

DIN 58940-31

ICS 07.100.10

**Medizinische Mikrobiologie –
Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern
gegen Chemotherapeutika –
Teil 31: Ergänzende Verfahren für die Empfindlichkeitsprüfung;
Text Deutsch und Englisch**

Medical microbiology –
Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents –
Part 31: Supplementing methods for susceptibility testing;
Text in German and English

Microbiologie médicale –
Contrôle de la sensibilité des agents pathogènes microbiens aux agents
chimiothérapeutiques –
Partie 31: Méthodes supplémentaires pour la détermination de la sensibilité;
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 24 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Inhalt

Seite

Vorwort.....	3
Einleitung.....	3
1 Anwendungsbereich.....	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe.....	4
4 β -Lactamase-Nachweise	4
4.1 Allgemeines	4
4.2 Testmethoden.....	5
4.2.1 β -Lactamase-Nachweis bei <i>Haemophilus</i> spp., <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacteroides</i> spp. und <i>Staphylococcus</i> spp.....	5
4.2.2 Nitrocefin-Test.....	5
4.2.3 Nachweis von β -Lactamasen mit erweitertem Spektrum (Extended-Spectrum- β -Lactamases, ESBLs) bei Gram-negativen Erregern.....	6
5 Nachweis von <i>Streptococcus pneumoniae</i> mit verminderter Penicillin-Empfindlichkeit.....	7
6 Möglichkeiten des Nachweises der Oxacillin- (Methicillin-) Resistenz bei <i>Staphylococcus aureus</i>	7
6.1 Allgemeines	7
6.2 Phänotypische Methoden	7
6.3 Genotypische Methoden	8
7 Nachweis der Makrolid-Lincosamid-Streptogramin-B-(MLS _B)-Resistenz bei <i>Streptococcus</i> spp.....	8
7.1 Allgemeines	8
7.2 Nachweis der MLS _B -Resistenz	8
8 Nachweis von Aminoglykosid-Hochresistenz (High-Level Aminoglycoside Resistance, HLAR) bei <i>Enterococcus faecalis</i> und <i>E. faecium</i>	8
9 Nachweis von Glycopeptid-intermediären <i>Staphylococcus aureus</i>	9
10 Nachweis der Glycopeptid-Resistenz von <i>Enterococcus</i> spp. [34].....	9
Literaturhinweise	11

Vorwort

Diese Norm wurde vom NA 063-05-10 AA „Chemotherapeutische Untersuchungsmethoden“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. in Zusammenarbeit mit der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. (PEG) und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) erarbeitet.

DIN 58940 *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika* besteht aus (Beiblätter werden nicht aufgeführt):

- Teil 1: *Begriffe*
- Teil 2: *Wirkstoffträger für den Agar-Diffusionstest*
- Teil 3: *Agar-Diffusionstest*
- Teil 4: *Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration*
- Teil 6: *Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nach der Agar-Dilutionsmethode*
- Teil 7: *Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) mit der Mikrodilution*
- Teil 8: *Mikrodilution — Allgemeine methodenspezifische Anforderungen*
- Teil 9: *Regressionsanalyse zur Korrelation von Hemmhofdurchmesser (HHD) und minimaler Hemmkonzentration (MHK)*
- Teil 10: *Kriterien für die Bewertung der In-vitro-Wirksamkeit neuer Chemotherapeutika*
- Teil 20: *Codierung von antimikrobiellen Wirkstoffen*
- Teil 31: *Ergänzende Verfahren bei der Empfindlichkeitsprüfung*
- Teil 81: *Mikrodilution — Spezielle Anforderungen an die Testung von nicht anspruchsvollen Bakterien*
- Teil 82: *Mikrodilution — Spezielle Anforderungen an die Testung von anspruchsvollen Bakterien*
- Teil 83: *Mikrodilution — Spezielle Anforderungen an die Testung von obligat anaeroben Bakterien*
- Teil 84: *Mikrodilution — Spezielle Anforderungen an die Testung von Pilzen gegen Antimykotika*

