

Mikrobiologische Analysen zur Qualitätsbeurteilung von Dialyseflüssigkeiten –

Bemerkungen über deren Aussagekraft

Seit einigen Jahren gehört die **mikrobiologisch-hygienische Kontrolle von Dialyseflüssigkeiten** (insbesondere Permeat, Bicarbonat-Konzentrat und fertige Dialyseflüssigkeit) zum Standard in modernen Dialysezentren. In diesem Beitrag hinterfragt der Mikrobiologe *Dr. Arndt Goppelsröder* kritisch die Aussagekraft mikrobiologischer Analysen, die zur Qualitätsbeurteilung von Dialyseflüssigkeiten herangezogen werden.

Empfehlungen zur Durchführung einer mikrobiologisch-hygienischen Qualitätskontrolle sind in den »Leitlinien für die Praxis der angewandten Hygiene in Behandlungseinheiten für Dialyse« des Arbeitskreises für angewandte Hygiene in der Dialyse⁽¹⁾ formuliert. Die hierin angeführten, standardisierten Analysemethoden haben sich insbesondere als Werkzeuge zum Schutz der Patienten vor akuten Pyrogen-

reaktionen bewährt und erlauben eine gewisse Einschätzung des Hygienezustandes der verwendeten Flüssigkeiten. Methodisch bedingte Unzulänglichkeiten schmälern allerdings die Aussagekraft der Befunde. Dies wird nun oftmals bei deren Beurteilung und der Risikoabwägung im Hinblick auf Gesundheitsbeeinträchtigungen infolge einer chronischen Belastung der Patienten mit geringen Pyrogenmengen nicht ausreichend berücksichtigt.

Probengewinnung

Bereits die üblichen Beprobungsstrategien beinhalten einige Schwächen, die – einmal erkannt – dazu führen müssen, Analyse-
daten relativiert zu bewerten. Grob betrachtet lassen sich bezüglich der Dialyseflüssigkeiten drei Teilsysteme unterscheiden, für die eine Qualitätskontrolle zu fordern ist:

- Umkehrosmose mit Permeatleitungen,
- Bicarbonatsystem,
- Dialysierflüssigkeit in jedem einzelnen Dialysegerät.

Gängig ist die Entnahme eines geringen Flüssigkeitsvolumens an einer oder mehreren Probennahmestellen zur Analyse im Labor. Entnimmt man an einer Stelle der Permeat-Ringleitung eine Probe von 100 ml, ist darin nun die Information über den mikrobiologisch/hygienischen Zustand des durchfließenden Permeats, zu einer bestimmten Betriebszeit, während eines bestimmten, kurzen Entnahmezeitraums (wenige Sekunden), an einer bestimmten Stelle im System »eingefangen« – nicht mehr! Selbstverständlich lässt die Beprobung des Permeats keine unmittelbaren Rückschlüsse auf die Qualität der Dialysierflüssigkeit in einem bestimmten Dialysegerät zu. Die kleine Einzelprobe enthält sogar nur Bruchteile der Informationen,

die nötig wären, lediglich das gesamte Permeatsystem möglichst wissenschaftlich korrekt zum Zeitpunkt der Probennahme beurteilen zu können. Hinzu kommt, dass mit Hilfe der gängigen Routineanalysen wiederum nur ein Teil der in einer Probe enthaltenen Informationen aufgeschlüsselt werden kann. Auch drei weitere Proben der gleichen Art aus einem Versorgungsnetz, das möglicherweise 200 m und mehr lang ist, würden an diesen Tatsachen nichts Wesentliches ändern^(2,3). Wo liegen im Einzelnen die Probleme?

