

Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Erreger gegen Chemotherapeutika

Chemotherapeutika sind synthetische, chemisch definierte Substanzen oder Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen wie Schimmelpilzen, Streptomyceten oder – im Fall der Antibiotika – von verschiedenen Bakterien. Diese antimikrobiellen Wirkstoffe können selbst in geringen Konzentrationen das Wachstum bakterieller Erreger hemmen (Bakteriostase) oder die Erreger abtöten (Bakteriozidie), ohne den Wirtsorganismus zu schädigen.

Verschiedene Bakterienarten sind gegen Chemotherapeutika unempfindlich (resistent). Sie besitzen entweder eine natürliche Unempfindlichkeit, die sog. konstitutive Resistenz oder aber eine durch genetische Veränderungen des Mikroorganismus bedingte, erworbene Resistenz. Die Zunahme resistenter Stämme bei vielen Bakterien in den letzten Jahren hat zu einer bedeutenden Erhöhung der Virulenz und einer erschwerten Therapie bei einer Reihe von Infektionskrankheiten geführt. Besonders bekannt ist der starke Anstieg pathogener Salmonellen.

Die Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Erreger gegen Chemotherapeutika hat deshalb eine große Bedeutung für die wirksame Therapie bakterieller Infektionen. Eine detaillierte und normierte Methodik der Resistenzbestimmung ist durch die DIN 58940¹ und die DIN 58944² beschrieben, die vorgeben, welche Nährböden zu verwenden, welche Testblättchen aufzulegen und in welcher Form Verdünnungsreihen anzusetzen sind. Dabei ist zu betonen, daß für diese *in vitro*-Testung das Wechselverhältnis von Bakterium und Chemotherapeutikum der entscheidende Faktor ist. Dieses Wechselverhältnis wird unter stabilisierten, statischen Bedingungen untersucht, die der Komplexität der tatsächlichen Verhältnisse nicht entsprechen, weshalb die Empfindlichkeitsprüfung die Therapie immer nur begleiten und nicht allein leiten kann.

Die wichtigsten Methoden zur Resistenzbestimmung sind der Reihenverdünnungs- und der Agardiffusionstest. Der Agardiffusionstest wurde 1947 entwickelt³ und ist, trotz verschiedener Versuche, andere Testmethoden einzuführen, die am häufigsten angewendete Methodik. Dabei kann der Agardiffusionstest – wie auch alle anderen Methoden – nicht den *in vivo*-Bedingungen entsprechen; er kann aber die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen des Chemotherapeutikums auf eine wachsende mikrobielle Population aufzeigen. Die minimale Hemmkonzentration eines Chemotherapeutikums (MHK oder MIC: Minimal Inhibition Concentration) ist die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes in µg/ml (oder in IE/ml), bei der die Vermehrung der Erreger (Erregerpopulation) unter definierten Bedingungen verhindert wird¹. Die MHK wird bei der Durchführung des Agardiffusionstestes durch die Größe des Hemmhofes dargestellt, der das Resultat der Wechselwirkung einer definierten Konzentration antimikrobieller Substanz auf eine definierte mikrobielle Population innerhalb eines definierten Zeitraumes ist.^{4,5}

Der Agardiffusionstest ist relativ einfach durchzuführen. Da jedoch die Wechselwirkung zwischen Chemotherapeutikum und Erregerpopulation sehr komplexer Natur

ist, hängen Genauigkeit und Präzision der Ergebnisse von folgenden Faktoren ab.

Nährböden

Nährböden für den Agardiffusionstest sollten speziell hergestellt und geprüft werden. Folgende OXOID Nährböden können verwendet werden:

