



**EUCAST**

EUROPEAN COMMITTEE  
ON ANTIMICROBIAL  
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

**EUCAST**  
**Plättchendiffusionstest zur**  
**antimikrobiellen**  
**Empfindlichkeitstestung**

Version 1.1

Juni 2010

# Inhalt

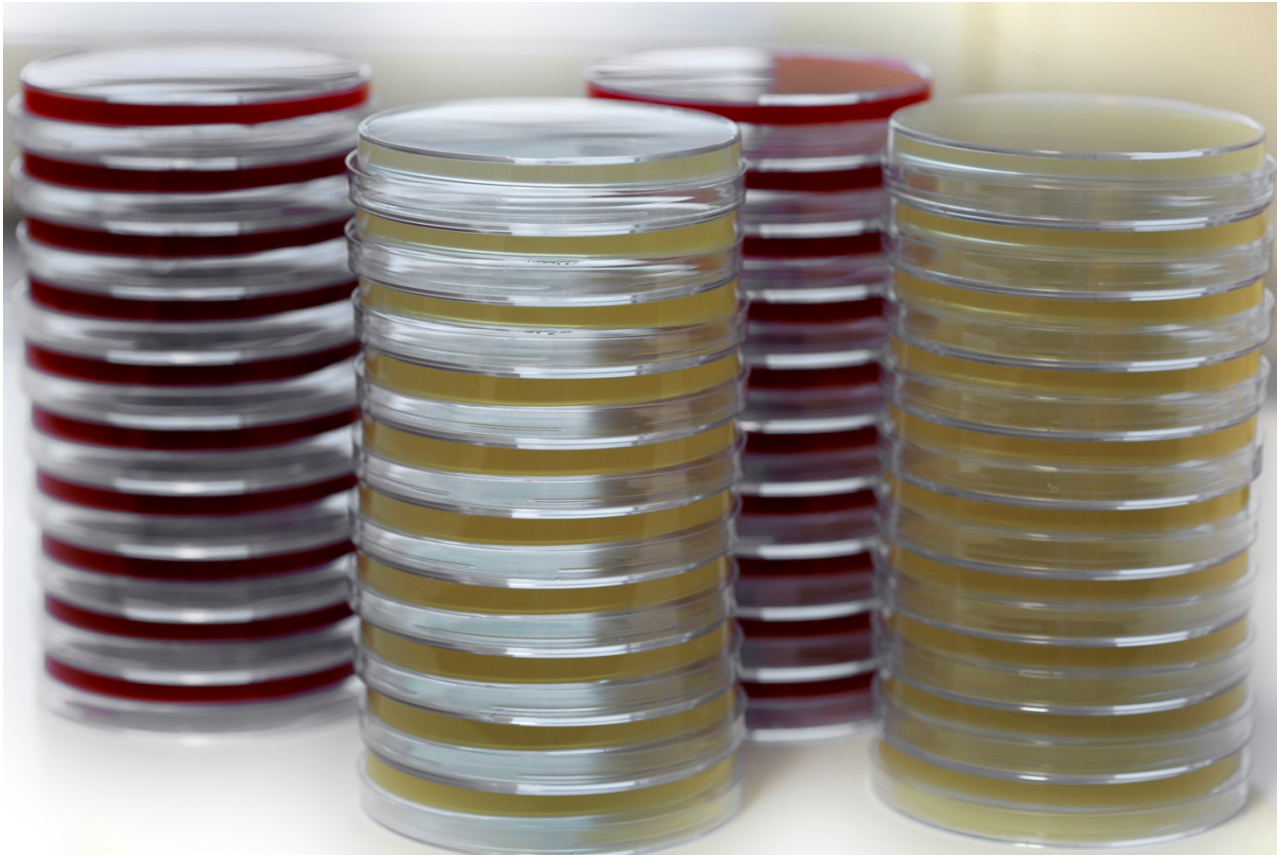
- Medien
- Herstellen des Inokulums
- Beimpfen der Medien
- Plättchen
- Inkubation
- Ablesen
- Interpretation
- Qualitätskontrolle
- Fehleranalyse