Besiedlung eines Systems durch Mikroorganismen – Biofilme

Mikroorganismen in wässrigen Systemen neigen generell dazu, sich in einem für sie energetisch besonders günstigen Umfeld anzureichern und sich dort zu vermehren. Insbesondere in »Extrembiotopen«, wie es das Bicarbonat-Konzentrat und das nährstoffarme Permeat darstellen, aber auch unter den günstigeren Lebensbedingungen in der fertigen Dialysierflüssigkeit, findet zunächst eine Anheftung von Zellen an flüssigkeitüberströmten Oberflächen statt. Sind die minimalsten Ansprüche eines so immobilisierten Mikroorganismus befriedigt, beginnt er sich zu teilen, Mikrokolonien zu bilden, die schließlich zusammenwachsen können. Man spricht dann von einem »Biofilm«. In einem solchen initialen Biofilm, der zunächst durch besonders anpassungsfähige Bakterien gebildet wird, entstehen nun unter Umständen auch Verhältnisse, die es anspruchsvolleren Mikroorganismen ermöglichen, darin Fuß zu fassen. Biofilme können weite Teile eines Versorgungssystems oder aber nur wenige Abschnitte davon bewachsen. Wo ein Biofilm lokalisiert ist und in welcher Ausprägung er sich entwickeln konnte, lässt sich durch eine Beprobung der über ihn hinwegfließenden Flüssigkeit nicht feststellen. Auch stellen

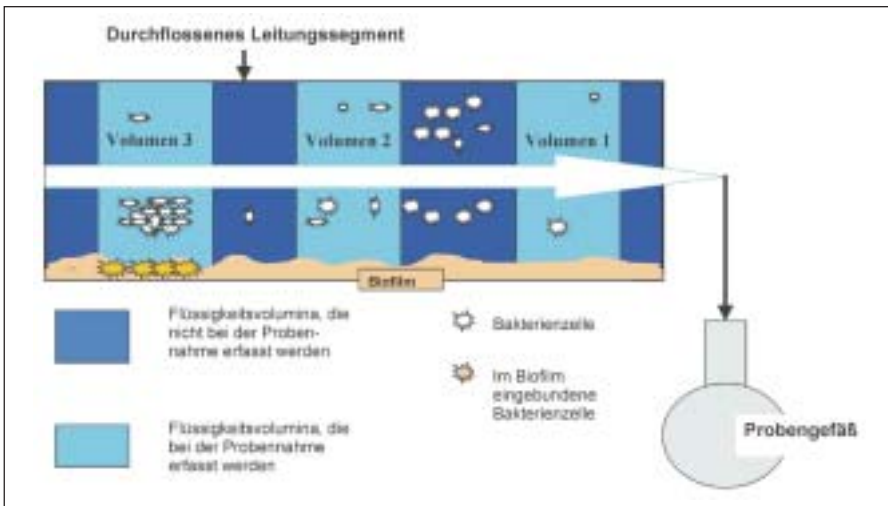


Abb. 1: Probenentnahme inhomogener Suspensionen

Biofilme dynamische Gebilde dar. Je nach physiologischem Zustand und in Abhängigkeit von den einwirkenden Scherkräften gibt er einmal mehr, einmal weniger Zellen frei, die dann im vorbeifließenden Medium als Zellaggregate oder als Einzelzellen suspendiert werden. Diese Suspension ist nicht homogen. So können im Volumen 1, das als Probe genommen wurde, wenige Zellen enthalten sein, in der nachfolgenden Flüssigkeitssäule, die ungenutzt abläuft, zehnmal so viel oder mehr (Abb. 1). Gleiches trifft auch auf Stoffwechsel- und Abbauprodukte zu, die aus einem Biofilm abgegeben werden⁽³⁾.

Bearbeitung des Informationsgehalts einer Probe

In einer Flüssigkeitsprobe können Zellen oder Zellaggregate von Mikroorganismen, deren Stoffwechsel- und Abbauprodukte, und organische beziehungsweise anorganische chemische Verunreinigungen anderen Ursprungs enthalten sein. Letztere stammen beispielsweise aus Leitungs- und Dichtungsmaterialien. Zur (bis dato: unvollständigen) Analyse dieser Faktoren haben sich zwei Routinemethoden etabliert: Die Bestimmung des »Keimgehaltes« und die Ermittlung des Endotoxingehaltes einer Dialyseflüssigkeit.