- DST-Agar (OXOID, Art.-Nr. CM 261) war der erste speziell für den Agardiffusionstest entwickelte Nährboden. Die ursprüngliche Rezeptur wurde durch Reduzierung des Thymidingehaltes modifiziert.
- Iso-Sensitest-Agar (OXOID, Art.-Nr. CM 471) ist der erste semisynthetische Nährboden zur Resistenzbestimmung. Der Anteil der nicht genau definierten und deshalb schwer reproduzierbar herzustellenden Peptone und Proteinhydrolysate wurde auf ein Minimum reduziert. Gleichzeitig wurde die Konzentration an freien Kationen auf *in vivo*-Verhältnisse eingestellt. Iso-Sensitest-Agar ist unter allen verfügbaren Nährböden zur Empfindlichkeitsprüfung der Nährboden der Wahl, da er am besten reproduzierbare Ergebnisse gewährleistet (siehe auch Iso-Sensitest-Nährböden im Kapitel 'Nährböden').
- Mueller-Hinton-Nährboden (OXOID, Art.-Nr. CM 337) wurde ursprünglich für eine optimale Kultivierung pathogener Neisserien entwickelt und später für die Kirby-Bauer-Methode als Standardnährboden eingesetzt⁶. Dieser Nährboden wurde häufig wegen unzureichend reproduzierbarer Ergebnisse kritisiert. Aufgrund einer Vereinbarung zwischen Nährbodenherstellern und der NCCLS sowie der FDA wurde die Rezeptur des Nährbodens standardisiert, und die NCCLS erarbeitete Spezifikationen, denen der Nährboden entsprechen muß⁷. Auf dem Etikett wird deklariert, daß der Nährboden dem NCCLS-Standard M6-P für Mueller-Hinton-Nährboden in dehydrierter Form entspricht.
- Wilkins-Chalgren-Nährboden (OXOID, Art.-Nr. CM 619) wird sowohl vom DIN² als auch vom NCCLS⁸ als Standardnährboden zur Empfindlichkeitsprüfung anaerober bakterieller Krankheitserreger empfohlen.
- Schaedler-Nährboden (OXOID, Art.-Nr. CM 437) kann mit Zusatz von 5% Schafblut und Vitamin K₃ (Mena-dion) zur Vorkultur bei der Empfindlichkeitsprüfung von Anaerobiern nach DIN 58944² eingesetzt werden.
- Haemophilus-Testagar (OXOID, Art.-Nr. CM 898 + SR 158) wurde speziell zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung von *Haemophilus influenzae* entwickelt und entspricht den Empfehlungen der NCCLS⁹.
- HR-Nährboden (OXOID, Art.-Nr. CM 845) ist ein chemisch definierter Nährboden für die antimykotische Empfindlichkeitsprüfung von Hefen, Dermatophyten und anderen Pilzen. Er ermöglicht die Bestimmung der Minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) von Flucanazol und anderen Antimykotika sowohl im Agar-

dilutionsverfahren als auch im Reihenverdünnungstest.

Außer dem DST-Agar und dem Haemophilus-Testagar werden alle Nährböden zur Resistenzbestimmung auch in einer flüssigen Version hergestellt. Das ermöglicht Verdünnungsreihen und Voranreicherungen in einer Lösung gleicher Zusammensetzung. Damit ist z. B. die methodische Voraussetzung für die Durchführung von Regressionsanalysen gegeben, um die Korrelation von MHK und Hemmhofdurchmesser zu ermitteln.

Eine Reihe von Nährbodenbestandteilen hat Einfluß auf die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen der Resistenzbestimmung. Der verwendete Agar z. B. muß eine optimale Diffusion der Chemotherapeutika vom Testblättchen aus gewährleisten. Änderungen des pH-Wertes können Unterschiede in der Größe der Hemmhöfe bewirken. Bei der Testung proteingebundener Substanzen wie z. B. Fusidinsäure kann ein Blutzusatz zu einer Reduzierung des Hemmhofdurchmessers führen. Änderungen in der Konzentration freier Ionen führen zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Testung von Aminoglycosiden, Tetracyclinen und Polymyxinen. Der Glucosegehalt der Nährböden kann die Hemmhöfe ebenfalls beeinflussen. Bei Verwertung der Glucose kommt es zum Absinken des pH-Wertes und damit zu einer Verringerung des Hemmhofdurchmessers. Bei der Prüfung von Trimethoprim und Sulfonamiden schließlich ist es wichtig, die Konzentrationen von Thymidin und Thymin zu kontrollieren und ggf. zu reduzieren.

Alle Faktoren, die die Eigenschaften von Nährböden zur Resistenzbestimmung beeinflussen können, werden vom Hersteller geprüft. Der Hersteller untersucht alle produzierten Nährböden unter definierten Bedingungen mit ausgewählten und festgelegten Chemotherapeutika und gewährleistet damit die in den Normen und Empfehlungen festgelegten Qualitätsspezifikationen der Nährböden. Dennoch sollten auch beim Anwender die von den Normen empfohlenen internen, verkürzten Qualitätskontrollen durchgeführt werden.

