BBL Haemophilus Test Medium Agar

L007380 • Rev. 06 • Februar 2007

MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE

I EINFÜHRUNG

Haemophilus Test Medium Agar ist zur Verwendung für die Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung von *Haemophilus*-Spezies mit Hilfe der Blättchendiffusionsmethode vorgesehen.

II LEISTUNGSPRÜFUNG

1. Repräsentative Proben mit den nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren.
   a. Vorbereitung des Inokulums.
      Eine Suspension des Organismus in Mueller-Hinton-Bouillon oder Mueller-Hinton-II-Bouillon zubereiten. Die Suspension bei 625 nm auf eine Extinktion von 0,1 einstellen. Diese Suspension enthält etwa 1 bis 4 x 10^8 KBE/mL.
   b. Innerhalb von 15 min nach der Trübungseinstellung des Inokulums einen sterilen Tupfer in die Bouillonsuspension tauchen. Den Tupfer mehrmals oberhalb der Flüssigkeit an der Röhrchenwand abrollen, um überschüssiges Inokulum zu entfernen.
   c. Den Tupfer über die Oberfläche der Agarplatte streichen, um das Medium zu inokulieren. Diesen Schritt weitere 2 Mal wiederholen und die Agarplatte dabei jedes Mal um 60 Grad drehen.
   d. Den Deckel der Petrischale wieder aufsetzen und das Inokulum vor dem Auflegen der **Sensi-Disc**-Blättchen für die Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung mindestens 3 min, jedoch nicht länger als 15 min absorbieren lassen.
   e. Die entsprechenden Blättchen mit einem **Sensi-Disc** Dispenser mit 6 oder 8 Blättchen für 100-mm-Petrischalen bzw. einem **Sensi-Disc** Designer Dispenser System mit 12 Blättchen für 150-mm-Petrischalen auf die entsprechenden Kulturen legen. Auf eine 100-mm-Agarplatte sollten höchstens vier und auf eine 150-mm-Agarplatte höchstens neun sowie höchstens sechs der folgenden Antibiotika-Blättchen gelegt werden: Cephalosporine der dritten Generation, Aztreonam, Imipenem oder Ciprofloxacin.
   f. Die Agarplatten innerhalb von 15 min nach dem Auflegen der Blättchen umdrehen und in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten aeroben Atmosphäre bei 35 ± 2 °C inkubieren.
2. Die Agarplatten nach 16 bis 18 h untersuchen. Die Durchmesser der Zonen vollständiger Hemmung messen und auf den nächsten Millimeter auf- bzw. abrunden. Die Grenze sollte als der Bereich betrachtet werden, in dem mit bloßem Auge kein Wachstum festzustellen ist; geringfügiges Wachstum sehr kleiner Kolonien, das nur schwer am Rand der Hemmzone sichtbar sind, sollte ignoriert werden. Bei Trimethoprim und den Sulfonamiden das geringfügige Wachstum (20 % oder weniger des Bakterienrasens) ignorieren und den deutlicheren Rand ausmessen, um den Hemmzonendurchmesser zu bestimmen.
3. Zu erwartende Ergebnisse
   a. Testorganismen:
      * *Haemophilus influenzae* ATCC 49247
      * *Haemophilus influenzae* ATCC 49766
      Haemophilus influenzae ATCC 10211
      (Zur Bestätigung der wachstumsfördernden Eigenschaften.)
   b. Die Hemmzonengrößen sollten innerhalb der akzeptablen Qualitätskontrollgrenzen für Hemmzonendurchmesser für *H. influenzae* liegen, die vom Clinical and Laboratory Standards Institute (ehemals NCCLS) spezifiziert wurden. Diese Grenzen sind im CLSI-Dokument M100-S17 (M2) veröffentlicht, das im CLSI-Dokument M2-A9, *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 9th ed.; Approved Standard enthalten ist.[1] Ergänzende Tabellen mit revidierten Aufstellungen von Antibiotika-Blättchen und Bewertungsnormen werden regelmäßig herausgegeben. Für die derzeit geltenden Empfehlungen wird auf die aktuellen Tabellen verwiesen. Weitere Informationen sind im Kasten unter „ERGEBNISSE“ im Abschnitt „PRODUKTINFORMATIONEN“ aufgeführt.
   c. Das Wachstum von *H. influenzae* ATCC 10211 sollte moderat bis stark sein.