# EUCAST Blättchendiffusionstest Diashow

## - Änderungsbeschreibung -

- 2009-12-18: EUCAST Blättchendiffusionstest Diashow erstmalig online auf der EUCAST Homepage (v1.0)
- 2010-06-01: Klarstellung in bezug auf die Agarhöhe in den Petrischalen auf Dia 7, Stammsammlungsnummern der Spanish Culture Collection eingefügt auf Dias 29 und 30 (v. 1.1)

# Testmedien



# Testmedien

- Ausschliesslich **Mueller-Hinton Agar (MH)** verwenden
- Das Medium für anspruchsvolle Organismen (**MH-F, Mueller-Hinton Fastidious**) besteht aus MH supplementiert mit 5% defibriniertem Pferdeblut und 20 mg/L  $\beta$ -Nicotinamid Adenin Dinukleotid (NAD).

# Medien für verschiedene Mikroorganismen

Mikroorganismen	Medium
Enterobacteriaceae <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp.	Mueller-Hinton Agar (MH)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Streptococcus Groups A, B, C and G Andere Streptokokken <i>Haemophilus</i> spp. <i>Moraxella catarrhalis</i>	Mueller-Hinton Agar + 5% defibriniertes Pferdeblut + 20 mg/L $\beta$ -NAD (MH-F)
Andere anspruchsvolle Mikroorganismen	in Arbeit

# Eigene Herstellung der Nährböden

- Herstellerhinweise beachten!
- Blut oder NAD erst zugeben, wenn das Medium auf 42-45°C abgekühlt ist (Kontrolle der Thermometer!), gut mischen und die Platten sofort giessen.
- Das Medium in sterile Petrischalen so abfüllen, dass die Schichtdicke gleichmäßig 4 mm  $\pm$  0.5 mm beträgt. Wenn wiederholte Messungen reproduzierbar eine Schichtdicke über oder unter 4 mm ergeben, das Volumen anpassen, auch wenn die Agartiefe zwischen 3.5 - 4.5 mm ist.

Übliche Plattenformate sind 90 mm/rund (~25 mL), 100 mm/rund (~31 mL), 150 mm/rund (~71 mL) 100 mm/quadratisch (~40 mL).

# Qualitätskontrolle des Mueller-Hinton Agars

Alle Mueller-Hinton Chargen müssen für alle Bakterien – Antibiotika Kombinationen innerhalb der definierten Grenzwerte liegen.

## Spezielle Probleme:

- Aminoglykosid Hemmhöfe für *P. aeruginosa* ATCC 27853 über/unter den Grenzwerten können auf erhöhte/erniedrigte Konzentrationen divalenter Kationen hinweisen.
- Trimethoprim-Sulfamethoxazol Hemmhöfe für *E. faecalis* ATCC 29212 unter den Grenzwerten können auf einen Überschuß an Thymin und Thymidin hinweisen.

# Trocknen und Lagern der Agarplatten

- Vor Gebrauch sollen auf den Oberflächen der Platten keine sichtbaren Wassertröpfchen vorhanden sein.
- Platten nicht austrocknen lassen.
- Trocknen und Lagern der selbstproduzierten Medien ist von der Ausstattung der individuellen Einrichtung abhängig und lokal abzustimmen.
- Für kommerziell erhältliche Medien den Angaben des Herstellers Folge leisten.

# Inokulum

- Die Methode erfordert eine Keimsuspension entsprechend einem Inokulum äquivalent zu einem Standard McFarland 0.5 \*.

\* Entspricht etwa  $1-2 \times 10^8$  KBE/mL für *E. coli* ATCC 25922.