Testblättchen

Die Papierqualität der Testblättchen sollte den Anforderungen der DIN¹, der WHO¹⁰ und der FDA¹¹ entsprechen. Die Beladung der Testblättchen mit den Chemotherapeutika erfolgt entsprechend den in den nationalen und internationalen Normen und Empfehlungen angegebenen Mengen und Grenzwerten. Dabei sind die vom DIN¹ festgelegten Grenzwerte im internationalen Vergleich besonders anspruchsvoll.

Die OXOID Testblättchen werden zu jeweils 50 Testblättchen in einer Kartusche für den OXOID Andruckdispenser angeboten. Eine Packung enthält jeweils 5 Kartuschen, wobei jede Kartusche individuell versiegelt ist. Zur Trocknung wird mit jeder Kartusche eine Patrone mit Silicagel eingeschweißt.

Eine sorgfältige Lagerung der Testblättchen ist notwendig, um einen Aktivitätsverlust des Antibiotikums zu vermeiden. Längerfristig sollten die Testblättchen bei -20°C gelagert werden; ein Arbeitsvorrat jedoch kann bei 2–8°C gelagert werden. Für den unmittelbaren Gebrauch sollte die Packung mit den eingeschweißten Magazinen erst dann geöffnet werden, wenn sie Raumtemperatur angenommen hat, um zu vermeiden, daß Kondenswasser an

die Testblättchen gelangt. Normalerweise ist dazu eine Zeitspanne von 1–2 Stunden erforderlich. Häufig verwendete Testblättchen können tagsüber bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, sofern der jeweilige Behälter geschlossen und mit Trocknungsmittel versehen ist. Über Nacht sind die Testblättchen im Kühlschrank zu lagern. Die auf dem Etikett vermerkte Haltbarkeit wird durch sorgfältige Prüfung des Herstellers gewährleistet. Dabei beziehen sich die angegebenen Haltbarkeitsdaten stets auf ungeöffnete und nach Vorschrift gelagerte Packungen.

Inokulum

Ein wesentlicher Faktor für die Ausbildung des Hemmhofdurchmessers ist ebenfalls das Inokulum. Das Inokulum sollte so beschaffen sein, daß es nach der Aussaat zu dichtem, aber nicht konfluierendem Wachstum kommt. In der Regel wird das mit Inokula von ca. 10^5 – 10^6 Keimen pro ml erreicht¹. Dabei muß zur Erzielung eines dichten, nicht-konfluierenden Wachstums beachtet werden, daß verschiedene Keime unterschiedliche Trübungsgrade aufweisen können.

Weitere Faktoren, die die Ausbildung des Hemmhofes beeinflussen

– Bebrütungstemperatur und -dauer
Brutschränke sollten der DIN 58945¹² entsprechen und regelmäßig überprüft werden. Die Bebrütung sollte in nicht zu großen Plattenstapeln erfolgen, da die notwendige Temperatur in der Mitte des Stapels u. U. erst spät erreicht wird.

Eine Bebrütungsdauer von 16–18 Stunden bei 36°C sollte stets eingehalten werden.

– Vorinkubation und Vordiffusion

Es sollte darauf geachtet werden, daß der Zeitraum zwischen dem Beimpfen der Platten und dem Aufbringen der Testblättchen nicht zu stark variiert, wenn zahlreiche Agar-Diffusionstests angelegt werden und nach Möglichkeit 15 Minuten nicht überschreitet. Das Gleiche gilt für den Zeitraum zwischen dem Aufbringen der Testblättchen und dem Beginn der Bebrütung. Es ist wichtig, daß diese Zeitintervalle standardisiert sind, da die Vordiffusionszeit des Antibiotikums vor der Bebrütung vergleichbar sein sollte.

– Schichtdicke

Zur Erzielung einer gleichmäßigen Diffusion sollten den Empfehlungen des DIN entsprechend¹ Petrischalen mit einem Durchmesser von 90 mm und einem Füllvolumen von 20 ± 1 ml verwendet werden, um einheitliche Schichtdicken von 3–3,5 mm zu erhalten.

