

Zur Erkennung von *Burkholderia pseudomallei* (Ursache der Melioidose) im bakteriologischen Routinelabor

Alexander von Graevenitz

Einleitung

Die Melioidose, hervorgerufen durch das gramnegative nichtfermentierende Stäbchen *Burkholderia pseudomallei*, galt lange Zeit als auf Gegenden zwischen dem 20. nördlichen und dem 20. südlichen Breitengrad beschränkt, insbesondere aber auf Südostasien und Nordaustralien [1]. Infolge der Kriege in Südostasien und der Zunahme des Tourismus aus diesen Gegenden sind aber bereits im vorigen [1] und in diesem [2] Jahrhundert nach Europa importierte Fälle beschrieben worden. So wurden während der Amtszeit des Schreibenden am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich in den 1990er Jahren bei Patienten, die in Thailand gereist waren, zwei Stämme identifiziert. Nach dem Tsunami von 2004 wurde vermehrt über Isolierungen von *Burkholderia pseudomallei* aus asiatischen [3] und europäischen [4] Laboratorien berichtet. Da die Melioidose bei der isolierten pneumonischen Form mit einer Letalität von ungefähr 15%, bei der septikämischen Form sogar mit einer solchen von bis zu 85% behaftet ist [2] und *Burkholderia-pseudomallei*-Stämme nur sehr selten als Kolonisatoren (etwa im Rachen bei Herden anderswo im Körper [5] oder bei Mukoviszidose [6]) auftreten, ist eine schnelle Erkennung des Erregers auch in den hiesigen Laboratorien wünschenswert.

In den vergangenen Jahren ist das diagnostische Instrumentarium parallel zum Interesse an *Burkholderia pseudomallei* erheblich gewachsen. Für das kleine oder mittelgroße Laboratorium sind jedoch die meisten empfohlenen Kulturmedien und Testsysteme entwe-

der nicht erhältlich, zu teuer oder, da sie zu selten verwendet werden, für eine Anschaffung ungeeignet. Das gilt sowohl für Selektivmedien [7] als auch für die Immunfluoreszenz [8], die Agglutination mit monoklonalen Antikörpern [9], für diverse PCR-Systeme [10] sowie für die immer mehr aus dem diagnostischen Labor zugunsten der Sequenzierung [11] verdrängte Gaschromatographie der zellulären Fettsäuren [9]. Diese diagnostischen Mittel werden deshalb hier nicht besprochen.

Patientenanamnese und Probenauswahl

Sofern eine Reiseanamnese des Patienten eruiert werden kann, sind Aufenthalte in Laos, Vietnam, Thailand (v.a. im Nordosten), Indonesien, Malaysia und Nordaustralien (Northern Territory, Nord-Queensland, Kimberley-Distrikt) relevant, insbesondere wenn diese während der Monsunzeit stattgefunden haben. Sporadische Fälle sind allerdings auch aus Südostasien, Mittelamerika [1, 2] und kürzlich auch aus Nordostbrasilien [12] berichtet worden. Da die vorwiegenden Eintrittspforten Wunden und der Respirationstrakt (von denen eine Sepsis ausgehen kann) sind, wird *Burkholderia pseudomallei* vor allem aus Wunden, Sputum und Blut, seltener aus Urin, isoliert [2]. Bei der chronischen Form, die sich mitunter erst Jahre nach der Primärinfektion manifestiert, können aber auch andere Organe (z.B. die Prostata bei Erwachsenen oder die Parotis bei Kindern) betroffen sein. Bei erwachsenen Patienten, die wesentlich häufiger als Kinder erkranken, liegen – sofern die Infektion nicht durch ein massives Inokulum hervorgerufen wurde – meist Grundkrankheiten wie Diabetes melli-

tus, Alkoholismus oder Niereninsuffizienz vor [2].