*Empfohlener Stamm für die Qualitätssicherung durch den Anwender.

III ZUSÄTZLICHE QUALITÄTSKONTROLLE

1. Die Agarplatten wie unter „Haltbarkeit des Produkts“ beschrieben begutachten.
2. Die repräsentativen Agarplatten auf sichtbare Beschädigungen prüfen, durch die ihre Verwendung beeinträchtigt werden könnte.
3. Den pH-Wert photometrisch bei Raumtemperatur bestimmen. Er sollte bei 7,3 ± 0,1 liegen.
4. Die Festigkeit der Agarplatten während der Inokulation beachten.
5. Unbeimpfte repräsentative Agarplatten 72 h. bei 35 ± 2 °C inkubieren und auf mikrobielle Kontamination untersuchen.

PRODUKTINFORMATIONEN

IV VERWENDUNGSZWECK

Haemophilus Test Medium Agar (HTM Agar) ist zur Verwendung bei der Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung von *Haemophilus* spp. mit Hilfe der Blättchendiffusionsmethode vorgesehen. Diese Methode ist im Approved Standard M2-A9 des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) beschrieben.[1]

V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Bauer, Kirby und Kollegen entwickelten 1966 eine Standardmethode für die Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung von häufig vorkommenden, schnell wachsenden Bakterien, bei der Mueller-Hinton-Agar als Testmedium gewählt wurde.[2-4] Dieses Medium ist für anspruchsvolle Organismen wie Streptokokken, Gonokokken und *Haemophilus*-Spezies ungeeignet.

Für *Haemophilus influenzae* wurde früher mit 1 % Hämoglobin und 1 % **IsoVitaleX** angereicherter Mueller-Hinton-Agar empfohlen.[5] Von Jorgensen und Kollegen durchgeführte umfangreiche Studien führten zur Entwicklung von Haemophilus-Testmedium (HTM).[6,7] Dabei handelt es sich um Mueller-Hinton-Agar oder -Bouillon, die mit Faktor X (Hämin oder Hämatin), Faktor V (Nikotinamidadenindinukleotid, NAD) und Hefeextrakt angereichert sind.

Ein bedeutender Vorteil von HTM-Agar im Vergleich zu Mueller-Hinton-Schokoladenagar ist seine optische Klarheit, die eine Messung des Hemmzonendurchmessers vom Boden der Petrischale ermöglicht, wie es normalerweise für nicht anspruchsvolle Organismen auf Mueller-Hinton-Agar üblich ist. Außerdem enthält HTM-Agar geringe Mengen Thymidin und ist daher zur Prüfung von Trimethoprim/Sulfamethoxazol geeignet.

Auswertungskriterien für die Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung von *Haemophilus* sind im CLSI-Dokument M100-S17 (M2)[8] gegeben, das im CLSI-Dokument M2-A9[1] enthalten ist. Weitere Einzelheiten sind diesem Dokument zu entnehmen.

VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Die Bauer-Kirby-Methode beruht auf der Diffusion von Antibiotika, die auf Papierblättchen imprägniert sind, durch ein Agargel. Im Gegensatz zu älteren Methoden, bei denen Blättchen mit hoher und niedriger Antibiotikakonzentration verwendet wurden und das Auftreten oder Fehlen von Hemmzonen zur Auswertung herangezogen wurde, werden bei dieser Methode Blättchen mit einer einzigen Antibiotikakonzentration verwendet und die Hemmzonendurchmesser mit minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) korreliert.[1-3,9]

Bei der Durchführung des Tests wird eine standardisierte Suspension des Organismus über die gesamte Oberfläche des Mediums ausgestrichen. Papierblättchen, die mit festgelegten Mengen von Antibiotika oder anderen antimikrobiellen Substanzen imprägniert sind, werden danach auf die Oberfläche des Mediums gelegt, die Agarplatte wird inkubiert und die Hemmzone um jedes Blättchen wird gemessen. Die Entscheidung, ob der Organismus empfindlich, resistent oder intermediär gegenüber der Substanz ist, wird durch einen Vergleich der entstandenen Hemmzonendurchmesser mit den Richtlinien im CLSI-Dokument M100-S17 (M2)[8] getroffen.