– Aufbringen der Testblättchen

Es ist wichtig, daß die Testblättchen fest auf der feuchten Oberfläche des Nährbodens angedrückt werden. Um eine Überschneidung der sich ausbildenden Hemmhöfe zu vermeiden, sollten nicht mehr als sechs bis acht Testblättchen je Petrischale (Ø 90 mm) aufgebracht werden. Der OXOID Andruckdispenser (Art.-Nr. ST 6090 für 6 Testblättchen, ST 8090 für 8 Testblättchen bzw. ST 1215 für 12 Testblättchen) gewährleistet ein sicheres und zuverlässiges Aufbringen der Testblättchen.

Interpretation der Hemmhofdurchmesser

Die Genauigkeit beim Ablesen des Hemmhofdurchmessers hängt von der Ausbildung einer scharfen Grenze des Hemmhofes und der Beleuchtung der Petrischale ab. Am geeignetsten ist eine indirekte Beleuchtung bei dunklem Hintergrund. Der Hemmhof sollte genau gemessen und protokolliert werden. Die Interpretation der Hemmhofdurchmesser sollte entsprechend der DIN 58940¹ bzw. der NCCLS-Standards¹³ erfolgen.

Qualitätskontrolle

Um reproduzierbare Ergebnisse mit dem Agardiffusionstest zu gewährleisten, sollten von den einzelnen Laboratorien interne Qualitätskontrollen durchgeführt werden. Für diese interne Qualitätskontrolle werden von der DIN 58940¹ folgende Kontrollstämme empfohlen.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 (DSM 1104)
Staphylococcus aureus ATCC 29213 (DSM 2569)
Enterococcus faecalis ATCC 29212 (DSM 2570)
Escherichia coli ATCC 25922 (DSM 1103)
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (DSM 1117)

OXOID Produkte für die Empfindlichkeitsprüfung

Bezeichnung	Art.-Nr.
Nährböden	
DST-Agar	CM 261
Haemophilus-Testagar-Basis	CM 898
Haemophilus-Supplement	SR 158
HR-Nährboden-Basis	CM 845
Iso-Sensitest-Agar	CM 471
Iso-Sensitest-Lösung	CM 473
Mueller-Hinton-Nährboden	CM 337
Mueller-Hinton-Bouillon	CM 405
Schaedler-Nährboden	CM 437
Schaedler-Lösung	CM 497
Wilkins-Chalgren-Nährboden	CM 619
Wilkins-Chalgren-Lösung	CM 643
Andruckdispenser	
Andruckdispenser für 6 Testblättchen	ST 6090
Andruckdispenser für 8 Testblättchen	ST 8090
Andruckdispenser für 12 Testblättchen	ST 1215

Das umfassende Angebot an OXOID Testblättchen zusammen mit der individuellen Beladung und der Codierung des Chemotherapeutikums für die Empfindlichkeitsprüfung ist der jeweils gültigen Preisliste zu entnehmen.

Literatur

- DIN 58940: "Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika."
- DIN 58944: "Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung anaerober bakterieller Krankheitserreger gegen Chemotherapeutika."
- Bondi, A. et al. (1947) Am. J. Med. Sci. 214, 221-225.
- Cooper, H.E. (1964) "The theory of antibiotic zones". in: Kavanagh, F. (Hrsg.) "Analytical microbiology". Academic Press, New York, S. 1-86.
- Bell, S.M. (1975) Pathology 7 (Suppl.), 1-48.
- Bauer, A.W. et al. (1966) Am. J. Clin. Path. 45, 493-496.
- NCCLS (2000) "Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests". 7th Edn., Approved Standard NCCLS Document

- M2-A7 und "Protocols for Evaluating Dehydrated Mueller-Hinton Agar". NCCLS Document M6-A, NCCLS, Villanova, Pa.
- NCCLS (1993) "Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria". 3rd Ed., Approved Standard NCCLS Document M11-A3, NCCLS Villanova, Pa.
- NCCLS (2000) "Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests". 7th Edn., Approved Standard NCCLS Document M2-A7 und NCCLS (1997) "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically." NCCLS Document M7-A4, NCCLS Villanova, Pa.
- WHO (1977) "Requirements for antibiotic susceptibility tests". Technical Report Series Nr. 610, Genf.
- FDA (1978) Codes of Federal Republics 21, Teil 460.
- DIN 58945: "Brutschränke für mikrobiologische Zwecke; Begriffe, Anforderungen, Anwendungen."
- NCCLS (2000) "Performance standard for antimicrobial susceptibility testing". 10th Informational Supplement NCCLS Document M100-S10, NCCLS Villanova, Pa.