



BD Haemophilus Test Medium Agar (HTM)

VERWENDUNGSZWECK

BD Haemophilus Test Medium Agar (HTM) wird zur Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung bei klinischen Isolaten von *Haemophilus*-Spezies mit Hilfe der Blättchen-Diffusionsmethode verwendet. Diese Methode ist im Approved Standard M2 des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) beschrieben.¹

GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.

Für *Haemophilus influenzae* wurde früher mit 1 % Hämoglobin und 1 % IsoVitalerX angereicherter Mueller-Hinton-Agar (Mueller-Hinton-Schokoladenagar) empfohlen.² Von Jorgensen und Kollegen durchgeführte umfangreiche Studien führten zur Entwicklung von Haemophilus-Testmedium-Agar (HTM).^{3,4} 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 sind im CLSI-Dokument M100 (M2) gegeben, das im CLSI-Dokument M2 enthalten ist. Weitere Einzelheiten sind diesem Dokument zu entnehmen.

BD Haemophilus Test Medium Agar besteht aus Mueller-Hinton-Agar angereichert mit Faktor X (Hämin oder Hämatin), Faktor V (Nikotinamidadenindinukleotid, NAD) und Hefeextrakt.

REAGENZIEN

BD Haemophilus Test Medium Agar (HTM)

Zusammensetzung* pro Liter destilliertem Wasser

Rindfleischextrakt	2,0 g
Säurehydrolysat von Casein	17,5
Stärke	1,5
Agar	17,0
Hefeextrakt	5,0
Hämatin	0,015
Nikotinamidadenindinukleotid (NAD)	0,015

pH 7,3 ± 0,1

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

VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD . Nur für den professionellen Gebrauch. Ⓢ

Agarplatten bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung, Rissen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden. Übermäßige Schrumpfung dieses Mediums als Folge von Austrocknung kann zu falschen Empfindlichkeitsergebnissen führen.

Hinweise zur aseptischen Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des Produkts sind der **ALLGEMEINEN GEBRAUCHSANLEITUNG** zu entnehmen.

AUFBEWAHRUNG UND HALTBARKEIT

Nach Erhalt Platten bis unmittelbar vor dem Gebrauch im Dunkeln bei 2 – 8 °C in der Originalverpackung lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Die Platten können bis zum

Verfallsdatum (s. Kennzeichnung auf der Verpackung) inokuliert und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden.
Platten aus bereits geöffneten Stapeln mit jeweils 10 Platten können bei Lagerung in einem sauberen Bereich bei 2 – 8 °C bis zu einer Woche verwendet werden.

QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER

Für die Qualitätssicherung durch den Anwender sind der CLSI-Standard¹ oder, falls anwendbar, nationale Richtlinien hinzuzuziehen. Grundsätzlich muss das unter **Testverfahren** beschriebene Verfahren eingehalten werden, einschließlich der unter **Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial** erwähnten Referenzstämme.

BD Haemophilus Test Medium Agar (HTM)-Platten und die verwendeten antimikrobiellen Blättchen sollten mindestens zweimal wöchentlich auf korrekte Leistung überprüft werden. Erscheinungsbild des nicht inokulierten Mediums: Hell bernsteinfarben.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BD Haemophilus Test Medium Agar (90 mm **Stacker**-Platten). Mikrobiologisch kontrolliert.

Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

1. Inokulumbouillon in Röhrchen, z.B. **BD Trypticase Soy Broth** (Casein-Soja-Pepton-Bouillon) oder Mueller-Hinton-II-Bouillon (Kationen adjustiert) in Röhrchen zu 5 mL für die Zubereitung eines Standardinokulums und sterile Bouillon oder Salzlösung für die Verdünnung des Inokulums.
2. Bariumsulfat-Vergleichsstandard (0,5 mL 0,048 M BaCl₂ [1,175 % Gew./Vol BaCl₂·2H₂O] bis 99,5 mL von 0,18 M [0,36 N] H₂SO₄ [1 % Vol./Vol.]).
3. Ein photometrisches Gerät zur Einstellung der Trübung der Inokulumsuspension zur Übereinstimmung mit dem 0,5 McFarland Standard.
4. Als Alternative zu den obigen Materialien (1-3) kann auch das **BD Prompt Inoculation System** (volumetrisches Gerät zur Inokulumzubereitung) verwendet werden.^{5,6}
5. Kontrollkulturen – *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, ATCC 49766 und ATCC 10211.
6. Mit spezifischen Mengen antimikrobieller Agenzien imprägnierte Papierblättchen, z.B. **BD Sensi-Disc** Empfindlichkeitstestblättchen.
7. Dispensiergerät, z.B. das **BD Sensi-Disc** 6-Platz Dispensiergerät.
8. Lineal oder anderes Instrument zur Messung der Zonengröße in Millimeter.
9. Ein Inkubator, der eine Atmosphäre mit 5 % CO₂ erzeugt, oder ein anderes Gerät, das eine CO₂-angereicherte Atmosphäre erzeugt.
10. Ein Reagenz zur Durchführung eines β-Lactamase-Schnelltests wie **BD Cefinase**-Blättchen.
11. Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

Probenarten

Dieses Produkt wird zur Empfindlichkeitsprüfung von *Haemophilus*-Reinkulturen verwendet, die aus klinischen Proben isoliert wurden (siehe auch **LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN**).

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 - 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 10⁸ KBE/mL. Bei der Zubereitung dieser Suspension muss mit Vorsicht vorgegangen werden, da höhere Inokulum-Konzentrationen zu

- falschen Empfindlichkeitsergebnissen bei einigen β -Laktam-Antibiotika führen können, insbesondere wenn Beta-Lactamase-produzierende Stämme von *H. influenzae* getestet werden.¹
5. Alternative Methoden der Inokulumzubereitung mit Geräten, welche die direkte Standardisierung der Inokula ohne Anpassung der Trübung erlauben, wie z.B. das **BD Prompt Inoculation System**, wurden für routinemäßige Testzwecke, einschließlich der Überprüfung von *H. influenzae*, als annehmbar befunden.^{5,6}
 6. Innerhalb von 15 min nach Anpassung der Trübung einen sterilen Wattetupfer in das korrekt verdünnte Inokulum tauchen und gegen die obere Innenwand des Röhrchens mehrmals fest hin und her drehen, um überschüssige Flüssigkeit auszudrücken.
 7. Die gesamte Agaroberfläche der **BD Haemophilus Test Medium Agar**-Platte dreimal inokulieren und dabei zwischen den einzelnen Ausstrichen die Platte jeweils um 60° drehen, um eine gleichmäßige Inokulierung zu erreichen.
 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 Vorsichtsmaßnahmen auflegen. Die meisten Antibiotika produzieren größere Hemmzonen bei der Prüfung von *Haemophilus* im Vergleich zu anderen Organismen. Deshalb sollten nicht mehr als vier antimikrobielle Blättchen auf einer 100 mm-Platte platziert werden, und nicht mehr als sechs auf den folgenden Blättchen: 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.
 10. Die Agarplatten innerhalb von 15 min nach dem Auflegen der Blättchen umdrehen und in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten aeroben Atmosphäre 16 – 18 h bei 35 °C inkubieren.
 11. Eine **BD Haemophilus Test Medium Agar**-Platte mit *H. influenzae* ATCC 10211 ausstreichen und zusammen mit den Agarplatten für die Empfindlichkeitsprüfung inkubieren, um sicherzustellen, dass das Medium ausreichend Wachstum ermöglicht.

Ergebnisse

1. Die Agarplatten nach 16 – 18 h Inkubation untersuchen. Es sollte ein konfluierender 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.
3. 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 ist, sollte ignoriert werden. Bei Trimethoprim und den Sulfonamiden können Spuren von 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.

Berechnung und Interpretation der Ergebnisse

Informationen zur Auswertung von Ergebnissen, die mit klinischen *Haemophilus*-Isolaten erzielt wurden, sind dem CLSI-Dokument M100 (M2) zu entnehmen.¹ Die Ergebnisse können je nach Hemmzonendurchmesser als resistent, intermediär oder empfindlich angegeben werden.

Organismen, die im Beta-Lactamasetest positiv sind, sollten ungeachtet des Hemmzonendurchmessers als resistent gegen Ampicillin eingestuft werden. Es ist zu

beachten, dass Ampicillin-resistente Stämme ohne β -Lactamase-Aktivität beschrieben wurden.⁷

resistant strains of *H. influenzae* have been described which lack β -lactamase activity.⁷ Wenn also der Zonendurchmesser eine Ampicillin-Resistenz anzeigt, sollte das Isolat als resistent gegenüber diesem Arzneimittel gemeldet werden, selbst wenn der β -Lactamase-Test negativ ausfällt.

Kontrollkulturen sollten jedes Mal, wenn Empfindlichkeitsprüfungen durchgeführt werden, mitlaufen. Falls eine laut CLSI-Standard M2 zufrieden stellende Testleistung dokumentiert werden kann, können die Kontrolltests wöchentlich durchgeführt werden. Die Tabellen (M100) mit den korrekten Zonendurchmessern befinden sich ebenfalls in diesem Dokument.¹

Hinweis: Ergänzende Informationen zum CLSI-Dokument M2 oder revidierte Versionen mit revidierten Aufstellungen von Antibiotika-Blättchen und Interpretationsrichtlinien werden regelmäßig herausgegeben. Die aktuellen Empfehlungen sollten jeweils den neuesten Tabellen entnommen werden. Das vollständige Normenwerk und die ergänzenden Information sind beim Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA, erhältlich. Telefon: +1-610-688-1100.

LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

A. Reproduzierbarkeitsstudie⁸

Drei Produktionschargen von **BD Haemophilus Test Medium Agar** wurden anhand der Empfindlichkeitsprüfung mit Antibiotika-Blättchen (M2-A4), die zu dieser Zeit vom NCCLS empfohlen wurde, beurteilt.⁹ 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.⁹ In nur sechs Fällen wurden mit einer Charge Hemmzonen erzielt, die im Vergleich mit den anderen beiden Chargen in eine andere Interpretationskategorie fielen. Vier 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 Beta-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.^{10,11}

B. Vergleich mit Mueller-Hinton-Schokoladenagar⁸

Das NCCLS-Blättchenverfahren wurde mit 213 klinischen Isolaten von *H. influenzae* auf HTM-Agar und Mueller-Hinton-Schokoladenagar durchgeführt.^{9,12} Die getesteten Antibiotika waren Ampicillin, Ampicillin-Sulbactam, Amoxicillin-Clavulanat und Chloramphenicol. Dies sind die einzigen Antibiotika, für die Interpretationskriterien für Hemmzonendurchmesser auf Mueller-Hinton-Schokoladenagar definiert wurden.^{13,14} Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt.

BBL Haemophilus Test Medium Agar				
		S	I	R
Mueller-Hinton-Schokoladenagar	S	808	1	2
	I	0	0	0
	R	0	0	41

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

Bei Ampicillin traten zwei schwerwiegende und ein geringfügiger Fehler auf. Bei beiden schwerwiegenden Fehlern war das Ergebnis auf **BD Haemophilus Test Medium Agar**

„resistent“, während das Ergebnis auf Mueller-Hinton-Schokoladenagar „empfindlich“ war. Beide dieser Isolate waren positiv für Beta-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.

C. 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 zu groß und zu schwer zu messen sein. Unsachgemäße Lagerung der Antibiotika-Blättchen kann zum Verlust der Wirksamkeit und falschen Empfindlichkeitsergebnissen führen.

Die *in-vitro*-Empfindlichkeit eines Organismus gegenüber einem spezifischen Antibiotikum bedeutet nicht unbedingt, dass das Antibiotikum auch *in vivo* wirksam ist. Richtlinien zur Auswertung der Ergebnisse sind der einschlägigen Literatur zu entnehmen.^{2,15}

LITERATUR

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Approved standard: M2. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA. Search for latest version at www.clsi.org
2. 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
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Data on file. BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1990. Approved standard: M2-A4. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 4th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
10. 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.
11. 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.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1984. Approved standard: M2-A3. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 3rd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1987. Second Informational Supplement: M100-S2. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

14. 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.
15. Woods, G.L., and J.A. Washington. 1995. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods, p. 1327-1341. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. USA.

VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

BD Haemophilus Test Medium

Best.-Nr. 254058

Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten

WEITERE INFORMATIONEN

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>

<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

Prompt is a trademark of 3M

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. © 2013 BD