Kultivierung von

Burkholderia pseudomallei

Burkholderia pseudomallei wächst auf Blut- und auf MacConkey-Agar, auf letzterem zunächst in Form von laktosenegativen, später infolge der Laktoseoxidation rosa gefärbten Kolonien. Die meisten Stämme zeigen anfangs glatte Kolonien, die sich nach 48 Stunden radspeichenförmig zu falten be-



Nach dem Tsunami von 2004 wurde vermehrt über Isolierungen von *Burkholderia pseudomallei* aus asiatischen [3] und europäischen Laboratorien berichtet.



ginnen. Beide Morphologien können aber zusammen existieren, so dass, ähnlich wie bei *Pseudomonas stutzeri*, der Eindruck einer Mischkultur entstehen kann. Manchmal kann sich im Verlauf ein bräunliches Pigment bilden. Zudem strömen die Kulturen einen putriden Geruch aus. Beim Vorliegen einer derartigen Kultur empfiehlt sich ihre Weiterverarbeitung im Abzug sowie unter Verschluss der Platten, obwohl Laborinfektionen mit *Burkholderia pseudomallei* zu den Seltenheiten gehören [13]. Vom «Beriechen» der Platten ist abzusehen. Bei *Burkholderia mallei*, dem Rotzerreger, der heutzutage beim Menschen sehr selten auftritt, werden nur glatte Formen und keine Pigmentbildungen beobachtet.

Ein Medium, das unter Umständen in Routinelaboratorien vorhanden ist und das neben dem Ashdown-Medium und dessen Variationen [14] für die Selektion von *Burkholderia pseudomallei* verwendet werden kann, ist *Burkholderia-cepacia*-Agar [7], der Polymyxin B und Ticarcillin enthält und deshalb für die Isolierung von *Burkholderia cepacia* aus Sputum bei Mukoviszidose verwendet wird. Allerdings lassen sich die Koloniemorphologie der beiden Spezies auf diesem Agar nicht unterscheiden.

Gas (!), die bei *Burkholderia pseudomallei* und *Pseudomonas stutzeri* positiv, bei *Burkholderia mallei* negativ ist, sowie das Wachstum bei 42 °C (positiv bei *Burkholderia pseudomallei*, negativ bei *Burkholderia mallei*, variabel bei *Pseudomonas stutzeri*). Hierfür empfehlen sich traditionelle Medien. Bei der gleichzeitig stattfindenden Resistenztestung (siehe unten) ist darauf zu achten, dass auch ein Colistin- oder ein Polymyxinblättchen verwendet wird.

Die Arginindihydrolase (positiv bei *Burkholderia mallei* und *Burkholderia pseudomallei*, negativ bei *Pseudomonas stutzeri*) kann im allgemeinen wegen des Mangels an traditionellen Testmedien nicht als Differentialkriterium herangezogen werden. Im Gegensatz zu früher erhobenen Resultaten [15] hat sich nämlich in zwei Untersuchungen gezeigt, dass sowohl die Arginindihydrolase als auch einige Assimilationstests in diagnostischen Galerien (API 20 NE; bioMérieux) bzw. Systemen (VITEK, bioMérieux) Resultate liefern können, welche die Mehrzahl der *Burkholderia-pseudomallei*-Stämme nicht erkennen liessen [9, 16]. Bei der Eingabe bekannter biochemischer Testresultate konnte auch der angenommene (in der Datenbasis nicht vorhandene) Code von *Burkholderia mallei* nicht produziert werden. Das RapID-NF-Plus-System (Remel) konnte ebenfalls beide Spezies nicht identifizieren [16]. Während die Akkuratessse des VITEK 1 (bioMérieux) in einer früheren Arbeit [15] zufriedenstellend war, wiesen die bisherigen Resultate mit VITEK 2 (bis Version 4.02 bei 60/XL und Version 1.02 bei Compact) eine unbefriedigende Sensitivität für *Burkholderia pseudomallei* auf und variierten je nach Medium, von dem das Inokulum stammte (63–81%); die neueren Versionen 4.03 des VITEK 2 60/XL und 2.0 des Compact zeigten hingegen zufriedenstellende Sensitivitäten [17]. Bei der Diagnose nichtfermentierender gramnegativer Stäbchen ist in jedem Fall darauf zu achten, dass die durch Testsysteme ermittelte Diagnose auch mit den morphologischen Kriterien (Koloniemorphologie, Pigmentbildung, Geruch usw.) übereinstimmt. Die Spezies *Burkholderia thailandensis*, die bisher nur in einem einzigen