# Auswählen von Kolonien einer Reinkultur

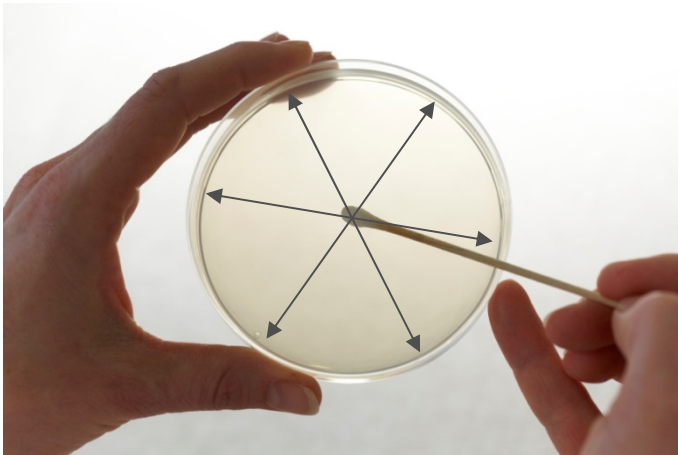


# Zubereitung des Inokulums

- Suspendieren von einer bis mehreren Kolonien in 0.85% NaCl und Herstellen einer gleichmässig trüben Lösung entsprechend dem Trübungsgrades des McFarland 0.5 Standards.
  - Ausnahme: wird *Streptococcus pneumoniae* von einer Blutagarplatte abgenommen gilt ein Inokulum von McFarland 0.5; bei Abnahme von einer Kochblutplatte ist ein Inokulum von McFarland 1.0 herzustellen.
- Den Trübungsgrad durch Zugabe von mehr Bakterien oder NaCl adjustieren, am besten mittels eines photometrischen Gerätes.

# Inokulation der Platten

- Optimalerweise Verarbeiten der adjustierten Suspensionen innerhalb 15 Minuten nach deren Herstellung, jedenfalls aber binnen 60 Minuten.
- Dazu einen sterilen Baumwolltupfer in die Suspension eintauchen und überschüssige Flüssigkeit am inneren Röhrchenrand ausdrücken.
- Gleichmässiges Aufbringen des Inokulums über die gesamte Agaroberfläche durch Sechsteln der Platte wie am Bild gezeigt und nachfolgendem Ausstrichen oder mittels eines Plattenrotators.



# Vermeiden eines zu dichten Inokulums auf den Medien

- Es ist wichtig die Platten nicht zu dicht zu beimpfen.
- Versichern Sie sich, dass die Hemmhöhe der Kontrollstämme innerhalb der dafür vorgesehenen Norm liegen. Zu dichte Inokula ergeben zu kleine Hemmhöhe.
- Vor dem Beimpfen der Medien überschüssige Flüssigkeit durch sanftes Ausdrücken des Tupfers am Röhrchenrand abrinnen lassen (aber den Tupfer nicht total auspressen, speziell bei gram-positiven Mikroorganismen).

# Aufbewahren der Antibiotikplättchen

- Den Lagerbestand an Plättchen entsprechend den Angaben des Herstellers aufbewahren.
- Plättchen in Gebrauch bei 4-8°C in geschlossenen Behältnissen mit Desikkant lichtgeschützt lagern.
- Vor Gebrauch und vor Öffnen der Behältnisse die Plättchen auf Raumtemperatur bringen. So wird vermieden, dass Wasser auf den Plättchen kondensiert. Unter Tags ist es besser die Plättchen bei Raumtemperatur zu belassen, als sie ständig zwischendurch zu kühlen.
- Keine Plättchen mit abgelaufenem Ablaufdatum verwenden.

# Aufbringen der Antibiotikaplättchen

- Aufbringen der Plättchen innerhalb 15 min nach Inokulation der Platten.
- Die Plättchen sollen mit der Mediumoberfläche in gleichmässigem, festen Kontakt sein.
- Die Plättchen sollen so angeordnet werden, dass sich die Hemmhöfe empfindlicher Isolate nicht überschneiden.