Einleitung

Neben der genormten Durchführung der Empfindlichkeitsprüfung ist für die Beurteilung der Ergebnisse die Kenntnis spezifischer Resistenzmechanismen erforderlich, die auch im Routinelabor zu detektieren und zu interpretieren sind [32]. Mit der vorliegenden Norm soll dem Anwender eine Hilfestellung und Hinweise zur Testung und Bewertung wichtiger bakterieller Resistenzmechanismen gegeben werden, die mittels der Agar-Diffusionsmethode unzureichend erfasst werden können.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für den Nachweis spezieller Resistenzmechanismen im Rahmen der Empfindlichkeitsprüfung mikrobieller Krankheitserreger.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

DIN 58940-1, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 1: Begriffe*

DIN 58940-3, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 3: Agar-Diffusionstest*

DIN 58940-81, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 81: Mikrodilution — Spezielle Anforderungen an die Testung von nicht anspruchsvollen Bakterien*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach DIN 58940-1.

4 β -Lactamase-Nachweise

4.1 Allgemeines

β -Lactamasen (d. h. Penicillinasen und Cephalosporinasen) werden von vielen klinisch relevanten Bakterien gebildet. Sie sind sehr häufig verantwortlich für die Resistenzausprägung gegen β -Lactam-Antibiotika. Der Vorteil eines β -Lactamase-Nachweises ist, dass die Ergebnisse schneller vorliegen und unabhängig vom Ergebnis des Agardiffusionstests der Resistenzmechanismus angezeigt wird. Obwohl am häufigsten, ist jedoch die Produktion von β -Lactamasen nicht der einzige Resistenzmechanismus, der bei einer β -Lactam-Antibiotika-Resistenz vorkommen kann. Deshalb garantiert ein negativer β -Lactamase-Test noch keine Empfindlichkeit gegen β -Lactam-Antibiotika. Bei einem negativen Testergebnis muss daher eine Empfindlichkeitsprüfung für diese Antibiotika durchgeführt werden.

Die Bildung von β -Lactamasen kann induziert werden, oder sie sind konstitutiv vorhanden. Ein induzierbares Enzym wird nur gebildet, wenn die Zellen bestimmten β -Lactam-Antibiotika ausgesetzt sind. Konstitutive Enzyme werden exprimiert, gleichgültig ob ein induzierender Wirkstoff vorhanden ist oder nicht.

Induzierbare β -Lactamasen werden unter anderem von den folgenden Spezies gebildet: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus vulgaris*, *Providencia* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. und *Burkholderia* spp. Eine routinemäßige Durchführung (siehe [2] und [4]) eines β -Lactamase-Induktions-Tests ist nicht erforderlich.

4.2 Testmethoden

4.2.1 β -Lactamase-Nachweis bei *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides* spp. und *Staphylococcus* spp.

Ein β -Lactamase-Test sollte für alle klinisch relevanten Isolate von *Haemophilus* spp. und *Neisseria gonorrhoeae* durchgeführt werden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 — β -Lactamase-Nachweis-Methoden

Methode	Nitrocefin ^a /PADAC ^b
Substrat	Chromogenes Cephalosporin
Reaktion	Farbänderung, wenn der β -Lactam-Ring geöffnet wird
Ergebnisse	Positiv: bei Nitrocefin, rosa bis rot; bei PADAC, purpurn Negativ: keine Farbänderung (gelb)
In der Regel geeignet für:	<i>Haemophilus</i> spp. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacteroides</i> spp.
ANMERKUNG Zur Testdurchführung siehe [1], [12], [13], [15], [16], [17], [18], [30], [31], [33].	
^a Nitrocefin ist ein chromogenes Cephalosporin.	
^b PADAC (Pyridin-2-azo-dimethylanilin) ist ein Cephalosporin.	

4.2.2 Nitrocefin-Test

Durchführung [31], [33]

- Nitrocefin-Blättchenstreifen in leere Petrischalendeckel geben oder auf einen Objektträger legen.
- Blättchen mit einem Tropfen Wasser anfeuchten.
- mit steriler Öse oder ähnlichem mehrere einzeln stehende Kolonien aufnehmen und auf dem Blättchenstreifen verreiben.
- Blättchenstreifen auf Farbumschlag beobachten.