Fall bei Menschen aufgetreten ist [18], vermag im Gegensatz zu *Burkholderia pseudomallei* Arabinose zu assimilieren; ihre Virulenz ist wesentlich schwächer als jene von *Burkholderia pseudomallei*. Die Spezies *Burkholderia oklahomensis*, deren Virulenz bisher unbekannt ist, lässt sich durch Standardtests nicht verlässlich von *Burkholderia pseudomallei* unterscheiden [19]. Beide werden wahrscheinlich im Routinelabor als *Burkholderia pseudomallei* diagnostiziert; sie werden durch eine 16S-rRNS-Gen-Sequenzierung identifiziert.

Antibiotische Resistenz

Standardisierte Diffusionstests existieren bisher noch nicht. Bei MHK-Bestimmungen war *Burkholderia pseudomallei* resistent gegen Ampicillin, Cephalosporine der ersten und zweiten Generation sowie gegen Aminoglykoside und zeigte bei der Verwendung der CLSI-Methodik keine Zone um Blättchen mit Polymyxin B bzw. Colistin. Die zuletzt erwähnte Resistenz ist auch diagnostisch wertvoll [1]. Bisher waren die meisten Stämme empfindlich gegen Amoxicillin/Clavulansäure, Cephalosporine der dritten Generation, Piperacillin, Imipenem und Doxycyclin [2, 20]. Auch eine gelegentliche Resistenz gegen Trimethoprim-sulfamethoxazol und Ciprofloxazin ist beschrieben [2, 20]. Im Gegensatz zu *Burkholderia pseudomallei* ist *Pseudomonas stutzeri* empfindlich gegen Colistin und Aminoglykoside [1, 21] und *Burkholderia mallei* gegen Aminoglykoside [21].

Einsendung an ein Referenzlabor

In der Schweiz existiert bisher kein Referenzlabor für *Burkholderia pseudomallei*. Verdächtige Isolate sollten durch Sequenzierung identifiziert werden. Beim Hantieren mit diesem Keim sind die Biosafety-Level-2-Vorschriften zu beachten. Vor der Einsendung empfiehlt es sich, mit dem betreffenden Laboratorium Kontakt aufzunehmen.

Korrespondenz:
Prof. Dr. med. Alexander von Graevenitz
Medizinische Mikrobiologie
Universität Zürich
Gloriastrasse 32
8006 Zürich
avg@immv.unizh.ch



Da die vorwiegenden Eintrittspforten Wunden und der Respirationstrakt (von denen eine Septikämie ausgehen kann) sind, wird *Burkholderia pseudomallei* vor allem aus Wunden, Sputum und Blut, seltener aus Urin, isoliert.



Mikroskopie

Das Grampräparat aus Kultur und aus Proben zeigt gramnegative Stäbchen, die polar gefärbt sein können.

