



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

EUCAST Plättchendiffusionstest zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung

Version 1.0, 18. Dezember 2009

Original:

Antimicrobial susceptibility testing

EUCAST disk diffusion method

Version 1.0, December 18, 2009

Released in German 1 March 2010

Translated by Petra Apfalter, Linz, Österreich

Inhalt		Seite
	Abkürzungen und Terminologie	
1	Einführung	4
2	Zubereitung der Medien	5
3	Zubereitung des Inokulums	6
4	Beimpfen der Agarplatten	8
5	Aufbringen der Antibiotikaplättchen	9
6	Inkubation der Platten	10
7	Ablesen der Platten nach Inkubation	11
8	Messung der Hemmhöfe und Interpretation der Empfindlichkeiten	12
9	Qualitätskontrolle	13

Änderungen des Dokuments

Version	Änderung	Datum
1.0	1. Ausgabe	18.12.2009

Abkürzungen und Begriffe

ATCC	Amerikanische Kulturen-Stammsammlung http://www.atcc.org
BLNAR	β -Lactamase negativ, Ampicillin resistent
CCUG	Stammsammlung der Universität von Göteborg http://www.ccug.se
CIP	Stammsammlung des Louis-Pasteur-Instituts http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen http://www.dsmz.de/index.htm
ESBL	β -Lactamase mit erweitertem Spektrum
EUCAST	Europ. Kommission für Empfindlichkeitsprüfungen von Mikroorganismen http://www.eucast.org
MH	Mueller-Hinton-Agar
MH-F	Mueller-Hinton-Agar für anspruchsvolle Mikroorganismen (MH angereichert mit 5% defibriniertem Pferdeblut und 20 mg/L β -NAD)
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> (mecA-Gen positiv)
NCTC	Nationale Stammsammlung von Kulturen http://www.hpacultures.org.uk
β -NAD	β -Nicotinamid Adenin Dinucleotid
Saline	0,85 % Kochsalzlösung

1**Einleitung**

Der Plättchendiffusionstest ist eine der ältesten Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von Mikroorganismen und bleibt im klinischen Routinelabor die am häufigsten angewandte Technik. Die Methode ist für die Prüfung der meisten bakteriellen Erreger geeignet, einschliesslich der häufigeren anspruchsvollen Bakterien. Die Technik ist für viele antimikrobielle Wirkstoffen einsetzbar und erfordert keine spezielle Ausrüstung.

Wie auch andere Plättchendiffusions-Techniken ist die EUCAST-Methode ein standardisiertes Verfahren, das auf den Grundsätzen des Berichtes einer internationalen Arbeitsgruppe zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung, 1972, und auf der weltweiten Erfahrung von Experten basiert.

Die Hemmhof-Breakpoints der EUCAST-Methode basieren auf den harmonisierten europäischen Breakpoints, die von EUCAST veröffentlicht wurden und auf der EUCAST-Website (<http://www.eucast.org>) frei verfügbar abrufbar sind.

Um verlässliche Ergebnisse zu erzielen muss die beschriebene Methodik ohne Abänderung befolgt werden.

2	Zubereitung der Medien
2.1	Bereiten Sie MH-Agar nach den Anweisungen des Herstellers (mit der Ergänzung für anspruchsvolle Organismen) wie in Tabelle 1 zu.
2.2	Das Medium sollte eine Schichtdicke von 4 mm +/- 0,5 mm betragen (25 ml in einer 90 mm-Petrischale, 70 ml in einer 150 mm-Petrischale).
2.3	Die Oberfläche des Agars sollte vor der Verwendung trocken sein, dabei die Nährböden jedoch nicht austrocknen.
2.4	Selbst zubereitete Platten bei 8 - 10 °C lagern. Wenn Platten länger als 7 Tage gelagert werden ist es ratsam, diese in verschlossenen Plastiktüten bei 4 – 8 °C gekühlt zu halten.
2.5	Für selbst zubereitete Platten gilt, die Zubereitung, Trocknung, Lagerung sowie Haltbarkeit im Rahmen eines Qualitätssicherungsprogrammes zu dokumentieren und zu kontrollieren.
2.6	Kommerziell hergestellte Platten sollen - wie vom Hersteller empfohlen - gelagert und bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Tab. 1	Medien für Empfindlichkeitsprüfungen v. Mikroorganismen	
Spezies	Medium	
Enterobacteriaceae	MH Agar	
<i>Pseudomonas</i> spp.	MH Agar	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MH Agar	
<i>Acinetobacter</i> spp.	MH Agar	
<i>Staphylococcus</i> spp.	MH Agar	
<i>Enterococcus</i> spp.	MH Agar	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MH Agar + 5 % defibriniertes Pferdeblut + 20 mg/L NAD (MH-F)	
<i>Streptococcus</i> der Gruppen A, B, C und G	MH Agar + 5 % defibriniertes Pferdeblut + 20 mg/L NAD (MH-F)	
Andere Streptokokken	MH Agar + 5 % defibriniertes Pferdeblut + 20 mg/L NAD (MH-F)	
<i>Haemophilus</i> spp.	MH Agar + 5 % defibriniertes Pferdeblut + 20 mg/L NAD (MH-F)	
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MH Agar + 5 % defibriniertes Pferdeblut + 20 mg/L NAD (MH-F)	
Weitere anspruchsvolle Organismen	ausständig	