Ergebnisse und Interpretation:

Bei positiver Reaktion schlägt die gelbe Farbe dort, wo die Bakterien verrieben wurden, nach rosa bis rot um.

Die Reaktion findet überwiegend innerhalb von 5 min statt, verlängert sich allerdings bei Staphylokokken auf bis zu 1 h.

Tabelle 2 — Beurteilung des Nitrocefin-Tests [33]

Bakterienart ^a	Zeit bis zum positiven Ergebnis	Interpretation ^b
<i>Haemophilus influenzae</i>	1 min	Resistenz gegen Penicilline, Aminopenicilline und Acylureidopenicilline
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 min	
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1 min	
<i>Enterococcus faecalis</i>	5 min	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 h	
Anaerobe Bakterien	30 min	Wahrscheinlich gegen Penicilline, möglicherweise gegen Cephalosporine einschließlich Cefotaxim und selten Cefoxitin resistent
^a Das Testverfahren ist bei anderen als den angegebenen Arten nicht überprüft. ^b Negative Ergebnisse legen eine Empfindlichkeit nahe, der Einschluss weiterer Kriterien ist jedoch empfehlenswert.		

4.2.3 Nachweis von β -Lactamasen mit erweitertem Spektrum (Extended-Spektrum- β -Lactamasen, ESBLs) bei Gram-negativen Erregern

4.2.3.1 Allgemeines

ESBLs inaktivieren Cephalosporine der 3. Generation sowie Aztreonam und werden meist durch Clavulansäure inhibiert. Diese Eigenschaften sind Grundlage ihres spezifischen Nachweises. Sie werden zz. besonders bei *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* und *Escherichia coli* beobachtet.

Bei Testergebnissen für Cephalosporine insbesondere Cefuroxim, Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftazidim, Cefepim, Cefpodoxim, nicht aber Cefoxitin, nahe der Grenze zwischen sensibel und intermediär empfiehlt sich eine Überprüfung auf ESBL-Produktion. Verminderte Empfindlichkeit gegen Ceftazidim oder Cefpodoxim ist der beste Indikator für die meisten TEM- und SHV-ESBL-Typen, jedoch erfasst die verminderte Empfindlichkeit gegen Cefotaxim (CTX) die CTX-M-Typen besser. Resistenz gegenüber Ceftazidim und Empfindlichkeit gegenüber Cefoxitin (kein Substrat für ESBL) ist ein deutlicher Hinweis auf eine ESBL-Produktion, die mit zusätzlichen Testverfahren bestätigt werden muss [4], [7], [8], [9], [12], [17], [18].

Enterobacteriaceae mit ESBLs sind empfindlich gegen Cefoxitin, während Isolate mit exprimierter *AmpC*- β -Lactamase (Cephamecinase) hier intermediär oder resistent sind.

Cefoxitin-Resistenz bei *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella* spp. und *Proteus mirabilis* (bei diesen Stämmen gibt es von Natur aus keine *AmpC*- β -Lactamasen) ist immer ein Hinweis auf ein plasmid-kodiertes und damit übertragbares *ampC*-Gen. Wegen der Ausbreitung im Hospitalmilieu ist hier ein rechtzeitiges Erkennen sehr wichtig [5], [6], [18], [19].

Stämme mit ESBL-Produktion können zu klinischem Versagen bei einer Therapie mit Penicillinen, Cephalosporinen (Cepheme) oder Aztreonam führen, obwohl in vitro eine Wirksamkeit vorhanden ist. Bei einem ESBL-Nachweis sind die genannten Chemotherapeutika, unabhängig vom jeweiligen Testergebnis, als „resistent“ zu bewerten.