# Zusammenfassung des Inokulationsprozesses

- Für die Suspension vom nicht-selektiven Medium einer Übernacht-Kultur reine Kolonien verwenden. Adjustieren zu einer der Trübung optimal mit photometrischer Hilfe. Das Inokulum binnen **15 Minuten** weiterverarbeiten.
- Sterilen Tupfer in die Suspension eintauchen und überschüssige Flüssigkeit am inneren Röhrchenrand ausdrücken.
- Das Inokulum in geraden Strichen über die gesamte Agaroberfläche aufbringen.
- Antibiotikaplättchen innerhalb **15 Minuten** auf die inokulierten Platten aufbringen und binnen weiterer **15 Minuten** mit dem Bebrüten beginnen.

# Inkubieren der Platten

- Inkubieren der Platten binnen 15 Minuten nach Aufbringen der Antibiotikaplättchen, um eine vorzeitige Diffusion, die zu große Hemmhöfe ergeben könnte, zu vermeiden.
- Plattenstapel möglichst niedrig halten um eine gleichmässige Temperatur innerhalb des Stapels zu gewährleisten. Ungleichmässige Temperaturen können Hemmhöfe negativ beeinflussen.
- MH wird bei O<sub>2</sub> und MH-F bei O<sub>2</sub> mit 4-6% CO<sub>2</sub> inkubiert.

# Inkubation der Platten

Mikroorganismen	Inkubationsbedingungen
Enterobacteriaceae	35±1 °C in O <sub>2</sub> für 16-20h
<i>Pseudomonas</i> spp.	35±1 °C in O <sub>2</sub> für 16-20h
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35±1 °C in O <sub>2</sub> für 16-20h
<i>Acinetobacter</i> spp.	35±1 °C in O <sub>2</sub> für 16-20h
<i>Staphylococcus</i> spp.	35±1 °C in O <sub>2</sub> für 16-20h
<i>Enterococcus</i> spp.	35±1 °C in O <sub>2</sub> für 16-20h
<i>Streptococcus</i> Groups A, B, C and G	35±1 °C in O <sub>2</sub> mit 4-6% CO <sub>2</sub> für 16-20h
Andere Streptokokken	35±1 °C in O <sub>2</sub> mit 4-6% CO <sub>2</sub> für 16-20h
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35±1 °C in O <sub>2</sub> mit 4-6% CO <sub>2</sub> für 16-20h
<i>Haemophilus</i> spp.	35±1 °C in O <sub>2</sub> mit 4-6% CO <sub>2</sub> für 16-20h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35±1 °C in O <sub>2</sub> mit 4-6% CO <sub>2</sub> für 16-20h
Andere anspruchsvolle Mikroorganismen	in Arbeit

# Die 15-15-15 Minuten Regel

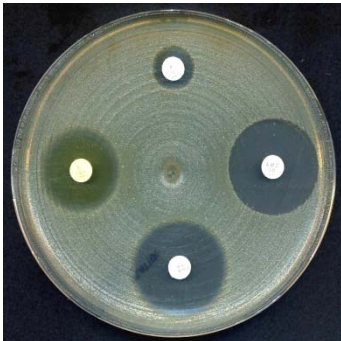
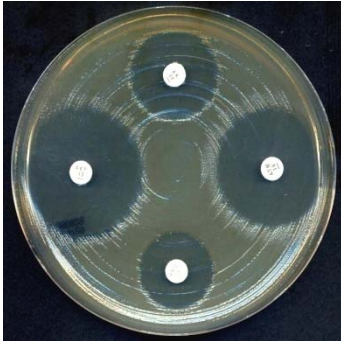
Bereiten Sie die Platten so vor, dass:

- ...das Inokulum innerhalb **15 Minuten** verwenden wird – und NIE später als 60 Minuten.
- ...nachdem die Platten inokuliert wurden die Plättchen binnen **15 Minuten** aufgebracht werden.
- ...innerhalb **15 Minuten** nach Aufbringen der Plättchen mit der Inkubation gestartet wird.