Identifikation

Zunächst muss ein Oxidasetest vorgenommen werden, der bei *Burkholderia pseudomallei* stets positiv ist. Bei Mischkulturen muss selbstverständlich jede Komponente separat getestet werden. Oxidasepositive Kolonien werden sodann auf Kligler- oder TSI-Agar verbracht, auf denen nichtfermentierende Organismen bekanntlich nur auf der Schrägfläche wachsen können. Infolge der Laktoseoxidation durch *Burkholderia pseudomallei* kann diese sich gelb verfärben. Wegen des mangelhaften Wachstums in Stichkulturen ist eine Feststellung der Beweglichkeit nur mikroskopisch möglich (*Burkholderia pseudomallei* und *Pseudomonas stutzeri* sind beweglich, *Burkholderia mallei* ist unbeweglich), was allerdings aus Sicherheitsgründen nicht empfehlenswert ist. Ein weiterer Schritt ist die Feststellung der Nitratreduktion zu

Literatur

- 1 von Graevenitz A. Clinical microbiology of unusual *Pseudomonas* species. *Progr Clin Pathol.* 1973;5:185–218.
- 2 Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:383–416.
- 3 Chierakul W, Winothai W, Wattanawaitunechai C, Wuthiekanun V, Rugtaengan T, Jitpratoom P, et al. Melioidosis in 6 tsunami survivors in Southern Thailand. *Clin Infect Dis.* 2005;41:982–90.
- 4 Nieminen T, Vaara M. *Burkholderia pseudomallei* infections in Finnish tourists injured by the December 2004 tsunami in Thailand. *Euro Surveill.* 2005;10(3):E050303.4.
- 5 Wuthiekanun V, Supputamongkol Y, Simpson AJH, Kanaphun P, White NJ. Value of throat swab in diagnosis of melioidosis. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3801–2.
- 6 Holland DJ, Wesley A, Drinkovic D, Currie BJ. Cystic fibrosis and *Burkholderia pseudomallei*: an emerging problem? *Clin Infect Dis.* 2002;35:e138–40.
- 7 Peacock SJ, Chieng G, Cheng AC, Dance DAB, Amornchai P, Wongsuvan G, et al. Comparison of Ashdown's medium, *Burkholderia cepacia* medium, and *Burkholderia pseudomallei* selective agar for clinical isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5359–61.
- 8 Wuthiekanun V, Desakorn V, Wongsuvan G, Cheng AC, Maharjan B, Limmathurotsakul D, et al. Rapid immunofluorescence microscopy for diagnosis of melioidosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12:555–6.
- 9 Inglis TJJ, Merritt A, Chidlow G, Aravena-Roman M, Harnett G. Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2201–6.
- 10 Wattiau P, van Hesse M, Neubauer H, Zachariah R, Wernery U, Imberechts H. Identification of *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria by multiple-locus sequence typing-derived PCR and real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1045–8.
- 11 Gee JE, Sacchi CT, Glass MB, De BK, Weyant RS, Levett PN, et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4647–54.
- 12 Rolim DB, Vilar DCFL, Sousa AQ, Miralles IS, de Oliveira DCA, Harnett G, et al. Melioidosis, Northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1458–60.
- 13 Dance DAB, Smith MD, Wuthiekanun V, Walsh M, White NJ. Melioidosis and laboratory safety. *J Hosp Infect.* 1992;22:333–4.
- 14 Howard K, Inglis TJJ. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3312–6.
- 15 Lowe P, Engler C, Norton R. Comparison of automated and nonautomated systems for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4625–7.
- 16 Glass MB, Popovic T. Preliminary evaluation of the API 20NE und RapID NF Plus systems for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:479–83.
- 17 Lowe P, Haswell H, Lewis K. Use of various common isolation media to evaluate the new VITEK 2 colorimetric GN card for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:854–6.
- 18 Glass MB, Gee JE, Steigerwalt AG, Cavuoti D, Barton T, Hardy RD, et al. Pneumonia and septicemia caused by *Burkholderia thailandensis* in the United States. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4601–4.
- 19 Glass MB, Steigerwalt AG, Jordan JG, Wilkins PP, Gee JE. *Burkholderia oklahomensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species formerly known as the Oklahoma strain of *Pseudomonas pseudomallei*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:2171–6.
- 20 Kenny DJ, Russell P, Rogers D, Eley SM, Titball RW. In-vitro susceptibilities of *Burkholderia mallei* in comparison to those of other pathogenic *Burkholderia* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2773–5.