4.2.3.2 Testdurchführung

Für die Testdurchführung sind mindestens zwei verschiedene Cephalosporin-Clavulansäure-Kombinationen vorzusehen (z. B. Cefotaxim und Ceftazidim jeweils mit und ohne β -Lactamase-Inhibitor). Im Agardiffusionstest nach DIN 58940-3 werden Cefpodoxim 10 μ g und parallel Cefpodoxim mit einem Zusatz von 1 μ g Clavu-

lansäure je Testblättchen getestet. Im Labor hergestellte Kombinationstestblättchen müssen am Tage der Herstellung verbraucht werden. Eine Vergrößerung des Cefpodoxim-Clavulansäure-Hemmhofs um ≥ 5 mm im Vergleich zum Cefpodoxim ohne Clavulansäure spricht für ESBL [3].

ANMERKUNG 1 Von der gebräuchlichen ESBL-Screening-Wirkstoffen (Cefotaxim, Cefpodoxim, Ceftriaxon, Ceftazidim oder Aztreonam) ist derzeit Cefpodoxim der beste ESBL-Screening-Wirkstoff für *Klebsiella* spp. und *Escherichia coli*.

ANMERKUNG 2 Für die Durchführung im Rahmen eines Agardiffusionstests stehen kommerziell erhältliche Testblättchen zur Verfügung (z.B. Cefpodoxim 10 µg, Cefpodoxim 10 µg + Clavulansäure 1 µg; Ceftazidim 30 µg, Ceftazidim 30 µg + Clavulansäure 10 µg; Cefotaxim 30 µg, Cefotaxim 30 µg + Clavulansäure 10 µg) [3].

5 Nachweis von *Streptococcus pneumoniae* mit verminderter Penicillin-Empfindlichkeit

Testdurchführung: Zum Nachweis der verminderten Penicillin-Empfindlichkeit bei *Streptococcus pneumoniae* im Agardiffusionstest nach DIN 58940-3 eignen sich Testblättchen mit 1 µg Oxacillin [20], [21].

Bewertung: Hemmhofdurchmesser ≤ 19 mm weisen auf eine verminderte Penicillin-Empfindlichkeit hin, die durch eine MHK-Bestimmung von Penicillin G bestätigt werden muss. Bei einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Penicillin kann nicht notwendigerweise auf eine Resistenz gegenüber Cephalosporinen geschlossen werden. Die entsprechenden MHK-Werte müssen bestimmt werden.

6 Möglichkeiten des Nachweises der Oxacillin-(Methicillin-)Resistenz bei *Staphylococcus aureus*

6.1 Allgemeines

Gegenwärtig zeigen die weltweit verbreiteten Oxacillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) den Heteroresistenz-Phänotyp, bei dem nur ein kleiner Teil der in vitro geprüften Population die Resistenz ausprägt. Hetero-MRSA können mit Screening-Tests erfasst werden [20], [21], [27], [35]. Der übliche Agar-Diffusionstest mit Oxacillin zeigt die Heteroresistenz der MRSA nicht zuverlässig an.

6.2 Phänotypische Methoden

Mueller-Hinton-Agar mit 4 % NaCl und 6 mg/l Oxacillin wird mit 10 µl einer Bakteriensuspension (Inokulum McFarland 0,5) punktförmig inokuliert (Durchmesser 10 mm bis 15 mm). Die Bebrütung erfolgt über 24 h bei 35 °C in Raumluft [4].

Interpretation: Bereits das Wachstum von Einzelkolonien oder eines dünnen Films beweisen Resistenz.

Alternativ kann der Bouillon-Grenzkonzentrationstest durchgeführt werden [20].

Weiterhin kann der MRSA-Nachweis auf Nähragar mit Zusatz von Cefoxitin und chromogenen Substrat für alkalische Phosphatase erfolgen.

ANMERKUNG Eine zulässige Alternative besteht im Nachweis des Penicillin-Bindungsproteins PBP2a mittels Latex Agglutination. [22], [25]. Ganz wesentlich für den Nachweis ist die Exposition der *Staphylococcus aureus* Stämme gegenüber Oxacillin, z.B. durch die Verwendung von Kolonien vom Rand des Oxacillin-Hemmhofes [24]. Die Evaluation des Testes ist bei Cuny et al. [20] und van Leeuwen et al. [25] beschrieben.