# Kontrolle der Platten nach der Inkubation

- Ein korrektes Inokulum auf einer richtig ausgestrichenen Platten erscheint nach der Inkubation als konfluenter Wachstumsrasen.
- Um einheitliche, runde Hemmhöfe zu erzielen ist es wichtig, dass ein gleichmässiger Wachstumsrasen vorliegt (nächstes Dia).
- Wenn Einzelkonlonien sichtbar sind war das Inokulum zu gering und der Test muss wiederholt werden.

# Wachstum soll konfluent und gleichmässig über die Platte verteilt sein



**Platten sollten so aussehen..**

**..und NICHT so!**

# Hemmhöfe ablesen

- Die Ränder der Hemmhöfe sollen dort abgelesen werden wo – wie mit freiem Auge beurteilbar - eine komplette Wachstumshemmung vorliegt.

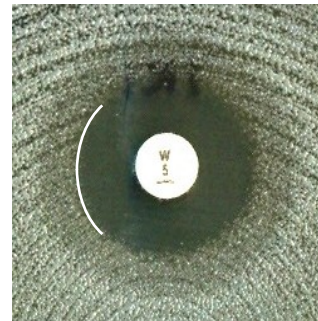
Beispiele:



*E. coli*  
Ciprofloxacin



*S. aureus*  
Erythromycin



CoNS  
Trimethoprim



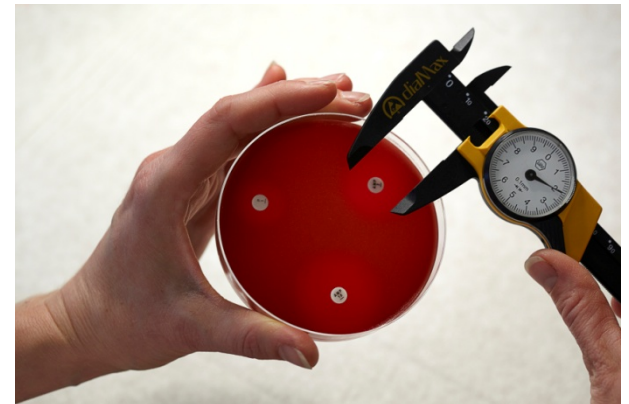
*S. pneumoniae*  
Rifampicin

# Hemmhöfe ablesen

- Messen der Hemmhöfe mit einem Lineal, einer Schublehre oder einer automatisierten Hilfe.
- Im Falle von Einzelkolonien innerhalb von Hemmhöfen diese Kolonien subkultivieren, auf Reinheit checken und gegebenenfalls den Test wiederholen.

# Hemmhöfe ablesen

- **MH** Platten von hinten gegen einen dunklen Hintergrund in Anwesenheit einer reflektierenden Lichtquelle ablesen.
- **MH-F** Platten von vorne bei abgenommenem Deckel in Anwesenheit einer reflektierenden Lichtquelle ablesen.



# Hemmhöfe ablesen – Ausnahmen

<b>Mikroorganismen</b>	<b>Antibiotika</b>	<b>Hemmhof ablesen</b>
<i>Proteus</i> spp.	alle	Schwärmen ignorieren.
<i>Streptococcus</i> spp.	alle	Wachstumshemmung und NICHT Hämolysezone ablesen.
Alle	Trimethoprim Trimethoprim-Sulfamethoxazol	Feinen Hauch von Wachstum bis zum Plättchen innerhalb von Hemmhöfen mit offensichtlichem Rand ignorieren.
<i>Staphylococcus</i> spp.	Linezolid	Bei durchscheinendem Licht untersuchen (Platte gegen Lichtquelle halten).
<i>Enterococcus</i> spp.	Vancomycin	Bei durchscheinendem Licht untersuchen (Platte gegen Lichtquelle halten).
Enterobacteriaceae	Ampicillin	Feines Wachstum in Form einer inneren Zone bei manchen Chargen MH ignorieren.