Die Bestimmung des »Keimgehaltes«

Der »Keimgehalt« von Dialyseflüssigkeiten wird als koloniebildende Einheiten/ml (KBE/ml) ausgedrückt. Im Prinzip wird auf einem festen Nährmedium (Nähr-Agar) eine definierte Menge der zu überprüfenden Flüssigkeit gleichmäßig aufgebracht, bei etwa 20 °C und 37 °C bebrütet, danach die gewachsenen, sichtbaren Kolonien ausgezählt und auf 1 ml Probenflüssigkeit

berechnet. Eine andere Möglichkeit besteht darin, ein definiertes Probenvolumen über einen sterilen Bakterienfilter zu filtrieren und das Filterblättchen danach auf den Nähr-Agar zu legen. Bei Bedarf können dann die so erhaltenen Einzelkolonien weiter bearbeitet, und etwa eine Keimdifferenzierung durchgeführt werden.

Die kulturtechnisch ermittelte Anzahl der KBE/ml repräsentiert nun keineswegs die Gesamtkeimzahl im Prüfgut. Bei allen bekannten Kulturmethoden werden nur

solche Mikroorganismen zu sichtbaren Kolonien auswachsen, die in der Lage sind, das in dem Kulturmedium enthaltene Nährstoffspektrum in der angebotenen Konzentration entsprechend zu nutzen. Weitere ausschlaggebende Faktoren sind die Bebrütungstemperatur und die Dauer der Inkubation. Schnell wachsende Arten können langsam wachsende bei einer bestimmten Temperatur und Bebrütungszeit unterdrücken. Auf einem definierten Kultur-Agar werden die einen Arten gedeihen, die anderen eben nicht oder zu langsam, so dass sie überwuchert oder gehemmt werden. Man kann es sozusagen nicht jedem Mikroorganismus gleich »recht machen«. Zellaggregate von einigen hundert Zellen wachsen genauso zu einer einzigen sichtbaren Kolonie aus, wie eine Einzelzelle. Überhaupt nicht erfasst werden Formen, die zwar stoffwechselaktiv sind, sich aber auf den bekannten Medien nicht kultivieren lassen und nur mikroskopisch nachgewiesen werden können. Vergleicht man die mikroskopisch ausgezählte Gesamtzellzahl in einer Wasserprobe mit den kulturtechnisch ermittelten koloniebildenden Einheiten aus der gleichen Probe bei Verwendung verschiedener Medien, Bebrütungstemperaturen und Inkubationszeiten (Abb. 2), so wird