6.3 Genotypische Methoden

Die PCR für *mecA* hat sich als die Referenzmethode für die Bestimmung der Oxacillin-Resistenz bei *Staphylococcus aureus* durchgesetzt. Die Bestimmung des MRSA-Genotyps erfolgt durch den Nachweis des *mecA*-Gens [23], [27].

7 Nachweis der Makrolid-Lincosamid-Streptogramin-B-(MLS_B)-Resistenz bei *Streptococcus* spp.

7.1 Allgemeines

Die vorherrschenden Mechanismen der Makrolid-Resistenz sind:

- a) die Veränderung der Membranproteine für den Transport (Efflux). Diese Resistenz richtet sich ausschließlich gegen 14- und 15-gliedrige Makrolide (M-Phänotyp);
- b) die Modifikation der Zielstruktur durch Methylasen, die eine Methylierung der 23S Untereinheit der r-RNS bewirken. Hierdurch wird die Bindung von Makroliden, Lincosamiden und Streptograminen an die Ribosomen verhindert (MLS_B-Phänotyp).

Die Bildung der Methylasen kann induzierbar oder konstitutiv erfolgen. Als Induktoren wirken 14-gliedrige Makrolide, nicht jedoch Lincosamide. Der MLS_B-Phänotyp führt zur Unempfindlichkeit gegenüber Makroliden, Lincosamiden und B-Streptograminen.

7.2 Nachweis der MLS_B-Resistenz

Der Nachweis von MLS_B- und M-Phänotypen von Erythromycin-resistenten Stämmen bzw. einer MLS_B-Resistenz erfolgt im Agardiffusionstest mittels der Doppel-Disk-Diffusionstechnik mit 30 µg Erythromycin und 10 µg Clindamycin Testblättchen. Die Testblättchen werden in einem Abstand von etwa 15 mm nebeneinander auf das Testmedium (Mueller-Hinton Agar mit 2 % (v/v) lysiertem Pferdeblut) und über Nacht (16 h bis 20 h) bei 36 °C ± 1 °C in einer Atmosphäre mit etwa 5 % CO₂ inkubiert [29]. Nach Inkubation kommt es im Falle einer induzierbaren MLS_B-Resistenz beim Clindamycin Testblättchen an der Seite die zu dem Erythromycin Testblättchen zeigt, zu einer Abflachung des Hemmhofes („Halbmondphänomen“), während im Fall der Efflux-Resistenz das „Halbmondphänomen“ nicht zu beobachten ist. Wenn die MLS_B-Resistenz konstitutiv exprimiert wird, bildet sich um beide Testblättchen kein oder nur ein sehr kleiner Hemmhof aus. Bei einer induzierbaren MLS_B-Resistenz stellen die Lincosamide keine Therapieoption dar. Empfindlichkeit gegen Clindamycin (Hemmhof) ohne Veränderung des Hemmhofes um das Clindamycin-Testblättchen bei gleichzeitiger Resistenz von Erythromycin (kein oder nur sehr kleiner Hemmhof) zeigt den M-Phänotyp an.

8 Nachweis von Aminoglykosid-Hochresistenz (High-Level Aminoglycoside Resistance, HLAR) bei *Enterococcus faecalis* und *E. faecium*

Die natürliche Resistenz gegen Gentamicin bei *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* liegt bei 16 mg/l. In Fällen der Aminoglykosid-Hochresistenz (Gentamicin-MHK > 500 mg/l) ist eine synergistische Wirkung mit zellwandaktiven Antibiotika (z. B. Penicillinen) nicht zu erwarten (bei Sepsis, Endokarditis, Meningitis!). Eine Kreuzresistenz mit Streptomycin besteht nicht. Streptomycin muss zusätzlich getestet werden (Hochresistenz Streptomycin-MHK > 1 000 mg/l). Die Bestimmung der Aminoglykosid-Hochresistenz ist im Agardiffusionsverfahren [34] nach DIN 58940-3 nicht validiert.

Bei einer Aminoglykosid-Hochresistenz-MHK muss auf dem Befund der Hinweis auf fehlenden Synergismus zwischen Aminoglykosiden und Penicillinen hingewiesen werden.