3	Zubereitung des Inokulums
3.1	<p>Mittels der direkten Kolonie-Suspensions-Methode Einstellen einer Suspension des Mikroorganismus in Kochsalzlösung mit einer Trübung McFarland 0,5 (entspricht etwa $1 - 2 \times 10^8$ KBE/ml für <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922).</p> <p>Diese Technik ist für alle Mikroorganismen geeignet, einschließlich der anspruchsvollen Erreger wie <i>Haemophilus</i> spp., <i>Moraxella catarrhalis</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, β-hämolyisierende und andere Streptokokken.</p>
3.1.1	<p>Die Suspension sollte mit einem sterilen Tupfer oder einem Wattestäbchen vom nicht selektiven Medium einer über-Nacht Kultur in Kochsalzlösung hergestellt werden. Verwenden von einer bis zu mehreren morphologisch ähnlichen Kolonien verhindert die Selektion einer atypischen Variante.</p>
3.2	<p>Adjustieren der Suspension einem Trübungsstandard McFarland 0,5 entsprechend. Ein zu dichtes Inokulum resultiert in zu kleinen Hemmhöfen, ein zu geringes Inokulum bewirkt das Gegenteil.</p>
3.2.1	<p>Um die Dichte der Suspension auf McFarland 0,5 optimal einzustellen werden Photometer empfohlen. Das photometrische Gerät muss im Hinblick auf den McFarland-Standard entsprechend der Bedienungsanleitung des Herstellers kalibriert werden.</p>
3.2.2	<p>Alternativ kann die Dichte der Suspension optisch mit einer Trübung von 0,5 nach McFarland Standard (Tabelle 2) verglichen werden. Vor Verwendung Vortexen des Trübungsstandards. Vergleichen Sie die Testsuspension mit dem Standard vor weißem Hintergrund mit schwarzen Linien.</p>
3.2.3	<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> vorzugsweise von einer Blut-Agar-Platte abnehmen und auf McFarland 0,5 einstellen. Wenn <i>Streptococcus pneumoniae</i> von einer Schokoladen-Agar-Platte abgenommen wird, muss eine Trübung entsprechend McFarland 1.0 hergestellt werden.</p>
3.2.4	<p>Durch Hinzufügen von Kochsalzlösung oder Mikroorganismen Anpassen der Dichte an die einer McFarland 0,5 Suspension.</p>
3.3	<p>Die Suspension sollte optimal innerhalb von 15 Minuten, jedoch jedenfalls binnen 60 Minuten nach Zubereitung weiterverarbeitet werden.</p>

Tab. 2	Zubereitung eines McFarland 0.5 Trübungs-Standards
1	Fügen Sie 0,5 ml von 0,048 mol/L BaCl ₂ (1,175 % w/v BaCl ₂ ·2H ₂ O) zu 99,5 ml von 0,18 mol/L (0,36 N) H ₂ SO ₄ (1 % v/v) hinzu und mischen Sie gründlich.
2	Prüfen Sie die Dichte der Suspension in einem Spektralphotometer mit 1 cm Lichtweg und abgestimmten Küvetten. Die Absorption bei 625 nm sollte im Bereich zwischen 0,08 und 0,13 liegen.
3	Verteilen Sie die Suspension in Röhrchen von gleicher Größe, wie Sie sie für die Prüfung zur Inokulum-Einstellung benutzen. Verschließen Sie die Röhrchen.
4	Lagern Sie die Chargen im Dunkeln bei Raumtemperatur.
5	Mischen Sie die Charge mit einem Vortex unmittelbar vor dem Gebrauch gut durch.
6	Frischen Sie die Chargen nach einer Lagerung von 6 Monaten auf oder prüfen Sie deren Absorption.
7	Chargen, welche von kommerziellen Anbietern vorbereitet u. erworben werden, sollten überprüft werden um sicherzustellen, dass die Absorption innerhalb des akzeptablen Bereiches liegt.