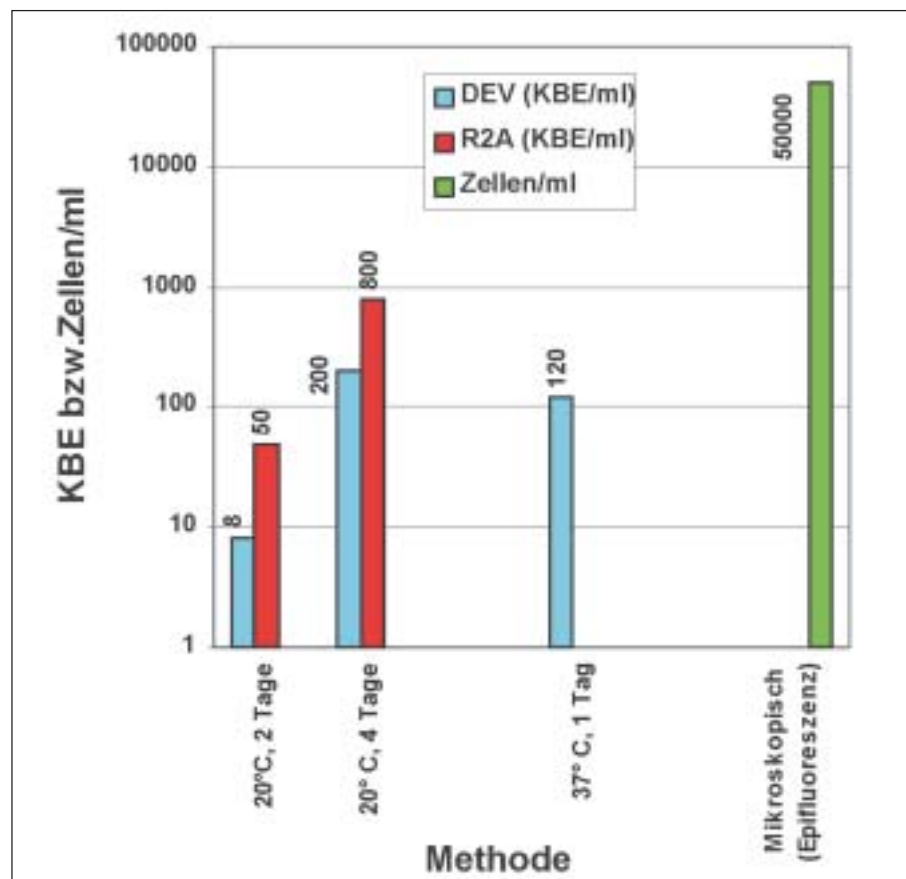


Abb. 2: Keimzahl von Dialyseflüssigkeiten (KBE/ml) bei Verwendung verschiedener Medien, Bebrütungstemperaturen und Inkubationszeiten (aus 3, verändert)

deutlich, wie unterschiedlich die Ergebnisse für ein und dieselbe Probe sein können, und in welchen Größenordnungen Kulturmethoden den wahren Keimgehalt unterschätzen ^(2, 3, 4).

Die Bestimmung des Endotoxingehalts

Endotoxine sind chemisch gesehen Lipopolysaccharide und Bausteine der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien. Beim Abbau der äußeren Bakterienmembran werden sie freigesetzt und können in die Dialyseflüssigkeiten gelangen. Sie sind potente Pyrogene, und können beim Menschen bereits in parenteral aufgenommenen Mengen von etwa 1 ng/kg Körpergewicht akute Fieberreaktionen erzeugen. Da unter den Mikroorganismen, die sich in einem (nicht entsprechend behandelten) Dialysesystem etablieren können, gramnegative Bakterien in der Regel dominieren (ca. 94 Prozent der kultivierbaren Mikroorganismen), können durchaus kritische Endotoxinkonzentrationen erreicht werden. Im Gegensatz zu Bakterienzellen können Endotoxine beziehungsweise Endotoxinbruchstücke Dialysatormembranen – je nach Membranmaterial – in geringen Anteilen passieren, ins Patientenblut gelangen und akute Fieberreaktionen beim Patienten hervorrufen, wenn ein bestimmter Schwellenwert überschritten wurde. Auf die Problematik einer chronischen Endotoxinbelastung mit geringeren, nicht fiebererzeugenden Konzentrationen im Rahmen der Hämodialyse wurde bereits in einem früheren Beitrag eingegangen ⁽⁵⁾.

Mit Hilfe des LAL-Tests (Limulus Amöbozyten Lysat-Test) können sehr geringe Endotoxinmengen in Dialyseflüssigkeiten nachgewiesen werden. Er reagiert mit Endotoxinen unterschiedlicher Bakterienarten in gleicher Ausprägung, hingegen erweisen sich Menschen und andere Warmblüter als unterschiedlich sensitiv gegenüber Endotoxinen verschiedener Herkunft ⁽⁶⁾.

