yeast-cystein-blood-agar-plates as inoculum for the microplates, gave the smallest number of false-negative results.

The threshold values for the tests have been determined by comparison of the photometrically analysed results with visually analysed results.

The analysis of the results showed that some of the tests were not expressive and did not contribute to the identification at all. By discrimination analysis and simulated reduction of the prototype microplate it was possible to reduce the 91 original biochemical substrates to 24 tests and the indole-test. The final microplate contains 5 different tests, 9 sugar fermentation tests and 11 chromogenic substrates.

IND, H₂S, ESC, ADH, NIT,
GLU, MAL, FRU, SUC, MAN, GLY, RIB, TRE, CEL,
BGL, bNA, DCE, bLA, APH, LIP, LEU, PRO, SO1, PHE

The new Titertek-system is not able to separate the following species:

C.hastiforme : C.cochlearium
C.sporogenes : C.cochlearium
C.sporogenes : C.hastiforme
C.sporogenes : C.putrificum
C.subterminale : C.putrificum

Correct identification occurred for 208 strains from 222 test strains. Misidentification occurred for 10 strains: C.barati (1), C.histolyticum (1), C.cochlearium (3), C.putrificum (1), C.difficile (1), C.malenominatum (2), C.tetanomorphum (1). 4 strains could not be identified at all: C.perfringens (1), C.tetanomorphum (3).

The comparison of results from conventional biochemical tests with results from the corresponding tests on the microplate showed discrepancies of 10,7 %. The test Esculin and H₂S production showed the highest discrepancies.