4	Beimpfen der Agarplatten
4.1	Das adjustierte Inokulum soll im Idealfall innerhalb von 15 Minuten nach der Zubereitung weiterverarbeitet werden.
4.2	<p>Tauchen Sie ein steriles Wattestäbchen in die Suspension und entfernen Sie die überschüssige Flüssigkeit durch Drehen des Tupfers an der Innenseite des Behälters.</p> <p>Überschüssige Flüssigkeit aus dem Wattestäbchen entfernen, um ein „Überbeimpfen“ der Platten zu vermeiden; dies gilt insbesondere für gramnegative Keime.</p>
4.3	<p>Das Inokulum gleichmässig über die gesamte Agaroberfläche aufbringen.</p> <p>Z. B. durch „Dritteln“ der Platte mit nachfolgendem Ausstreichen oder durch Verwendung eines Plattenrotators.</p>
4.4	<p>Aufbringen der Antibiotikaplättchen innerhalb von 15 Minuten.</p> <p>Wenn beimpfte Platten für längere Zeit bei Raumtemperatur stehen bevor sie weiterverarbeitet werden, kann es passieren, dass die Keime zu wachsen beginnen, was fälschlich zu geringeren Hemmhöfen führen kann.</p> <p>Die Platten sollten daher innerhalb von 15 Minuten nach Beimpfung der Agar-Oberfläche weiterbearbeitet werden.</p>

5	Aufbringen der Antibiotikaplättchen
5.1	Die erforderlichen Beladungen der Antibiotikaplättchen sind in den Breakpoint- und Qualitätskontrolltabellen unter http://www.eucast.org aufgelistet.
5.2	Die Testplättchen müssen auf die beimpften und trockenen Agaroberflächen fest aufgebracht werden. Der Kontakt der Plättchen mit der Agaroberfläche muß dicht und gleichmäßig sein. Nachdem die Antibiotikaplättchen auf der Platte aufgebracht wurden dürfen diese nicht mehr bewegt werden, da sie sehr schnell mit dem Nährboden reagieren.
5.3	Die Anzahl der Plättchen pro Platte sollte so begrenzt sein, sodass ein unerwünschtes Ineinandergreifen einzelner Hemmhöfen vermieden wird. Die maximale Anzahl der Plättchen hängt vom jeweiligen Mikroorganismus und den getesteten Antibiotika ab, da einige Substanzen bei empfindlichen Isolaten grössere Hemmhöfe ausbilden. Auf 90 mm-Platten nicht mehr als 6 Plättchen, auf 150 mm-Platten nicht mehr als 12 Plättchen aufbringen.
5.4	Der Wirksamkeitsverlust von Antibiotikaplättchen stellt eine häufige Fehlerquelle dar und resultiert in zu geringen Hemmhofdurchmessern. Nachstehendes ist zu beachten:
5.4.1	Lagern von Antibiotikaplättchen, einschließlich jenen aus Spendern, in verschlossenen Behältnissen, versehen mit einem Trockenmittel u. unter Lichtschutz (da einige Mittel, insbesondere Metronidazol, Chloramphenicol u. Chinolone bei längerfristiger Einwirkung von Licht inaktiviert werden).
5.4.2	Lagern von Beständen bei – 20 °C, sofern vom Lieferanten nichts anderes vorgeschrieben wurde. Ist dies nicht möglich, bei < 8 °C lagern.
5.4.3	Lagern Sie Arbeitsvorräte an Plättchen bei < 8 °C.
5.4.4	Um die Bildung von Kondenswasser zu vermeiden, sollten die Plättchen vor dem Öffnen der Verpackungen auf Raumtemperatur gebracht werden.
5.4.5	Entsorgen Sie Plättchen nach Ablauf des vom Hersteller ausgewiesenen Verfalldatums.

6	Bebrüten der Platten
6.1	Inkubieren der Platten (Deckel unten) innerhalb von 15 Minuten nach Aufbringen der Antibiotikaplättchen. Werden die Platten bei Raumtemperatur belassen, können fälschlich zu große Hemmhöfe resultieren.
6.2	Aufeinandergestapelte Platten im Brutschrank können durch ungleichmäßige Erwärmung der Platten die Ergebnisse beeinflussen. Die Effizienz von Brutschränken schwankt, daher sollte die Kontrolle der Inkubationszeit einschließlich der angemessenen Anzahl von Platten in Stapeln im Rahmen des Qualitätssicherungsprogrammes überprüft werden.
6.3	Inkubieren der Platten wie in Tab. 3 dargestellt.
6.4	Um eine sichere Empfindlichkeit nachzuweisen braucht die Kombination <i>Enterococcus</i> spp./Glykopeptide eine Inkubationszeit von 24 Stunden. Allerdings können Platten nach 16 bis 20 Stunden bereits geprüft werden. Platten von empfindlichen Isolaten müssen weiter inkubiert und nach 24 Stunden erneut abgelesen werden.

Tab. 3	Bebrütungsbedingungen für Antibiogramme	
Organismus	Bebrütungsbedingungen	
Enterobacteriaceae	35 ± 1 °C, aerob, 16 – 20 Stunden	
<i>Pseudomonas</i> spp.	35 ± 1 °C, aerob, 16 – 20 Stunden	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35 ± 1 °C, aerob, 16 – 20 Stunden	
<i>Acinetobacter</i> spp.	35 ± 1 °C, aerob, 16 – 20 Stunden	
<i>Staphylococcus</i> spp.	35 ± 1 °C, aerob, 16 – 20 Stunden	
<i>Enterococcus</i> spp.	35 ± 1 °C, aerob, 16 – 20 Stunden (35 ± 1 °C, aerob, 24 Std. für Glycopeptide)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35 ± 1 °C in 4 - 6% CO ₂ , 16-20 Std.	
<i>Streptococcus</i> der Gr. A, B, C und G	35 ± 1 °C in 4 - 6% CO ₂ , 16-20 Std.	
Andere Streptokokken	35 ± 1 °C in 4 - 6% CO ₂ , 16-20 Std.	
<i>Haemophilus</i> spp.	35 ± 1 °C in 4 - 6%CO ₂ , 16-20 Std.	
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35 ± 1 °C in 4 - 6%CO ₂ , 16-20 Std.	
Andere anspruchsvolle Keime	ausständig	

7	Ablesen der Nährböden nach dem Bebrüten
7.1	Ein korrektes Inokulum und korrekt beimpfte Platten sollten zu einem konfluenten Wachstumsrasen führen.
7.2	Das Wachstum sollte gleichmäßig über die Platte verteilt sein, mit glatt berandeten, runden Hemmhöfen ohne Fransen.
7.3	Sind Einzelkolonien sichtbar, war das Inokulum zu wenig dicht und der Test muss wiederholt werden.
7.4	Prüfen Sie, ob sich die Hemmhöfe innerhalb der Qualitätskontrolle-Grenzwerte befinden.

8	Abmessen der Hemmhöfe und Interpretation der Empfindlichkeiten
8.1	Für alle Substanzen mit dem bloßen Auge den Bereich kompletter Hemmung ablesen.
8.2	Auf den Millimeter genaues Messen der Hemmstoffdurchmesser mit einem Lineal, einer Schublehre oder einem automatisierten Lesegerät.
8.3	Nicht-supplementierten Platten von der Rückseite bei reflektierendem Licht vor einem dunklen Hintergrund ablesen.
8.4	Supplementierte Platten von vorne mit abgenommenem Deckel bei reflektierendem Licht ablesen.
8.5	Linezolid-Hemmhöfe bei Staphylokokken von der Rückseite - mit der Platte gegen das Licht gehalten - ablesen.
8.6	Bei der Verwendung von Cefoxitin für den Nachweis von Methicillin-Resistenz bei <i>Staphylococcus aureus</i> , die offensichtliche Hemmzone ablesen und bei guten Lichtverhältnissen sorgfältig auf Kolonien innerhalb des Hemmhofes achten. Dies kann entweder auf eine Kontamination mit einer anderen Spezies hinweisen oder auf eine heterogene Mutante mit Methicillin-Resistenz.
8.7	Feines Wachstum innerhalb der Hemmzone subkultivieren, identifizieren und das Antibiogramm - wenn nötig - wiederholen.
8.8	Schwärmphänomene bei <i>Proteus</i> spp. ignorieren.
8.9	Antagonisten im Medium können zu schwachem Wachstum innerhalb der Sulfonamide- oder Trimethoprim-Hemmhöfe führen. Ignorieren.
8.10	Bei hämolysierenden Streptokokken auf einem MH-F-Medium die Wachstumshemmung und nicht die Haemolysezone ablesen.
8.11	Interpretation der Hemmhöfe entsprechend den unter http://www.eucast.org gelisteten Breakpoints und interpretativen Kategorien.
8.12	Bei Verwendung von Hemmhof-Vorlagen die Platte einfach über die Schablone legen.