Die untere Nachweisgrenze des derzeit empfindlichsten (chromogenen) LAL-Tests liegt theoretisch bei ungefähr 0,005 EU beziehungsweise IU/ml, wenn im Testgut keine, den Reaktionsablauf störenden Substanzen enthalten sind. Dies ist beispielsweise bei der Analyse von Permeat anzunehmen. 0,005 EU/ml entsprechen 0,5 pg/ml des Endotoxins von *E. coli* Typ 055:B5. Als Einheiten werden häufig verwendet: 1 IU = 1 EU = 100 pg Endotoxin EC 055:B5. Die Sensitivität des Tests nimmt jedoch bei Anwesenheit von Störfaktoren (Hemmstoffe, extreme pH-Werte) teilweise vehement ab. Um die Hemmung

der Nachweisreaktion auszuschalten, kann eine Verdünnung der Testlösung, was wiederum auch eine Verdünnung der Endotoxinkonzentration zur Folge hat, Hilfe bringen ⁽⁷⁾. Aus diesem Grund liegt die untere Nachweisgrenze von Endotoxin im Bicarbonat-Konzentrat selbst bei Anwendung des chromogenen LAL-Tests lediglich um etwa 0,25 EU/ml.

Werden die vom Arbeitskreis für angewandte Hygiene in der Dialyse ⁽¹⁾ für Permeat und Dialyseflüssigkeit als oberer Grenzwert empfohlenen Endotoxinkonzentrationen von jeweils <0,25 EU/ml (= <0,025 ng Endotoxin/ml) nicht überschritten, ist davon auszugehen, dass akute Fieberreaktionen verhindert werden. Chronische Belastungen mit geringen Endotoxinmengen und die daraus resultierenden langfristig zu erwartenden Gesundheitsbeeinträchtigungen der Dialysepatienten infolge einer permanent induzierten Bildung von Entzündungsmediatoren können aber möglicherweise dennoch nicht ausgeschlossen werden ^(8, 9).

Die Bestimmung des Gesamtpyrogengehalts

Bisher war nur von Endotoxinen als den einzigen pyrogen wirkenden Verunreinigungen in Dialyseflüssigkeiten die Rede. Tatsächlich sind darin aber auch noch andere, vergleichbar wirkende Substanzen zu vermuten, die mit dem LAL-Test nicht erfasst werden können. Es sind Verunreinigungen, welche aus den verwendeten Materialien (Leitungs- und Dichtungsmaterial, Produktionsrückstände) herrühren, oder als Stoffwechselprodukte beziehungsweise Zersetzungsprodukte auch von grampositiven Bakterien und von Pilzen freigesetzt werden ^(6, 9, 10, 11). Je nach Molekulargewicht können viele dieser, zum Teil noch nicht näher definierten Verbindungen eine Dialysatormembran relativ einfach passieren.

Der bisherige »Goldstandard«, die fiebererzeugende Wirkung einer Mischung chemisch unterschiedlicher Pyrogene in einer Probe annähernd zu bestimmen, ist seit etwa 60 Jahren der Kaninchen-Pyrogen-Test. Hierbei wird einem Kaninchen eine Testlösung (10 ml/ kg Körpergewicht) injiziert und die vor und nach der Injektion rektal gemessene Temperatur verglichen. Ein Anstieg der Körpertemperatur deutet darauf hin, dass die Lösung mit Pyrogenen kontaminiert war. Es ist jedoch nicht möglich, etwas über deren chemische Natur auszusagen. Außerdem ist die Sensitivität verschiedener Kaninchenrassen beziehungsweise -stämme unterschiedlich. Kaninchen wiederum reagieren nicht unbedingt so auf diverse pyrogene Substanzen, wie es ein Mensch täte.

Die Fieberschwelle beim Kaninchen liegt bei etwa 50 bis 350 pg/ml *E. coli*-Endotoxin (0,5-3,5 IU/ml), diejenige des Menschen zwischen 20 und 50 pg/ml (0,2-0,5 IU/ml) ⁽⁶⁾. Mit Hilfe des Kaninchen-Pyrogen-Tests können geringere Endotoxinmengen, im Gegensatz zum LAL-Test, nicht nachgewiesen werden, da eine Fieberreaktion ausbleibt. Auch andere Pyrogene werden entsprechend erst dann erfasst, wenn nach Überschreiten eines Schwellenwertes eine Temperaturerhöhung induziert wurde.

Der Kaninchen-Pyrogen-Test hat nach vorliegenden Informationen wohl wegen der wesentlich einfacheren sowie kostengünstiger durchzuführenden LAL-Tests nie eine besondere Rolle bei der Qualitätsbeurteilung von Dialyseflüssigkeiten gespielt.

Die Messung von Zytokinen

Als eine Konsequenz der Entdeckung des Interleukin-1 im Jahre 1980 durch *Charles Dinarello* und Mitarbeiter, wurde 1982 eine Methode vorgeschlagen, Pyrogene auf Basis von Leukozyten zu testen. Mittlerweile sind eine Reihe von Versuchen durchgeführt worden, für verschiedenen Fragestellungen Testsysteme mit aufgereinigten Blutzellen zu entwickeln. Diese Testsysteme haben aber bisher nicht den allgemeinen Durchbruch erfahren, den man sich erhofft hatte, da sie sehr arbeitsintensiv und kaum standardisierbar sind. Man macht sich hierbei die Tatsache zunutze, dass Monozyten durch Pyrogene dazu angeregt werden, Entzündungsmediatoren (z.B. die Zytokine IL-1, IL-6, TNF- α) auszuschütten. Diese können mittels ELISA gemessen werden ^(6, 10).

Seit 1995 hat man sich verstärkt mit Methoden auseinandergesetzt, bei denen humanes Spender-Vollblut anstatt aufgereinigter Zellen verwendet wird. Hierbei wird Vollblut mit der zu testenden Lösung versetzt und die erfolgte Zytokinbildung als Reaktion auf anwesende Pyrogene in der Testlösung ermittelt. Zur Qualitätskontrolle von Dialyseflüssigkeiten wurden bereits Versuche durchgeführt. Mittlerweile ist auch schon ein Test-Kit für bestimmte Anwendungsbereiche auf dem Markt ^(6, 11).

Der Vorteil solcher Vollbluttests besteht darin, dass keine aufwändigen Aufreinigungs- und Zellkulturverfahren erforderlich sind, dennoch aber die humanspezifische Pyrogenwirkung aller in einer Lösung enthaltenen Substanzen ermittelt werden könnte. Die Zukunft wird erweisen, ob – und wenn ja – für welche Anwendungsgebiete und mit welcher Sensitivität sich der Vollbluttest als Routinemethode etablieren kann.

Abschließende Bemerkungen

Die empfohlenen Methoden der mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Dialyseflüssigkeiten haben sich in der Praxis als Instrumente bewährt, eine Belastung von Dialyseflüssigkeiten durch bestimmte Mikroorganismen und durch Endotoxine zu erkennen. Allerdings sollten die Unzulänglichkeiten dieser Methoden immer berücksichtigt werden, wenn es darum geht, unerklärliche Fieberreaktionen oder die mikrobiologische Qualität der Behandlungsflüssigkeiten hinsichtlich längerfristiger Auswirkungen auf den Patienten zu beurteilen.

Bei einer Beprobung wird aus betriebswirtschaftlichen Gründen oftmals nur eine geringe Anzahl von Flüssigkeitsproben aus den Teilsystemen (Permeat- und Bicarbonatversorgung, einzelne Dialysegeräte) entnommen und ausgewertet. Mit den üblichen Untersuchungsmethoden, der Koloniezahlbestimmung und des LAL-Tests, wird die wahre mikrobiologische Belastung einer Testlösung in der Regel unterschätzt. All dies führt zu einer lückenhaften Entscheidungsgrundlage bei der Risikobeurteilung. Neue, aussagekräftigere Testverfahren befinden sich in der Entwicklung, stehen aber für die Anwendung in der Dialyse offenbar noch nicht als Routinemethoden zur Verfügung.

Es bleibt darum nur, einen Weg zu verfolgen, die Möglichkeiten gängiger Analyseverfahren so gut als möglich auszuschöpfen. Dies bedeutet, die Beprobungsweise so zu optimieren, dass bei einer Probennahme möglichst viele Beprobungsstellen in den unterschiedlichen Teilsystemen berücksichtigt werden. Dialyseflüssigkeiten sollten in möglichst kurzen Zeitabständen überprüft werden. Dies empfiehlt sich insbesondere während der zunehmend mit extremen Temperaturen aufwartenden Sommermonaten, die eine überdurchschnittliche Erwärmung der Zentralversorgungsanlagen (Permeat, evtl. Bicarbonat-Konzentrat) und eine deswegen verstärkte Vermehrung von Mikroorganismen in den Versorgungsleitungen erwarten lassen.

Neben der Koloniezahl in einer Probe sollte regulär, nicht nur ausnahmsweise, die Endotoxinkonzentration bestimmt werden.

Die beste Strategie aber ist es, mikrobiologische Verunreinigungen nicht nur zu messen, sondern sie im Vorfeld zu verhindern. Darum sollten Aufbereitungs- und Versorgungssysteme für Dialyseflüssigkeiten so ausgelegt sein, dass möglichst ohne übermäßigen Mehraufwand an Kosten und Zeit Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen vorbeugend, und nicht nur reaktiv, in kurzen Intervallen und gefahrlos für die Patienten, durchgeführt werden können.

Literatur

- (1) *Arbeitskreis für angewandte Hygiene in der Dialyse* (Hrsg.): Leitlinie für die Praxis der angewandten Hygiene in Behandlungseinheiten für Dialyse. Pabst Science Publishers, Lengerich – Berlin – Düsseldorf – Leipzig – Riga – Scottsdale (USA) – Wien – Zagreb 1998
- (2) Nystrand, R.: Microbiological testing of dialysis water system. 8. Int. Dialysefachtagung in Erfurt, 7.-8. Mai 1999.
- (3) Flemming, H.C.: Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen. Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft. Band 129. Kommissionsverlag R. Oldenbourg, München 1994.
- (4) Nystrand, R.: Standards and standardisation of detection methods for bacteria and endotoxin in water and dialysis fluid. Nieren- und Hochdruckkrankheiten 28 (1999), 43-48.
- (5) Goppelsröder, A.: Mikrobiologische Anforderungen an Reinstwasser und andere Dialyseflüssigkeiten. Dialyse aktuell 1 (2000), 18-21.
- (6) Bonenberger, J.; Diekmann, W.; Fennrich, S.; Fischer, M.; Friedrich, A.; Hansper, M.; Hartung, T.; Jahnke, M.; Löwer, J.; Montag, T.; Petri, E.; Sonntag, H.-G.; Weigand, M.; Wendel, A.; Zucker, B.: Pyrogentestung mit Vollblut. Zusammenfassung eines Status-Workshops am Paul-Ehrlich-Institut, Langen, am 22.11.1999. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz 7 (2000), 525-533.
- (7) Scheer, R.: Der Limulustest. Theorie und Praxis der Prüfung auf Pyrogene und Endotoxine. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1989.
- (8) Lonnemann, G.: Klinische Relevanz der hämodialyseassoziierten Zytokininduktion. Nieren- und Hochdruckkrankheiten 28 (1999), 49-55.
- (9) Lonnemann, G.; Krautzig, S.; Koch, K.M.: Quality of water and dialysate in haemodialysis. Nephrol Dial Transplant 11 (1996), 946-949.
- (10) Bonnie-Schorn, E.; Grassmann, A.; Uhlenbusch-Körwer, I.; Weber, C.; Vienken, J.: Water quality in hemodialysis. Good dialysis practice. Fresenius Medical Care, Oberursel 1998.
- (11) Hartung, T.; Aaberge, I.; Berthold, S.; Carlin, G.; Charton, E.; Coecke, S.; Fenrich, S.; Fischer, M.; Gommer, M.; Halder, M.; Haslov, K.; Jahnke, M.; Montag-Lessing, T.; Poole, S.; Schechtmann, L.; Wendel, A.; Werner-Felmayer, G.: Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. Altweb-ECVAM Reports, <http://altweb.jhsph.edu/publications/ECVAM/ecvam43.htm>

Autor:

Dr. rer. nat. A. Goppelsröder

Walzbachtal