# Hemmhöfe interpretieren

- Versichern Sie sich, dass die Hemmhöfe der Kontrollstämme innerhalb der Norm liegen, bevor Testergebnisse klinischer Isolate interpretiert werden.
- Gemessene Hemmhöfe (Durchmesser in mm) werden in Empfindlichkeitskategorien (S, I und R) entsprechend den publizierten Tabellen interpretiert ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)). Alternativ kann eine Vorlage mit EUCAST Breakpoints verwendet werden.

# Kontrolle der Empfindlichkeitstestung

- Verwenden Sie die empfohlenen Routine Qualitätskontroll-Isolate um die Test Performance zu überprüfen (siehe [EUCAST Quality Control Tables](#)).
- Qualitätskontroll-Isolate mit definierten Resistenzmechanismen können verwendet werden, um die Fähigkeit Resistenz zu detektieren zu bestätigen.
- Qualitätskontroll-Isolate können bei Stammsammlungen oder kommerziell erworben werden.

# EUCAST Routine Qualitätskontroll-Stämme

Mikroorganismus	Stammsammlung Nummer	Charakteristika
<i>E. coli</i>	ATCC 25922; NCTC 12241; CIP 7624 DSM 1103; CCUG 17620, CECT 434	empfindlich, Wildtyp
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853; NCTC 12903; CIP 76110 DSM 1117; CCUG 17619; CECT 108	empfindlich, Wildtyp
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213; NCTC 12973; CIP 103429 DSM 2569; CCUG 15915; CECT 794	Schwache $\beta$ -Lactamase Produktion
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212; NCTC 12697; CIP 103214 DSM 2570; CCUG 9997; CECT 795	empfindlich, Wildtyp
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 49619; NCTC 12977; CIP 104340 DSM 11967; CCUG 33638	Penicillin intermediär empfindlich
<i>H. influenzae</i>	NCTC 8468; CIP5494, CCUG 23946	empfindlich, Wildtype

ATCC, American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA.

NCTC, National Collection of Type Cultures, Health Protection Agency Centre for Infections, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK.

CIP, Collection de Institut Pasteur, 25–28 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 France.

DSMZ, Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 16, D-38124 Braunschweig, Germany.

CCUG, The Culture Collection University of Gothenburg <http://www.ccug.se/>

CECT. Colección Española de Cultivos Tipo. Universidad de Valencia. 46100. Burjassot. Valencia. Spain. <http://www.cect.org>

# EUCAST Stämme zur Detektion spezifischer Resistenzmechanismen (in Entwicklung)

Mikroorganismen	Stammsammlung Nummer	Charakteristika
<i>E. coli</i>	ATCC 35218; NCTC 11954; CIP 102181; DSM 5564; CCUG 30600; CECT 943	TEM-1 $\beta$ -Laktamase Produzent
<i>S. aureus</i>	NCTC 12493	Oxacillin hetero-resistent, <i>mecA</i> positiv
<i>H. influenzae</i>	ATCC 49247; NCTC 12699; CIP 104604; DSM 9999 CCUG 26214	$\beta$ -Laktamase negativ, Ampicillin-resistent (BLNAR)

ATCC, American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA.

NCTC, National Collection of Type Cultures, Health Protection Agency Centre for Infections, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK.

CIP, Collection de Institut Pasteur, 25–28 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 France.

DSMZ, Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 16, D-38124 Braunschweig, Germany.