9**Qualitätskontrolle**

- 9.1 Zur Überwachung der Testmethodik die empfohlenen Kontrollstämme verwenden (Tabelle 4). Prinzipiell handelt es sich bei diesen um empfindliche Stämme. Resistente Stämme können ebenfalls verwendet werden, um zu bestätigen, dass Resistenzen/Resistenzmechanismen richtig erkannt werden (Tabelle 5). Kontrollstämme können von Stammsammlungen od. kommerziellen Quellen bezogen werden.
- 9.2 Lagern Sie Kontrollstämme unter Bedingungen, die die Lebensfähigkeit und die Eigenschaften des Organismus erhalten. Praktisch ist eine Lagerung unter Zuhilfenahme von Glasperlen, eingefroren bei - 70 °C in einer Glycerinsuspension oder einem kommerziellen Äquivalent. Nicht anspruchsvolle Organismen können bei - 20 °C gelagert werden. Nach Möglichkeit sollten immer 2 Fläschchen pro Kontrollstamm gelagert werden; eines für den kontinuierlichen Gebrauch und das andere zur Archivierung.
- 9.3 Subkultivieren Sie jede Woche eine Perle aus dem Gebrauchsdepot auf einem nicht selektiven Medium und überprüfen Sie dessen Reinheit. Aus dieser Reinkultur bereiten Sie dann täglich eine Subkultur. Für anspruchsvolle Organismen, die nicht für fünf bis sechs Tage auf den Platten überleben, subkultivieren Sie die Stämme täglich, aber nicht länger als eine Woche.
- 9.4 Akzeptable Grenzwerte für Kontrollstämmen sind in den [EUCAST Quality Control Tables](#) ersichtlich.
- 9.5 Verwenden Sie die empfohlenen Qualitätskontroll-Stämme für Ihre Routine-Testungen zur Dokumentation der Testmethodik. Tägliche Kontrollen sollten zumindest für Antibiotika, die Teil der Routine-Antibiogramme sind, durchgeführt werden. Überprüfen Sie jeden Tag, an dem Prüfungen vorgesehen sind, die Ergebnisse der letzten 20 aufeinanderfolgenden Tests. Achten Sie auf Trends und Hemmhöfe, die über oder unter den Mittelwert liegen. Wenn zwei oder mehr von 20 Tests außerhalb der Normen liegen, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Siehe EUCAST-Dokument „Qualitätssicherung von Tests auf die Empfindlichkeit von Mikroorganismen“ für Details.
- 9.6 Kontrollstämme sollten täglich solange getestet werden bis gezeigt werden kann, dass die Qualität zufrieden stellend ist (nicht mehr als 1 von 20 Tests darf außerhalb der Norm liegen); in diesem Stadium kann die Prüffrequenz auf einmal pro Woche verringert werden. Wenn die Qualitätsnormen nicht eingehalten werden, muss die Ursache ermittelt werden.
- 9.7 Zusätzlich sollte jede neue Charge von Mueller-Hinton-Agar getestet werden, um sicherzustellen, dass alle Parameter innerhalb der Norm liegen. Aminoglykosid-Plättchen können nicht akzeptable Schwankungen bei zweiwertigen Kationen im Medium aufweisen, Tigecyclin kann in Verbindung mit Magnesium, Trimethoprim-Sulfamethoxazol mit dem Thymingehalt der Platten problematisch sein. Erythromycin kann auf einen inakzeptablen pH-Wert hinweisen.

Tab. 4		Qualitätskontrollstämme für die Routine-Testung	
Spezies	Stamm	Charakteristika	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSMZ 1103 CCUG 17620	empfindlich, Wildtyp	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853 NCTC 12934 CIP 76110 DSMZ 1117 CCUG 17619	empfindlich, Wildtyp	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213 NCTC 12973 CIP 103429 DSMZ 2569 CCUG 15915	schwacher β -Lactamase Produzent	
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSMZ 2570 CCUG 9997	empfindlich, Wildtyp	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619 NCTC 12977 CCUG 66368	Low-level chromosomal kodierte Penicillinresistenz	
<i>Haemophilus influenzae</i>	NCTC 8468 CCUG 23946	empfindlich, Wildtyp	

Tab. 5 Weitere Qualitätskontrollstämme zur Erkennung spezifischer Resistenzmechanismen		
Spezies	Stamm	Charakteristika
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218 DSMZ 5564 CCUG 30600	TEM-1 β -Lactamase, Ampicillin resistent
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 12493	<i>mecA</i> -positiv, hetero-resistenter MRSA
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247 NCTC 12699 CCUG 26214	β -Lactamase negativ, Ampicillin resistent (BLNAR)