

Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung mit dem EUCAST-Blättchendiffusionstest

+++

CHECKLISTE für die Umstellungsphase

+++

Vor der Einführung von EUCAST Testmethoden (AST) und Grenzwerten im Labor ist folgendes zu beachten:

1. Kontaktaufnahme mit dem nationalen Komitee für die antimikrobielle Empfindlichkeitstestung (NAC).
2. Identifikation aller bestehenden AST Methoden (Blättchendiffusion, automatisierte Testungen, Gradiententests, ect.). Abklärung, ob alle Methoden für die Umstellung bereit sind.
3. Identifikation von bezüglich der Umstellung betroffenen Unterstützungs-Tools und Werkzeugen (Dokumente und Handbücher, EDV – Laborinformationssystem, Meldesysteme ect.).
4. Festlegen der Verantwortlichkeiten (z.B. Bestimmen eines „Antibiotika - Champion“ unter den MitarbeiterInnen), der/die während der gesamten Einführungsphase den Prozess begleitet.
5. Kontaktaufnahme mit einem Labor, das bereits auf EUCAST Methodik und Grenzwerte umgestellt hat. Bei Bedarf Austausch von MitarbeiterInnen erwägen.
6. Alle Interessensgruppen identifizieren und informieren (Laborpersonal, Kunden, Resistenzüberwachungsprogramme, QC-Programme, Hersteller ect.).
7. Versichern, dass alle Materialien für die Umstellung verfügbar und rechtzeitig lieferbar sind. Der folgende EUCAST-link enthält aktuelle Informationen dazu [preparedness of manufacturers of AST materials](#).
8. Ein Schulungsprogramm 3-6 Monate vor der geplanten Umstellung aufsetzen. Bei Bedarf EUCAST kontaktieren (www.eucast.org).

Automatisierte Systeme zur Empfindlichkeitstestung & Umstellung auf EUCAST

1. Kontaktaufnahme mit dem NAC in bezug auf nationale Angelegenheiten.
2. Versichern, dass das System EUCAST Grenzwerte für alle benötigten Antibiotika unterstützt. Den Hersteller auffordern, Diskrepanzen zwischen dem System und EUCAST Empfehlungen aufzuzeigen. Diskrepanzen können zu unterschiedlichen Zeitpunkten, Software-Versionen und Ländern verschiedener Art sein.
3. Für Antibiotika, welche in den EUCAST-Tabellen mit "IE" oder einem Bindestrich ("-") ausgewiesen sind wurden keine Grenzwerte festgelegt. *Wenn ein Labor nach EUCAST Empfehlungen arbeitet wird nicht empfohlen Grenzwerte anderer Institutionen für die entsprechenden Substanzen zu verwenden.*

Blättchendiffusionstest & Umstellung auf EUCAST

Der Blättchendiffusionstest nach EUCAST basiert auf einem konfluenten Inokulum (McFarland 0.5) auf Müller-Hinton Agar mit und ohne 5% Pferdeblut und 20 mg/L β -NAD. Es ist wichtig die Methodenbeschreibung genau zu befolgen (www.eucast.org).

Beachte:

- **Inokulum = McFarland Standard 0.5**, vorzugsweise mittels Densidometer eingemessen.
Ausnahme: *Streptococcus pneumoniae*
McFarland 0.5 von einer Blutplatte, ABER
McFarland 1.0 von einer Kochblutplatte
- **Gleichmässig über den Nährboden verteiltes, konfluentes Wachstum**
Korrektes Inokulum und ebenmässig ausgestrichene Nährböden resultieren in einem konfluenten Wachstumsrasen mit runden, glatten, deutlich abgrenzbaren Hemmhofrändern. Um ein zu dichtes Inokulum v.a. bei Gramnegativen Bakterien zu verhindern, speziell darauf achten, dass überschüssige Flüssigkeit vom Tupfer durch vorsichtiges Ausdrücken am Röhrchenrand entfernt wird, bevor die Nährböden inokuliert werden.
- **Die 15-15-15 Minuten Regel;** um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen:
 - Inokulum binnen 15 Minuten verwenden
 - Antibiotika-Plättchen binnen 15 Minuten aufbringen
 - die beimpften Nährböden binnen 15 Minuten inkubierenMöglicherweise sind kleine Änderungen etablierter Prozesse erforderlich um diese Regel einhalten zu können.

- **Auf korrekte Blättchenbeladungen achten!**
Die entsprechenden Blättchenbeladungen sind den EUCAST-Tabellen „Klinische Grenzwerte“ und „Qualitätskontrolle“ zu entnehmen.
- **Die Inkubationszeit von 16-20h einhalten, weder abkürzen noch verlängern!**
- **Die Anleitung zum Ablesen der Platten einhalten**
Bei Auflicht und wie mit freiem Auge erkennbar die Hemmhofränder dort ablesen, wo das Wachstum komplett gehemmt wird. Dabei Müller-Hinton ohne Supplement von der Rückseite gegen einen dunklen Hintergrund und Müller-Hinton mit Supplement von vorne mit abgenommenem Deckel ablesen.

Vorschläge zur Implementierung des EUCAST Blättchendiffusionstests im Labor: Eine Praxis-Anleitung für den Champion

- Die Labormannschaft mit speziellem Fokus auf das Streichen der Platten und Ablesen der Hemmhöfe trainieren. Eine Diashow steht unter www.eucast.org zur Verfügung.
- Das Training damit beginnen, dass alle MitarbeiterInnen dieselben (vom Champion vorbereiteten) Platten ablesen. Das Ziel dieser Übung ist es das Ablesen der Hemmhöfe im Labor zu harmonisieren. Neue Befunder sollten vor Aufnahme der Routine-bakteriologischen Arbeiten ebenfalls dieser Prozedur unterzogen werden. Eine Diashow zum Thema “Ablesen der Platten” steht unter www.eucast.org zur Verfügung.
- Mit dem Ablesen von zwei Kontrollstämmen auf Müller-Hinton Agar ohne Supplement, z.B. *E. coli* ATCC 25922 und *S. aureus* ATCC 29213 und jeweils 4 routinemässig auszutestenden Antibiotika für die beiden Spezies beginnen. Die Übung an 3 aufeinanderfolgenden Tagen wiederholen und dann die Ergebnisse zwischen Ableser und Tagen vergleichen. Die Mittelwerte sollten wenig variieren und jedenfalls innerhalb der Qualitätskontrollgrenzen liegen. Tabellen zur Qualitäts - Kontrolle sind unter www.eucast.org verfügbar.
- Die Ergebnisse bei Laborbesprechungen diskutieren. Die Übung solange wiederholen bis alle zum gleichen Ergebnis kommen.
- Die Übung mit *P. aeruginosa* ATCC 27853 und *E. faecalis* ATCC 29212 wiederholen.
- Die Übung mit MH-F (Müller-Hinton Agar mit 5% Pferdeblut und 20 mg/L β -NAD) mit *H. influenzae* NCTC 8468 und *S. pneumoniae* ATCC 49619 wiederholen.
- Die Übung mit einigen klinischen Isolaten, z.B. mit Streptokokken der Serogruppen A, B, C und G wiederholen.

- Im nächsten Schritt die Herstellung des Inokulums und das Beimpfen der Platten üben. Das Ziel dieser Übung ist es standardierte, gleichmässig beimpfte, konfluente Wachstumsrasen zu erzeugen. Die besten Ergebnisse lassen sich mit einem Nephelometer/Spektrophotometer bei der Herstellung des Inokulums erzielen. Welche Technik auch immer zum Beimpfen der Platten verwendet wird (Tupfer mit Plattenrotator oder manuelles Ausstreichen in drei Richtungen) versichern, dass glattrandige, nicht ausgefranste Hemmhofränder entstehen. In der Übungsphase Testsubstanzen verwenden, mit denen besonders scharfe Hemmhöfe erzielt werden können.

Die Übung mit allen empfohlenen Kontrollstämmen durchführen und wieder die Ergebnisse zwischen Personen und Tagen vergleichen. Die Mittelwerte sollten wenig variieren und jedenfalls innerhalb der Qualitätskontrollgrenzen liegen. Tabellen zur Qualitäts - Kontrolle sind unter www.eucast.org verfügbar.

- Vor der Einführung des EUCAST-Blättchendiffusionstests in die Routine Qualitätskontrollstämmen täglich mitführen (mit allen für die Routineantibiogramme erforderlichen Antibiotika) – solange, bis alle EUCAST Spezifikationen zutreffen und der Prozess innerhalb des Labors harmonisiert ist.

**Haben Sie Fragen zum EUCAST- Blättchendiffusionstest?
Benötigen Sie Unterstützung bei der Einführung der Methodik?**

Bitte kontaktieren Sie erika.matuschek@ltkronoberg.se

oder das EUCAST Sekretariat