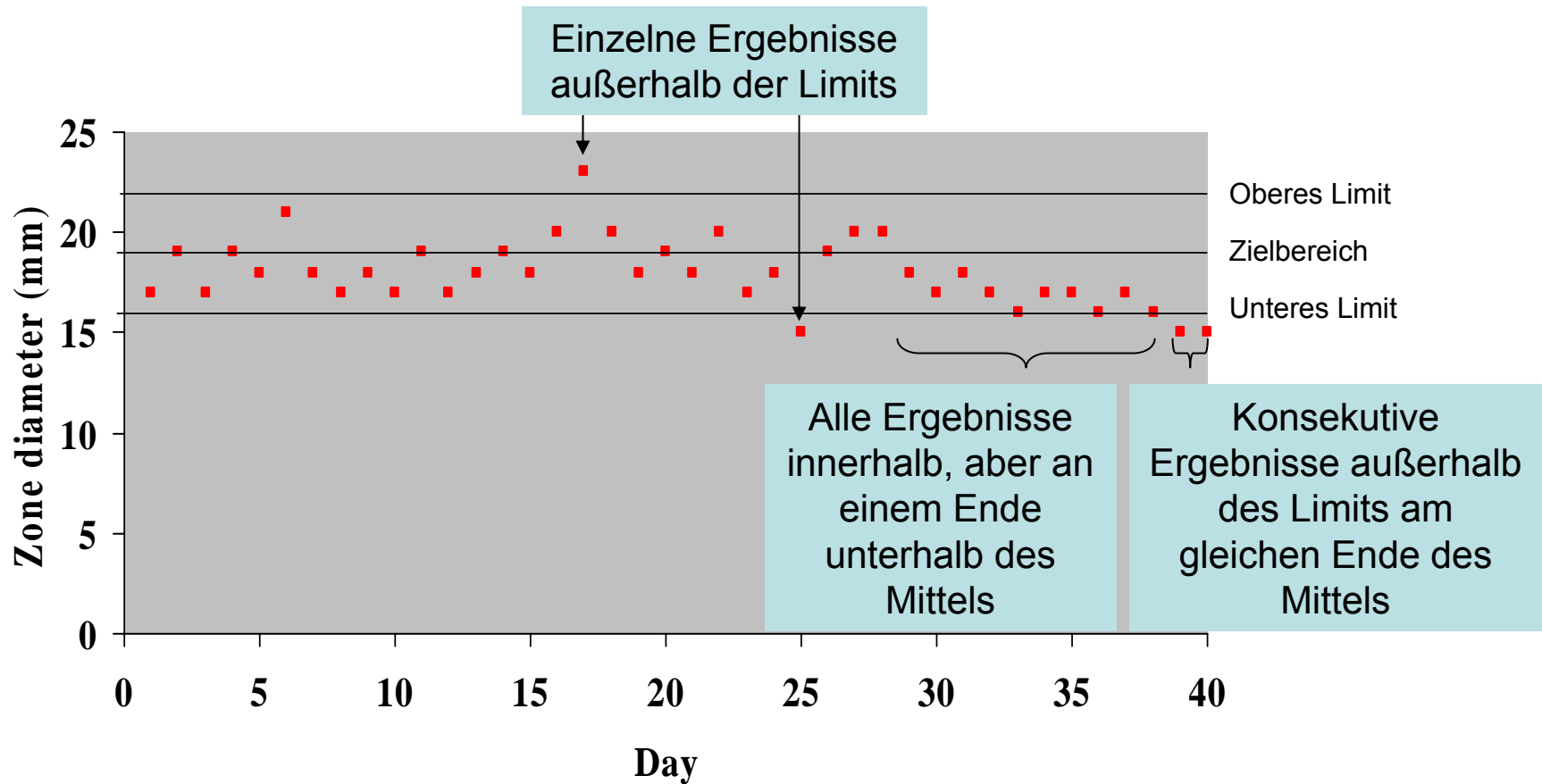
CCUG, The Culture Collection University of Gothenburg <http://www.ccug.se/>

CECT. Colección Española de Cultivos Tipo. Universidad de Valencia. 46100. Burjassot. Valencia. Spain. <http://www.cect.org>

# Verwenden von Routine Qualitätskontrollstämmen zur Überprüfung des generellen Verfahrens

- Antibiogrammkontrollen sollten täglich durchgeführt werden, zumindest für Antibiotika, die Teil der Routine Panels sind.
- Mit dem jeweiligen Testergebnis die Ergebnisse der vorangegangenen 20 Tests ins Kalkül ziehen.
- Trends beachten für Hemmhöfe die konstant über oder unter den zu erwarteten Werten liegen.
- Wenn 2 oder mehr von 20 Tests ausserhalb der Norm liegen, ist eine nähere Analyse indiziert.