Empfindlichkeitsprüfungen mit Hilfe des Blättchendiffusionstests werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Diese umfassen das Medium, die Agartiefe, die Antibiotikakonzentration im Blättchen, die Inokulumkonzentration, den pH-Wert und die β-Lactamaseproduktion des Testorganismus.[1,5,9,10]

VII REAGENZIEN

Haemophilus Test Medium Agar

Ungefähre Zusammensetzung* pro 1 L destilliertem Wasser

Rindfleischextrakt	2,0	g
Säurehydrolysat von Casein	17,5	g
Stärke	1,5	g
Agar	17,0	g
Hefeextrakt	5,0	g
Hämatin	15,0	mg
Nikotinamidadenindinukleotid	15,0	mg

*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum.

Wenn übermäßige Feuchtigkeit vorhanden ist, das Unterteil umdrehen, versetzt auf den Deckel legen und in der Luft trocknen lassen, um zu verhindern, dass während der Inkubation eine Abdichtung zwischen dem Deckel und dem Unterteil entsteht.

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen und Anwendung aseptischer Techniken erfolgen. Gebrauchsfertige Agarplatten, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach der Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Aufbewahrung

Agarplatten nach Erhalt bei 2–8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nicht einfrieren oder Überhitzen. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor Lichteinwirkung schützen. Gebrauchsfertige Agarplatten, die bis zur Verwendung in der Originalverpackung bei 2–8 °C aufbewahrt wurden, können bis zum Verfallsdatum inokuliert und für die empfohlene Inkubationsdauer inkubiert werden. Das Medium vor der Inokulation auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

Haltbarkeit des Produkts

Agarplatten bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

VIII PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Dieses Medium ist nicht zur direkten Verwendung mit klinischen Proben oder Mischkulturen vorgesehen. Die Empfindlichkeitsprüfung mit Hilfe der Blättchendiffusionsmethode muss mit Reinkulturen durchgeführt werden. Eine Gram-Färbung und eine präsumtive Identifizierung von *Haemophilus* sind erforderlich.

Einzelheiten zur Probenentnahme und zum Umgang mit den Proben sind der einschlägigen Literatur zu entnehmen.[11,12]

IX VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Haemophilus Test Medium Agar

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial:

1. Je 5 mL Inokulum-Bouillon in Röhrchen wie Mueller-Hinton-Bouillon, Mueller-Hinton-II-Bouillon oder 0,9%ige Kochsalzlösung zur Zubereitung des Standardinokulums.
2. Ein 0,5-McFarland-Trübungsstandard zur Einstellung des Inokulums (Zubereitung erfolgt durch Zugabe von 0,5 mL 0,048 M $BaCl_2$ [1,175 % (Gew./Vol.) $BaCl_2 \cdot 2H_2O$] zu 99,5 mL 0,18 M [0,36N] H_2SO_4 [1 %(Vol./Vol.)]).
3. Photometer zur Einstellung der Trübung der Inokulumsuspension auf einen McFarland-Standard von 0,5.
4. Alternativ zum o.g. Arbeitsmaterial (1 – 3) kann das **BBL** Prompt Inoculation System (volumetrisches Inokulumzubereitungssystem) verwendet werden.[13,14]
5. Kontrollkulturen – *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, ATCC 49766 und ATCC 10211.
6. Mit festgelegten Mengen Antibiotika imprägnierte Papierblättchen wie **BBL Sensi-Disc**-Blättchen für die Empfindlichkeitsprüfung.
7. Blättchendispensiergerät wie der **Sensi-Disc** Self-Tamping 12-Place Dispenser.
8. Instrument zur Messung oder Interpretation des Hemmzonendurchmessers in ganzen Millimetern wie eine Schieblehre oder ein Lineal.[1] Alternativ dazu kann ein **Sensi-Disc** Zone Interpretation Set (Best.-Nr. 260639) mit Musterschablonen und Zonenmessetiketten für diesen Zweck verwendet werden.

9. Ein Reagenz oder eine Vorrichtung zur Durchführung eines β-Lactamase-Schnelltests wie **BBL Cefinase** Discs.
10. Ein Inkubator, der eine Atmosphäre mit 5 % CO_2 erzeugt, oder ein anderes Gerät, das eine CO_2-angereicherte Atmosphäre erzeugt.
11. Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

Testverfahren

1. Vor Beginn der Empfindlichkeitsprüfung eine Gram-Färbung anfertigen, um die Reinheit der Kultur und die präsumtive Identifizierung von *Haemophilus* zu bestätigen.
2. Als Inokulumquelle mehrere gut isolierte Kolonien direkt von einer über Nacht (vorzugsweise 20 bis 24 h.) bebrüteten Schokoladenagarplatte verwenden.
3. Für den Nachweis von Stämmen, die gegenüber Penicillin, Ampicillin oder Amoxicillin resistent sind, sollte ein β-Lactamase-Schnelltest durchgeführt werden.
4. Eine Suspension des Testorganismus in Mueller-Hinton-Bouillon, Mueller-Hinton-II-Bouillon oder 0,9%iger Kochsalzlösung zubereiten. Diese Suspension sollte mit einem Photometer auf einen McFarland-Trübungsstandard von 0,5 eingestellt werden. Diese Suspension enthält etwa 1 bis 4 x 10^8 KBE/mL. Die Suspension muss sorgfältig zubereitet werden, da höhere Inokulumkonzentrationen bei einigen β-Lactam-Antibiotika zu falsch-resistenten Ergebnissen führen können, insbesondere wenn β-Lactamase produzierende Stämme von *H. influenzae* getestet werden.[1] Von den Inokulumsuspensionen regelmäßig Verdünnungen zubereiten und Platten auszählen, um sicherzustellen, dass die angewendete Einstellungsmethode ein Inokulum mit etwa 1 bis 4 x 10^8 KBE/mL ergibt.
5. Alternative Methoden für die Inokulumzubereitung mit Hilfe von Vorrichtungen, die eine direkte Standardisierung des Inokulums ohne Trübungseinstellung ermöglichen, wie das **BBL** Prompt Inoculation System sind für Routinetests akzeptabel.[13] Dieses System ist ebenfalls zur Prüfung von *H. influenzae* geeignet.[14]
6. Innerhalb von 15 min nach der Trübungseinstellung des Inokulums einen sterilen Wattetupfer in das korrekt verdünnte Inokulum tauchen und mehrmals fest an der oberen Innenwand des Röhrchens abrollen, um überschüssige Flüssigkeit auszudrücken.
7. Die gesamte Agaroberfläche drei Mal inokulieren und die Agarplatte dabei jedes Mal um 60 Grad drehen, um eine gleichmäßige Inokulation zu erzielen. Abschließend den Tupfer auf dem Rand des Agarbetts ausstreichen.
8. Der Deckel kann 3 bis 5 min, jedoch nicht länger als 15 min geöffnet bleiben, damit eventuelle oberflächliche Feuchtigkeit vor dem Aufbringen der Arzneimittel-imprägnierten Blättchen absorbiert wird.
9. Die Blättchen mit Hilfe eines entsprechenden Dispensiergeräts unter Beachtung aseptischer Kautelen auflegen. Die meisten Antibiotika produzieren größere Hemmzonen bei der Prüfung von *Haemophilus* im Vergleich zu anderen Organismen. **Daher sollten auf eine 100-mm-Agarplatte höchstens vier und auf eine 150-mm-Agarplatte höchstens neun Antibiotika-Blättchen sowie höchstens sechs der folgenden Blättchen gelegt werden: Cephalosporine der dritten Generation (z.B. Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftriaxon, Cefizoxim), Aztreonam, Imipenem oder Ciprofloxacin.** Die Blättchen nach dem Auflegen auf den Agar mit einer sterilen Kanüle oder Pinzette andrücken, um einen guten Kontakt mit der Medienoberfläche sicherzustellen. Dieser Schritt ist nicht notwendig, wenn die Blättchen mit Hilfe des **Sensi-Disc** Self Tamping 12-Place Dispensers aufgelegt wurden (die Andrückvorrichtung funktioniert nur, wenn Kartuschen eingelegt sind).
10. Die Agarplatten innerhalb von 15 min nach dem Auflegen der Blättchen umdrehen und in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten aeroben Atmosphäre 16 bis 18 h bei 35 °C inkubieren.
11. Eine HTM-Agarplatte mit *H. influenzae* ATCC 10211 ausstreichen und zusammen mit den Agarplatten für die Empfindlichkeitsprüfung inkubieren, um sicherzustellen, dass das Medium ausreichend Wachstum ermöglicht.

Qualitätssicherung durch den Anwender

Siehe „Maßnahmen zur Qualitätskontrolle“.

Kontrollkulturen sollten bei jeder Empfindlichkeitsprüfung mitgeführt werden bzw. wöchentlich, wenn eine zufriedenstellende Leistung in Übereinstimmung mit dem CLSI-Standard[1] dokumentiert werden kann. Die korrekten Hemmzonendurchmesser sind im Dokument M100-S17 (M2)[8] aufgeführt.

X ERGEBNISSE

1. Die Agarplatten nach 16 bis 18 h Inkubation untersuchen. Es sollte ein konfluenter Bakterienrasen vorhanden sein. Wenn nur einzeln stehende Kolonien gewachsen sind, war das Inokulum zu schwach und der Test muss wiederholt werden.
2. Mit einer Schieblehre, einem Lineal oder einer zweckbestimmten Schablone die Durchmesser der Zonen vollständiger Hemmung (mit bloßem Auge zu erkennen) einschließlich des Blättchendurchmessers messen und

auf den nächsten Millimeter auf- oder abrunden. Das Messinstrument liegt dabei auf der Unterseite der Agarplatte, die über einem schwarzen, nicht reflektierenden Hintergrund gehalten und von unten beleuchtet wird.

Die Grenze sollte als der Bereich betrachtet werden, in dem mit bloßem Auge kein Wachstum festzustellen ist. Geringfügiges Wachstum sehr kleiner Kolonien, das nur schwer am Rand der Hemmzone sichtbar sind, sollte ignoriert werden.

Bei Trimethoprim und den Sulfonamiden können Antagonisten im Medium geringfügiges Wachstum ermöglichen; geringfügiges Wachstum (20 % oder weniger des Rasens) daher ignorieren und den deutlicheren Rand ausmessen, um den Hemmzonendurchmesser zu bestimmen.

3. Informationen zur Auswertung von Ergebnissen, die mit klinischen *Haemophilus*-Isolaten erzielt wurden, sind dem CLSI-Dokument M100-S17 (M2) zu entnehmen.[8] Die Ergebnisse können je nach Hemmzonendurchmesser als resistent, intermediär oder empfindlich angegeben werden.

HINWEIS: Ergänzende Tabellen zum CLSI-Dokument M2-A9 mit revidierten Aufstellungen von Antibiotika-Blättchen und Bewertungsnormen werden regelmäßig herausgegeben. Für die derzeit geltenden Empfehlungen wird auf die aktuellen Tabellen verwiesen. Informationen über aktuelle Publikationen sind beim Technischen Kundendienst von BD erhältlich. Das vollständige Normenwerk sowie Ergänzungen können beim Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA bestellt werden. Telefon-Nr.: (610) 688-1100.

Organismen, die im β-Lactamasetest positiv sind, sollten ungeachtet des Hemmzonendurchmessers als resistent gegen Ampicillin eingestuft werden. Dabei ist zu beachten, dass ampicillinresistente Stämme von *H. influenzae* ohne β-Lactamase-Aktivität beschrieben wurden.[15] Wenn der Hemmzonendurchmesser auf Resistenz gegenüber Ampicillin hindeutet, sollte das Isolat daher als resistent gegenüber diesem Arzneimittel berichtet werden, selbst wenn der β-Lactamasetest negativ ist.

XI VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Bei manchen Organismen/Antibiotika-Kombinationen hat die Hemmzone ggf. keinen deutlich abgegrenzten Rand, wodurch das Ergebnis falsch interpretiert werden könnte.

Eine inkorrekte Inokulumkonzentration kann zu ungenauen Ergebnissen führen. Bei einem Inokulum mit zu hoher Konzentration können die Hemmzonen zu klein ausfallen und bei zu niedriger Konzentration können die Hemmzonen schwer zu messen sein.

Auf eine 100-mm-Agarplatte sollten höchstens vier und auf eine 150-mm-Agarplatte höchstens neun Antibiotika-Blättchen sowie höchstens sechs der folgenden Blättchen gelegt werden: Cephalosporine der dritten Generation (z.B. Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftriaxon, Cefizoxim), Aztreonam, Imipenem oder Ciprofloxacin.

Unsachgemäße Lagerung der Antibiotika-Blättchen kann zum Verlust der Wirksamkeit und falsch-resistenten Ergebnissen führen.

Die *In-vitro*-Empfindlichkeit eines Organismus gegenüber einem spezifischen Antibiotikum bedeutet nicht unbedingt, dass das Arzneimittel *in vivo* wirksam ist. Richtlinien zur Auswertung der Ergebnisse sind der einschlägigen Literatur zu entnehmen.[5,10]

XII LEISTUNGSMERKMALE

A. Reproduzierbarkeitsstudie[16]

Drei Produktionschargen von HTM-Agar wurden anhand der Empfindlichkeitsprüfung mit Antibiotika-Blättchen (M2-A4), die zu dieser Zeit vom NCCLS empfohlen wurde, beurteilt.[17] In der Studie wurden insgesamt 12 Antibiotika (Amoxicillin/Clavulanat, Ampicillin, Ampicillin/Sulbactam, Cefaclor, Cefonicid, Ceftriaxon, Cefuroxim, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Rifampin, Tetracyclin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol) und 14 *H. influenzae*-Stämme getestet. Sieben der 14 Stämme waren Stämme der American Type Culture Collection (ATCC). Die restlichen Stämme waren Stammkulturen, die sechs klinische Isolate und eine industrielle Qualitätskontrollkultur umfassten. Die Hemmzonendurchmesser jeder der drei Chargen wurden mit den Interpretationskriterien (Tabelle 2A) im Dokument M2-A4 verglichen.[17] In nur sechs Fällen wurden mit einer Charge Hemmzonen erzielt, die im Vergleich mit den anderen beiden Chargen in eine andere Interpretationskategorie fielen. Drei der sechs abweichenden Ergebnisse wurden mit Tetracyclin, eines mit Cefaclor und eines mit Cefuroxim erzielt. Bei Tetracyclin würde das Ergebnis in die Interpretationskategorie „empfindlich“ oder „intermediär“ (geringfügiger Fehler) fallen. Bei Cefaclor und Cefuroxim würde das Ergebnis aufgrund eines Unterschiedes von 1 mm in die Kategorie „intermediär“ oder „resistent“ fallen, was ebenfalls einen geringfügigen Fehler darstellt.

Diese Studie beinhaltete fünf β-Lactamase produzierende Stämme von *H. influenzae*. Bei jedem dieser Stämme entstanden mit jeder HTM-Charge Hemmzonendurchmesser mit Ampicillin, die als resistent zu interpretieren wären. Zwei der fünf Stämme produzierten außerdem Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT). Die bei diesen Stämmen entstandenen Chloramphenicolzonen entsprechen einer Chloramphenicol-Resistenz.[18,19]

B. Vergleich mit Mueller-Hinton-Schokoladenagar[16]

Das NCCLS-Blättchenverfahren wurde mit 213 klinischen Isolaten von *H. influenzae* auf HTM-Agar und Mueller-Hinton-Schokoladenagar durchgeführt.[17,20] Die getesteten Antibiotika waren Ampicillin, Ampicillin-Sulbactam, Amoxicillin-Clavulanat and Chloramphenicol. Dies sind die einzigen Antibiotika, für die Interpretationskriterien für Hemmzonendurchmesser auf Mueller-Hinton-Schokoladenagar definiert wurden.[21,22] Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt.

		Haemophilus Test Medium Agar		
		E	**I**	**R**
Mueller-Hinton	**E**	808	1	2
Schokoladenagar	**I**	0	0	0
	R	0	0	41

Übereinstimmung: 99,6 % E = Empfindlich I= Intermediär R= Resistent

Bei Ampicillin traten zwei schwerwiegende und ein geringfügiger Fehler auf. Bei beiden schwerwiegenden Fehlern war das HTM-Ergebnis „resistent“, während das Ergebnis auf Mueller-Hinton-Schokoladenagar „empfindlich“ war. Beide dieser Isolate waren positiv für β-Lactamase. Das Ergebnis „resistent“ war daher korrekt. Der geringfügige Fehler trat bei einem Isolat auf, das auf HTM-Agar „intermediär“ und auf Mueller-Hinton-Schokoladenagar „empfindlich“ war.

XIII LIEFERBARE PRODUKTE

Best.-Nr.	Beschreibung
221954	**BBL** Haemophilus Test Medium Agar, Packung mit 8 (150 x 15 mm) Agarplatten
221992	**BBL** Haemophilus Test Medium Agar, Packung mit 10 (100 x 15 mm) Agarplatten

XIV LITERATUR:

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Approved standard: M2-A9. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 9th ed. CLSI, Wayne, Pa.
2. Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. *45*:493-496.
3. Ryan, K.J., F.D. Schoenknecht, and W.M.M. Kirby. 1970. Disc sensitivity testing. Hospital Practice *5*:91-100.
4. Barry, A.L., F. Garcia, and L.D. Thrupp. 1970. An improved single disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. Am. J. Clin. Pathol. *53*:149-158.
5. Thornsberry, C., T.L. Gavan, E.H. Gerlach. 1977. Cumitech 6, New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Coordinating ed., J.C. Sherris. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Jorgensen, J.H., J.S. Redding, L.A. Maher, and A.W. Howell. 1987. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol. *25*:2105-2113.
7. Jorgensen, J.H., A.W. Howell, and L.A. Maher. 1990. Antimicrobial susceptibility testing of less commonly isolated *Haemophilus* species using *Haemophilus* test medium. J. Clin. Microbiol. *28*:985-988.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. CLSI disk diffusion supplemental tables, M100-S17 (M2). CLSI, Wayne, Pa.
9. Ericsson, H.M., and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. *217*:1-90.
10. Jorgensen, J.H., J.D. Turnidge, and J.A. Washington. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods, p. 1526-1543. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Isenberg, H.D., FD. Schoenknecht, and A. von Graevenitz. 1979. Cumitech 9, Collection and processing of bacteriological specimens. Coordinating ed.,S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Miller, J.M., and H.T. Holmes. 1999. Specimen collection, transport, and storage, p.33-63. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. Americn Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. Baker, C.N., C. Thornsberry, and R.W. Hawkinson. 1983. Inoculum standardization in antimicrobial susceptibility testing: evaluation of overnight agar cultures and the rapid inoculum standardization system. J. Clin. Microbiol. *17*:450-457.
14. Marsik, F., G. Evans, J. Fowler, and L. Thompson. 1989. Comparison of the **BBL™** Prompt™ system, Abbott A-Just™, and visual method for the preparation of *Haemophilus influenzae* inoculum for the Bauer-Kirby procedure, abstr. C-67, p. 404. Abstr. 89th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1989.
15. Doern, G.V., J.H. Jorgensen, C. Thornsberry, D.A. Preston, T.A. Tubert, J.S. Redding, and L.A. Maher. 1988. A national collaborative study of the prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. *32*:180-185.
16. Data on File, BD Diagnostic Systems, Sparks, Md.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1990. Approved standard: M2-A4. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 4th ed. NCCLS, Villanova, Pa.
18. Azemun, P., T. Stull, M. Roberts, and A.L. Smith. 1981. Rapid detection of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. *20*:168-170.
19. Doern, G.V., G.S. Daum, and T.A. Tubert. 1987. *In vitro* chloramphenicol susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*: disk diffusion procedures and assays for chloramphenicol acetyltransferase. J. Clin. Microbiol. *25*:1453-1455.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1984. Approved standard: M2-A3. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 3rd ed. NCCLS, Villanova, Pa.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1987. Second Informational Supplement: M100-S2. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS, Villanova, Pa.

22. Doern, G.V. and R.N. Jones. 1988. Antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, and *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob. Agents Chemother. *32*:1747-1753.

Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA
800-638-8663

EC REP
BENEX Limited
Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
Shannon, County Clare, Ireland
Tel: 353-61-47-29-20
Fax: 353-61-47-25-46

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
Prompt is a trademark of 3M.
BD, BD Logo, BBL, Cefinase, IsoVitaleX and Sensi-Disc are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2007 BD