

Arbeits- / Verfahrensanweisung:		Einrichtung / Praxis	
Durchführung des Antibiogramms über Agardiffusionstest (ADT)			
Erstellt		Durchführende Mitarbeiter	
Letzte Bearbeitung			
Verantwortlich			

Inhalt

1.	Allgemeines	XX
1.1.	Zeckbestimmung	XX
1.2.	Verwendung	XX
1.3.	Weiterführende Arbeitsanweisungen	XX
2.	Vorbereitung / Material	XX
2.1.	Material	XX
2.1.1.	Allgemeines Arbeitsmaterial	XX
2.1.2.	Antibiotika-Kartuschen	XX
2.1.3.	Patientenprobe	XX
2.2.	Lagerung & Vorratshaltung	XX
2.2.1.	Lagerung	XX
2.2.2.	Vorratshaltung	XX
2.2.3.	Aufbereitung & Materialkontrolle	XX
2.2.4.	Bestellwesen	XX
2.3.	Vorbereitung	XX
2.4.	Schutzmaßnahmen	XX
3.	Durchführung	XX
3.1.	Anlage	XX
3.1.1.	Erstellen der Suspension	XX
3.1.2.	Anlegen der Platten	XX
3.1.3.	Bebrüten der Platten	XX
3.2.	Ablesung	XX
3.2.1.	Ausmessen der Hemmhöfe	XX
4.	Ergebnisinterpretation	XX
4.1.	Interpretation der Hemmhöfe	XX
4.2.	Bestimmung der Sensibilität der Standardtherapeutika	XX
4.3.	Bestimmung der Resistenzen bei den Leitsubstanzen	XX
5.	Dokumentation und Dokumentenlenkung	XX
5.1.	Dokumentation der Ergebnisse für die Standardtherapeutika	XX
5.2.	Dokumentation der Ergebnisse für die Leitsubstanzen	XX

6.	Fehlerquellen und Qualitätskontrollen	XX
6.1.	Fehlerquellen	XX
6.2.	Qualitätskontrollen	XX
7.	Anhang	XX
7.1.	Literatur / Quellen	XX
7.2.	Kontaktadressen / Hilfestellungen	XX
8.	Kurzform zum Aushängen / Auslegen am Arbeitsplatz	XX

1. Allgemeines

1.1. Zweckbestimmung

Diese Arbeitsanweisung dient der Durchführung des Agardiffusionstest (ADT) zur Austestung von der Wirksamkeit von Standardtherapeutika und Leitsubstanzen gegen einen isolierten Erreger. Ziel ist es dabei ein Mittel zur Therapie zu finden, das beim Patienten eingesetzt werden kann.

Ferner soll abgeklärt werden, ob es sich bei den isolierten Keimen um multiresistente Erreger handelt.

1.2. Verwendung

Diese Arbeitsanweisung ist zu konsultieren:

- vor Aufnahme der Methode,
- bei der Einweisung neuer Mitarbeiter,
- bei auftretenden Problemen & Unsicherheiten,
- jährlich für die Aktualisierung des Qualitätsmanagements (QM)

Die Arbeitsanweisung liegt im QM-Ordner vor, sie liegt nicht am Arbeitsplatz aus, der möglichst papierfrei gehalten werden sollte. Eine Kurzform der Arbeitsanweisung steht für die tägliche Routine bereit (siehe Anhang) diese wird laminiert am Arbeitsplatz ausgelegt.

1.3. Weiterführende Arbeitsanweisungen

Zu beachten sind auch die Arbeitsanweisungen zu:

- Dokumentation
- Phänotypischen Bestätigungstests
- Laborarbeit
- Internen Qualitätskontrollen

2. Vorbereitung / Material

2.1. Material

2.1.1. Allgemeines Arbeitsmaterial

Folgendes Material muss für die Durchführung des Antibiotogramms per Agardiffusion vorliegen:

- Agarplatten (Mueller-Hinton), 1 für jede Testung bei Grampositiven, 2 für jede Testung bei Gramnegativen
- Agarplatten (Mueller-Hinton + Pferdeblut & NAD) für die Austestung von Keimen der Gattung Streptococcus (Streptokokken, aber nicht Enterokokken)
- Sterile Kochsalzlösung zum Ansetzen von Suspensionen
- Einwegösen zum Ansetzen der Suspension
- Sterile Wattetupfer zum Ausstreichen der Suspension
- McFarland-Standard zum Standardisieren der Bakteriensuspension
- Drei 6er-Dispenser, 1 für die Grampositiven, 1 für die Gramnegativen, 1 für die Leitsubstanzen der Gramnegativen
- Antibiotika-Ringe für die Austestung von Enterokokken und Pseudomonaden
- Antibiotika-Kartuschen (siehe 1.2.)

2.1.2. Antibiotika-Kartuschen

Die Dispenser müssen jederzeit mit folgenden Kartuschen bestückt sein:

Slot / Position	Dispenser 01 „Standard G-“	Dispenser 02 „Standard G+“	Dispenser 03 „Leitsubstanzen G-“
01			Piperacillin ¹
02			Ciprofloxacin ¹
03			Ceftazidim ¹
04			
05		Cefoxitin ²	
06		Vancomycin ³	

Hinweise zur Antibiotika-Auswahl

- 1 Das Antibiotikum gehört zu der Leitsubstanzen der Gramnegativen, zur Erkennung von 3MRGN.
- 2 Das Antibiotikum ist Leitsubstanz für die Staphylokokken zur Erkennung von Methicillin-Resistenten *S. aureus* (MRSA).
- 3 Das Antibiotikum ist Leitsubstanz für die Enterokokken, zur Erkennung von Vancomycin-Resistenten Enterokokken (VRE).

2.1.3. Patientenprobe

Die zu untersuchende Patientenprobe muss angezüchtet auf einer Agarplatte vorliegen.

2.2. Lagerung & Vorratshaltung

2.2.1. Lagerung

Dispenser und Antibiotikakartuschen, sowie die Agarplatten müssen im Kühlschrank gelagert werden. Die Kühlschranktemperatur muss kontrolliert werden (siehe Arbeitsanweisung „Interne Qualitätskontrollen“). Die Kochsalzlösung kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.2.2. Vorratshaltung

Insbesondere bei den Antibiotika-Kartuschen, ferner bei Platten und Suspensionslösung ist das Verfallsdatum regelmäßig (vor Gebrauch) zu überprüfen.

2.2.3. Aufbereitung & Materialkontrolle

Dispenser

Der Dispenser funktioniert berührungsfrei und hat bei korrekter Nutzung keinen Kontakt zu kontaminierendem Material, sollte aber dennoch einmal die Woche grundlegend desinfiziert werden (siehe Hygieneplan).

2.2.4. Bestellwesen

Wegen der essentiellen Bedeutung des Antibiogramms ist stets darauf zu achten, dass rechtzeitig nachbestellt wird (siehe Arbeitsanweisung „Bestellwesen“). Vor allem für die Antibiotika-Plättchen und die Antibiotika-Ringe muss immer mindestens 1 Kartusche / Dose vorrätig sein. Wird die letzte Kartusche angebrochen, muss direkt neu bestellt werden.

2.3. Vorbereitung

Für die Untersuchung jeder Patientenprobe muss folgendes Verbrauchsmaterial bereitliegen:

- 2 (bei G-) oder 1 (bei G+) MH-Platte(n) (ggf. MHF)
- 1 Röhrchen mit Kochsalzlösung
- 1 Einwegöse
- 1 Steriler Wattetupfer

2.4. Schutzmaßnahmen

Für allgemeine Schutzmaßnahmen siehe Arbeitsanweisung „Laborarbeit“. In Kürze: Bei der Anzucht / Arbeit mit Infektionserregern muss folgendes beachtet werden:

- Ein Laborkittel ist zu tragen
- Handschuhe sind zu tragen
- Es dürfen keine Ringe, Armbanduhren etc. getragen werden
- Fenster sind geschlossen zu halten
- Es darf nicht gegessen oder getrunken werden

3. Durchführung

3.1. Anlage

3.1.1. Erstellen der Suspension

Beim Erstellen der Suspension wird wie folgt vorgegangen:

- Auf der CLED-Platte wird nach Einzelkolonien des fraglichen Infektionserregers gesucht
- Mit der Öse werden Einzelkolonien von der CLED-Platte abgenommen
- Die Einzelkolonien werden in die Kochsalzlösung eingerührt, bis eine McFarland-Trübung von 0,5 entstanden ist
- Der McFarland-Standard wird mit Hilfe eines Vergleichsstandards kontrolliert

- Beim Einrühren nur leicht Schwenken und vorsichtig mit der Öse verrühren, nicht stark Schütteln
- Kontaminationen durch Finger etc. vermeiden

3.1.2. Anlegen der Platten

Beim Anlegen der der Platte / der Platten wird wie folgt vorgegangen:

- Mit dem sterilen Wattetupfer wird einmalig in die Suspension eingetaucht
- Der Wattetupfer wird einmal kurz am Rand des Röhrchens abgetupft, um „Tropfnasen“ zu vermeiden
- Mit dem Tupfer wird eine MH-Platte in drei verschiedene Richtungen ausgestrichen. Die Platte muss dabei vollständig und lückenfrei mit der Suspension benetzt werden
- Der Vorgang wird bei den Gramnegativen mit einer zweiten MH-Platte wiederholt
- Die MH-Platte wird bei Grampositiven mit dem G+ Dispenser, bei Gramnegativen mit dem G- Dispenser bestückt. Beim Bestücken der Platten wie folgt vorgehen:
 - o Die MH-Platte jeweils offen auf die Arbeitsfläche legen
 - o Den Dispenser über die Platte platzieren, ohne dass die Ränder der Platte die Ränder des Dispensers berühren
 - o Den Hebel kräftig aber kontrolliert nach unten drücken, bis der Hebel auf Widerstand stößt
 - o Den Dispenser entfernen
 - o Überprüfen, ob 6 AB-Plättchen auf der Platte verteilt liegen. Ggf. die Plättchen mit einer Öse noch einmal andrücken
 - o Die Platte vor dem Umdrehen ca. 30 Sekunden liegen lassen, damit die Plättchen sich „festsaugen“ können

3.1.3. Bebrüten der Platten

Beim Bebrüten wie folgt vorgehen:

- Die bestückten Platten dürfen nicht länger als 10 Minuten bei Raumtemperatur liegen, bevor sie in den Brutschrank gelegt werden
- Der Brutschrank wird auf $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ eingestellt (Überprüfung des Brutschrankes, siehe Arbeitsanweisung „Interne Qualitätskontrollen“)
- Die Platte verbleibt 16-20 Stunden bei $36\pm 1^{\circ}\text{C}$

3.2. Ablesung

3.2.1. Ausmessen der Hemmhöfe

Beim Ablesen der Hemmhöfe wird wie folgt vorgegangen:

- Die Platte wird auf Bakterienwachstum und Hemmhöfe überprüft
- Bei gutem Keimwachstum und deutlich abgegrenzten Hemmhöfen werden die Hemmhöfe mittels eines Lineals ausgemessen.
- Hemmhöfe werden nur dort gemessen, wo nach EUCAST-Norm eine Austestung möglich ist

4. Ergebnisinterpretation

4.1. Interpretation der Hemmhöfe

- Die gemessenen Hemmhöfe werden mit den tabellarischen Sollwerten der EUCAST-Norm verglichen.
- Dabei ist erregerspezifisch vorzugehen. Die Grenzwerte für die jeweils vorliegende Erregergruppe ist zu beachten.
- Ist der Hemmhof größer oder gleich als der obere Grenzwert der Tabelle, so wird der Keim als sensibel gegenüber dem Antibiotikum eingestuft.
- Ist der Hemmhof kleiner als der obere Grenzwert, aber größer oder gleich dem unteren Grenzwert, so wird das Antibiotikum als intermediär wirksam eingestuft.
- Ist der Hemmhof kleiner als der untere Grenzwert, so wird der Keim als Resistent gegenüber dem Antibiotikum eingestuft.

4.2. Bestimmung der Sensibilitäten der Standardtherapeutika

Alle Antibiotika die für den Keim als sensibel gemessen wurde sind auch einsetzbar. Ferner müssen Ableitungen nach EUCAST beachtet werden, um die gesamte Bandbreite der wirksamen Antibiotika festzustellen.

4.3. Bestimmung der Resistenzen bei den Leitsubstanzen

Die Klassifikation für Multiresistente ergibt sich nach folgender Tabelle:

Leitsubstanz(en)	Sensibilität	Erregergruppe	Einstufung
Piperacillin, Ceftazidim, Ciprofloxacin	Alle R	Enterobakteriazeen, Acinetobacter, Pseudomonaden	3MRGN
Piperacillin, Ceftazidim, Ciprofloxacin, Meropenem	Nur eines S	Pseudomonaden	3MRGN
Piperacillin, Ceftazidim, Ciprofloxacin, Meropenem	Alle R	Enterobakteriazeen, Acinetobacter, Pseudomonaden	4MRGN
Cefoxitin	R	Staph. aureus	MRSA
Cefoxitin	R	Andere Staphylokokken	MRSE
Vancomycin	R	Enterokokken	VRE

5. Dokumentation und Dokumentenlenkung

5.1. Dokumentation der Standardtherapeutika

Die Ergebnisse werden für den Patienten und für die Keimstatistik dokumentiert. Die Dokumentation ist fünf Jahre lang aufzuheben.

5.2. Dokumentation der Leitsubstanzen

Die Ergebnisse bei den Leitsubstanzen müssen nur dann dokumentiert werden, wenn Resistenzen auftreten. Die Dokumentation ist fünf Jahre lang aufzuheben.

6. Fehlerquellen und Qualitätskontrollen

6.1. Fehlerquellen

Folgende Probleme können beim Agardiffusionstest auftreten:

Erscheinung	Lösung
Der Hemmhof ist nicht rund, sondern oval	Den kleinsten Durchmesser ausmessen
Es gibt doppelte Hemmhöfe (zwei Hemmhöfe ineinander bei einem Antibiotikum)	Die Suspension enthielt 2 Keime, Testung mit Reinkultur wiederholen
Einzelne Kolonien wachsen auch im Hemmhof	Spezielle Beurteilung, siehe EUCAST

6.2. Qualitätskontrollen

Für den Agardiffusionstest werden wöchentlich Qualitätskontrollen durchgeführt (siehe Arbeitsanweisung „interne Qualitätskontrollen“).

7. Anhang

7.1. Literatur / Quellen

- Beyaert, G., Beyaert, I. „Mikrobiologie in der Urologischen Praxis.“
- EUCAST-Norm
- DIAG WISS Laborhandbuch
- Rili-BÄK

7.2. Kontaktadressen / Hilfestellungen

Bei Fragen und Problemen wenden Sie sich an DIAG WISS (info@diagwiss.de)

Arbeits- / Verfahrensanweisung:

Durchführung des Antibiogramms über Agardiffusionstest (ADT) Zusammenfassung zum Auslegen / Aushängen am Arbeitsplatz

1. **Keimsuspension herstellen**
 - a) Mit der Öse Material von Einzelkolonien eines Keimes in Kochsalz lösen bis eine Trübung von 0,5 McFarland erreicht sind. Ggf. mithilfe eines Vergleichsstandards kontrollieren.
 - b) Keim gut einmischen, dabei nur rühren und schwenken, nicht schütteln.
2. **Platte ausstreichen**
 - a) Mit einem Wattetupfer Keimsuspension auf 1 Mueller-Hinton-Platte (MHF für Streptokokken) ausstreichen.
 - b) Platte in drei verschiedene Richtungen ausstreichen, bis die Suspension gleichmäßig verteilt ist. Dabei Tupfer nicht erneut eintauchen.
3. **Antibiotika-Plättchen auf die Platte aufbringen**
 - a) Antibiotika-Plättchen werden entsprechend der Keimgruppe mit dem Dispenser auf die Platte gestempelt oder als Ring aufgelegt.
4. **Platte bebrüten**
 - a) Die beimpften und mit Plättchen beladenen Platten werden so schnell wie möglich in den Brutschrank überführt.
 - b) Platten 16-20h bei $36\pm 1^\circ\text{C}$ bebrüten.
5. **Hemmhöfe messen und interpretieren**
 - a) Die entstandenen Hemmhöfe mit Lineal oder Schablone ausmessen und die Ergebnisse dokumentieren.
 - b) Gemessene Hemmhofgröße mit EUCAST-Zielwerten vergleichen.
 - c) Anhand der Zielwerte Keim für jedes Antibiotikum kategorisieren in Sensibel, Intermediär, Resistent oder nicht austestbar.
6. **Ergebnisse dokumentieren**
 - a) Ergebnisse im Befund und in der Patientendatei dokumentieren.
7. **Ggf. Multiresistenten-Status dokumentieren**
 - a) Resistenzen auf die Leitsubstanzen kontrollieren.
 - b) Bei Resistenzen ist der entsprechende Multiresistenzen-Status zu dokumentieren (3MRGN, 4MRGN, MRSA, VRE).

Bei allen Arbeiten im Mikrobiologie-Labor müssen die notwendigen Schutzmaßnahmen getroffen werden. Zusätzlich darauf achten, Kontaminationen der Suspension und Platte zu vermeiden.