# Beobachten der Test Performance



# Was tun wenn QC Ergebnisse nicht passen?

- Falls 2 nicht-konsequente Kontroll-Hemmhöfe von 20 Tests ausserhalb des akzeptablen Bereichs liegen – Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung berichten und der Sache nachgehen.
- Falls 2 konsequente Kontroll-Hemmhöfe von 20 Tests ausserhalb des akzeptablen Bereiches liegen – untersuchen BEVOR die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung berichtet werden. Die Tests könnten wiederholt werden müssen.
- Wenn mehrere Plättchen (>2) an einem Tag ausserhalb des Bereichs liegen – untersuchen BEVOR die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung berichtet werden. Die Tests könnten wiederholt werden müssen.
- Falls Resistenz bei einem resistenten Kontrollstamm nicht detektiert wird – empfindliche Testergebnisse vorerst unterdrücken, untersuchen und erneut testen.

# Lagerung und Subkultivieren von Kontrollstämmen

- Stämme bei -70 °C in Glycerol BHI mittels Kügelchen als “in-Gebrauch” Depot und “Archiv” aufbewahren. Alternativ können gefriergetrocknete Kulturen oder kommerzielle Lagerungssysteme verwendet werden.
- Wöchentliche Subkultur vom “in-Gebrauch”-Depot auf nicht-selektivem Medium mit Überprüfung der Reinheit
- Subkulturen von dieser Platte weg täglich bis zu 7 Tagen verwenden
- Anspruchsvolle Mikroorganismen können möglicherweise nur seriell für 6 Tage subkultiviert werden.
- Wenn das “in-Gebrauch” Depot aufgebraucht ist, eine neue Subkultur vom “Archiv” für ein neues “in-Gebrauch” Depot anlegen.

# Mögliche Fehlerquellen (1)

<b>Medium</b>	Aufbewahren der Platten
	Nicht nach Anweisung hergestellt
	Variation zwischen Chargen oder anderer Hersteller
	Supplemente (Variation zwischen Chargen, falsche Menge oder abgelaufen)
	pH
	Agar Höhe/Agar Volumen
	Ablaufdatum
<b>Test Bedingungen</b>	“15-15-15”-Regel nicht eingehalten
	Inkubation (Temperatur, Atmosphäre und Zeit)
	Inkorrekte Inokulation (zu wenig, zu dicht oder uneben)
	Ablesebedingungen
	AbleSEN der Hemmhofränder

# Mögliche Fehlerquellen (2)

<b>Plättchen</b>	Falsches Plättchen (falsche Substanz oder falsche Beladung)
	Plättchen Potenz (inkorrekte Lagerung, labile Substanz, Ablaufdatum)
	Plättchen nicht bei Raumtemperatur bei Öffnen des Behältnisses
	Zu viele Plättchen auf der Platte (Interferenz zwischen Substanzen)
<b>Kontroll-Stämme</b>	Falscher QC Stamm
	Mutation
	Kontamination
	Alter der Kultur

# EUCAST website

- Besuchen Sie die EUCAST website regelmäßig um sich über Updates in bezug auf Methodik, QC Werte und Breakpoints zu informieren.

[www.eucast.org](http://www.eucast.org)

- Bitte senden Sie Ihre Kommentare und Vorschläge an [erika.matuschek@ltkronoberg.se](mailto:erika.matuschek@ltkronoberg.se) oder an das EUCAST Sekretariat (siehe website).



**EUCAST**

EUROPEAN COMMITTEE  
ON ANTIMICROBIAL  
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases