



BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs

8840621
2004/09

English: pages 1 – 5 Deutsch: Seiten 7 – 10 Español: páginas 12 – 14
Français : pages 5 – 7 Italiano: pagine 10 – 12

See symbol glossary at end of insert.

Pokyny vám poskytne miestni zástupce spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD representant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Instrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar.

Refer to product label for CE mark availability. / Informace o dostupnosti značky CE najdete na etiketě na výrobku / Produktet er tilgjengelig, hvis CE-mærkingen finnes på etiketten / Toote saadavuse teadaasaamiseks kontrollige CE-märgi olemasolu etiketil / Pour vérifier le marquage CE du produit, se référer à l'étiquette / Siehe Produktetikett für die Verfügbarkeit CE markierter Produkte / Το προϊόν είναι διαθέσιμο εάν η ετικέτα φέρει τη σήμανση CE / Lásd a termék címkéjén levő CE jel meglétét / CE žymės ieškote ant produkto etiketės / O dostopnosti produktu informuje znak CE na etykietce / Prodotto disponibile se l'etichetta reca il marchio CE / Verificar a disponibilidade do produto pela marca CE no rótulo / Pre kontrolu prítomnosti CE značky nahľadnite do etikety výrobku / Ver disponibilidade del marcado CE en la etiqueta del producto / Produkten finns tillgänglig om dess etikett är CE-märkt

INTENDED USE – These discs are used for semi-quantitative *in vitro* susceptibility testing by the agar disc diffusion test procedure of common, rapidly growing and certain fastidious bacterial pathogens. These include the *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Vibrio cholerae* and, by modified procedures, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* and other streptococci. NOTE: Special procedures are required for testing pneumococci, enterococci and methicillin/oxacillin-resistant staphylococci, for performing β -lactamase tests and for screening and confirmatory tests for ESBLs; see the "RESULTS" section.

For zone diameter interpretive criteria adopted in France, refer to the instructions in the French language section of this insert.

SUMMARY AND EXPLANATION – Agar diffusion methods employing dried filter paper discs impregnated with specific concentrations of antimicrobial agents were developed in the 1940s. In order to eliminate or minimize variability in this testing, Bauer et al. developed a standardized procedure in which Mueller Hinton Agar was selected as the test medium.^{1,2}

Various regulatory agencies and standards-writing organizations subsequently published standardized reference procedures based on the Bauer-Kirby method. Among the earliest and most widely accepted of these standardized procedures were those published by the U.S. Food and Drug Administration (FDA)³ and the World Health Organization (WHO).^{4,5} The procedure was adopted as a consensus standard by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) and is periodically updated.^{6,7} The latest NCCLS documents should be consulted for current recommendations.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE – Discs containing a wide variety of antimicrobial agents are applied to the surface of Mueller Hinton Agar plates (or Haemophilus Test Medium Agar for *H. influenzae*, GC II Agar with IsoVital[™] Enrichment for *N. gonorrhoeae* or Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood for *S. pneumoniae*, β -hemolytic and viridans group streptococci) that have been inoculated with pure cultures of clinical isolates. Following incubation, the plates are examined and the zones of inhibition surrounding the discs are measured and compared with established zone size ranges for individual antimicrobial agents in order to determine the agent(s) most suitable for use in antimicrobial therapy.

REAGENTS – Sensi-Disc[™] brand discs are 6-mm discs prepared by impregnating high quality absorbent paper with accurately determined amounts of antibiotic or other chemotherapeutic agents. Discs are clearly marked on both sides with letters and numbers designating the agent and the drug content. (See chart giving concentrations of reactive ingredients.) The drug content of discs is assayed by the methods established by the FDA or by methods similar or comparable to those published in the United States Federal Register.

Sensi-Disc agents are furnished in cartridges containing 50 discs each. The last disc in each cartridge is marked "X" and contains the drug as coded. Cartridges are for use in BBL[™] Sensi-Disc[™] Dispensers; these include a Single Disc Dispenser, an 8-Place Dispenser for 100 mm-style Petri dishes, 6- and 8-Place Self-Tamping Dispensers for 100 mm-style dishes and a Self-Tamping 12-Place Dispenser for 150 mm-style plates.

Precautions: For *in vitro* Diagnostic Use.

Follow directions for use; disc performance depends not only on disc potency, but on use of proper inoculum and control cultures, functional pretested plates, proper storage temperature and other factors.

Observe aseptic techniques and established precautions against microbiological hazards throughout all procedures. Sterilize cultures, containers and other contaminated materials after use.

Storage Instructions:

- On receipt, store discs at -20 – +8°C. If the laboratory refrigerator is frequently opened and closed, and a suitable temperature is not maintained, place there a supply sufficient only for use within a week. Some discs (e.g., β -lactams) should preferably be kept frozen at -20°C.
- Allow containers to come to room temperature before opening. Return unused discs to the refrigerator when application of discs has been completed.
- Use the oldest discs first.
- Discard expired discs. Also, cartridges from which discs have been frequently removed during a week and discs left out overnight in the laboratory should be discarded, or else the discs should be tested for acceptable performance prior to continued use.
- If the discs form incorrect zones with the recommended control organisms, the entire procedure should be checked; faulty zone size may be due to the disc, the inoculation, the preparation or depth (about 4 mm) of medium, or other factors.

The expiration date applies only to discs in intact containers, stored as directed.

SPECIMENS – Specimens should not ordinarily be employed in this test. See Directions, which include preparation of inoculum. If possible, cultures should be derived from specimens obtained from patients prior to the initiation of antimicrobial therapy.

PROCEDURE

Material Provided: Sensi-Disc[™] susceptibility test discs as labeled.

Materials Required But Not Provided: Ancillary culture media, reagents, quality control organisms and laboratory equipment required to perform disc diffusion susceptibility testing by the standardized procedure. Prepare a 0.5 McFarland turbidity standard by adding 0.5 mL of 0.048 M BaCl₂ [1.175% (wt/vol) BaCl₂·2H₂O] to 99.5 mL of 0.18 M [0.36N] H₂SO₄ [1% (vol/vol)]. Verify by using a spectrophotometer with a 1-cm light path and matched cuvette; absorbance at 625 nm should be 0.08 – 0.10.

Directions, Including User Controls:⁵

- Preparation of inoculum with test and control cultures.
 - Perform a Gram stain. Use only pure cultures.
 - Select three to five similar colonies and transfer with inoculation needle or loop into 4 – 5 mL of a suitable broth such as **Trypticase[™]** Soy Broth (or Mueller Hinton Broth for fastidious organisms).
 - Incubate the broth cultures at 35°C for 2 – 6 h, if necessary, to develop a turbidity equivalent to the 0.5 McFarland turbidity standard (approximately 1 to 2 x 10⁸ CFU/mL). Alternatively, make a direct broth or saline suspension of colonies selected from an agar plate incubated overnight (a nonselective medium such as blood agar, or chocolate agar for *H. influenzae* and *N. gonorrhoeae*, should be used). The direct colony suspension method is preferred for *Staphylococcus* spp., *S. pneumoniae* and other streptococci, *Haemophilus* spp. and *N. gonorrhoeae*.⁶
 - Dilute, if required, to obtain turbidity equivalent to the 0.5 McFarland turbidity standard. For diluent, use sterile broth or saline. Alternatively, standardize the inoculum photometrically; to facilitate inoculum adjustment of rapidly growing organisms, the **Prompt[™]** Inoculation System (volumetric inoculum preparation device) may be used.⁸
- Overnight broth cultures should not be used as inoculum.
- Inoculation.
 - Within 15 min, dip a sterile cotton swab into the properly adjusted inoculum and rotate it firmly several times against the upper inside wall of the tube to express excess fluid.
 - Streak the entire agar surface of a Mueller Hinton Agar (or other appropriate agar) plate three times, turning the plate 60° between streakings to obtain even inoculation.
 - The lid may be left ajar for 3 – 5 min, but no more than 15 min, to allow for any surface moisture to be absorbed before applying the drug-impregnated discs.
- Select appropriate discs (such as recommended in reference 7, Tables 1 and 1A of M100-513 [M2]).
- Apply the discs by means of a BBL[™] dispenser, using aseptic precautions. Deposit discs so that the centers are at least 24 mm apart. It is preferable to deposit penicillin and cephalosporin discs so that they are no less than 10 mm from the edge of the Petri dish, and their centers are at least 30 mm apart. Avoid placing such discs adjacent to one another. With *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* and *S. pneumoniae*, use no more than nine discs per 150 mm plate or four discs per 100 mm plate. If discs have been placed on the agar with other than the Self-Tamping Dispensers, press them down with a sterile needle or forceps to make contact with the surface.
- Within 15 min, place the plates agar side up in a 35°C incubator. *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* and other streptococci should be incubated in an atmosphere enriched with 5% CO₂.
- Examine the plates after 16 – 18 h of incubation (20 – 24 h for *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* and other streptococci). A full 24 h of incubation is recommended for *Staphylococcus* spp. to detect methicillin/nafcillin/oxacillin-resistant staphylococci and *Enterococcus* spp. for vancomycin resistance. The diameters of the zones of complete inhibition are measured, as determined by gross visual inspection. Zones are measured to the nearest whole millimeter. For further details in measuring zones of inhibition, consult the reference.⁶ If only isolated colonies grow, the inoculum is too light and the test should be repeated. Zones around discs containing different drugs are not comparable for the purpose of comparing activity of drugs. See the Zone Diameter Interpretive Chart, which gives expected values from testing common aerobes. Zone measurement may be simplified by using a BBL[™] Sensi-Disc[™] Zone Interpretation Set.
- Control tests using prescribed cultures should be included each day susceptibility testing is performed or weekly if satisfactory performance can be documented according to the NCCLS standard.⁶ Typical zone sizes of *E. coli* ATCC[™] 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766, *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. coli* ATCC 35218 (β -lactamase-producing strain), *E. faecalis* ATCC 29212 (for quality control testing of gentamicin 120 μ g and streptomycin 300 μ g discs) and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (for screening and confirmatory tests for ESBLs) are given in the chart (or footnotes) and indicate the correct performance of the entire procedure. *E. faecalis* ATCC 29212 (or 33186) is also recommended for evaluating new lots of Mueller Hinton Agar for low thymine and thymidine content (see footnote t). *H. influenzae* ATCC 10211 is recommended as a useful additional quality control strain to verify the growth promotion properties of Haemophilus Test Medium Agar.⁷

RESULTS^{6,7} – NOTE: Recommended interpretive criteria are based on usual dosage regimens and routes of administration in the U.S.

Compare recorded zone diameters with those in the chart; results with a specific organism may be reported as Resistant, Intermediate or Susceptible. For some organism/antimicrobial combinations, the absence of resistant strains precludes defining any results categories other than "Susceptible." For strains yielding results suggestive of a "nonsusceptible" category, organism identification and antimicrobial susceptibility test results should be confirmed. Subsequently, the isolates should be saved and submitted to a reference laboratory that will confirm results using a NCCLS reference dilution method.

For organisms excluded from the Zone Diameter Interpretive Chart (e.g., *Campylobacter*, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp.), studies are not yet adequate to develop reproducible definitive standards for interpretation of results. If necessary, a dilution method usually will be the most appropriate testing method, which may require submitting the organism to a reference laboratory.⁷

For fecal isolates of *Salmonella* and *Shigella* spp., only ampicillin, a quinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole should be tested and reported routinely. In addition, chloramphenicol and a third generation cephalosporin should be tested and reported for extraintestinal isolates of *Salmonella* spp. For *Salmonella* and *Shigella* spp., aminoglycosides and first and second generation cephalosporins may appear active *in vitro* but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.⁷

Enterobacter, *Citrobacter*, and *Serratia* may develop resistance during prolonged therapy with third generation cephalosporins. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within 3 to 4 days after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.

Non-*Enterobacteriaceae* other than *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. should be tested by the dilution method (see M7-A6⁹).

P. aeruginosa may develop resistance during prolonged therapy with all antibiotics. Isolates that are initially susceptible may become resistant within 3 to 4 days after initiation of therapy and testing of repeat isolates may be warranted.

The susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis can be reliably determined by the disc method, but may require extended incubation up to 24 h before reporting as susceptible.

Enterococci may be resistant to penicillin and ampicillin because of the production of low-affinity, penicillin-binding proteins (PBPs), or the production of β -lactamase. The disc diffusion test can accurately detect isolates with altered PBPs, but it will not reliably detect β -lactamase producing strains. The latter strains are best detected by using a direct β -lactamase test;⁶ e.g., with **Cefinase[™]** nitrocefin discs or chromogenic cephalosporin discs.

For *Enterococcus* spp., cephalosporins, aminoglycosides (except for high level resistance screening), clindamycin and trimethoprim/sulfamethoxazole may appear active *in vitro* but are not effective clinically and isolates should not be reported as susceptible.

Only results of testing with ampicillin, one of the third-generation cephalosporins, chloramphenicol and meropenem should be reported routinely with cerebrospinal fluid isolates of *H. influenzae*.

Amoxicillin/clavulanic acid, azithromycin, clarithromycin, ceftazidime, cefeprozil, loracarbef, cefdinir, cefixime, cefpodoxime and cefuroxime axetil are oral agents that may be used as empiric therapy for respiratory tract infections due to *Haemophilus* spp. The results of susceptibility tests with these antimicrobial agents are often not useful for management of individual patients. However, susceptibility testing of *Haemophilus* spp. with these compounds may be appropriate for surveillance or epidemiologic studies.

Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) are enzymes produced by gram-negative bacilli that arise by mutation in genes for common plasmid-mediated β -lactamases. Strains of *Klebsiella* spp. and *E. coli* that produce ESBLs may be clinically resistant to therapy with penicillins, cephalosporins, or aztreonam, despite apparent *in vitro* susceptibility to some of these agents. Some of these strains will show zones of inhibition below the normal susceptible population but above the standard breakpoints for certain extended-spectrum cephalosporins or aztreonam; such strains should be screened for potential ESBL production by using the ESBL screening breakpoints before reporting results for penicillins, extended-spectrum cephalosporins or aztreonam. Other strains may test intermediate or resistant by standard breakpoints to one or more of these agents. In all strains with ESBLs the zone diameters for one or more of the extended-spectrum cephalosporins or aztreonam should increase in the presence of clavulanic acid as determined in phenotypic confirmatory testing. For all confirmed ESBL-producing strains, the test interpretation should be reported as resistant for all penicillins, cephalosporins, and aztreonam. See footnote t for ESBL screening and confirmatory tests. The decision to perform ESBL screening tests on all urine isolates should be made on an institutional basis, considering prevalence, therapy and infection control issues.⁷

For recognition of methicillin-resistant staphylococci, the oxacillin disc test is more likely to detect resistance than the use of methicillin or nafcillin discs. Therefore, the 1 μ g oxacillin disc should be used to test for methicillin/oxacillin resistance. Any zone surrounding the oxacillin disc should be inspected carefully using transmitted light for small colonies or a light "film" of growth within the zone of inhibition after a full 24 h incubation. Methicillin-resistant staphylococci are often resistant to multiple classes of antimicrobial agents including aminoglycosides, macrolides, clindamycin, phenolics, quinolones, sulfonamides and tetracycline. The observation of multiple resistance should be a clue to the possibility of methicillin-resistance. However, strains of methicillin-resistant *S. aureus* that do not exhibit resistance to other classes of antimicrobial agents have been isolated from both inpatient and outpatient populations. If the disc diffusion test result is in doubt with a possible methicillin-resistant *Staphylococcus* spp., perform additional confirmatory tests as outlined in NCCLS document M7.⁹ Methicillin/oxacillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and coagulase negative staphylococci (MRS) should be reported as resistant (or not reported at all) to all penicillins, cepheps, carbapenems and other β -lactams, such as amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin/sulbactam, ticarcillin/clavulanic acid, piperacillin/tazobactam and imipenem, regardless of the *in vitro* test results with those agents. This is because most cases of documented infections due to methicillin-resistant staphylococci have responded poorly to β -lactam therapy and convincing clinical data have yet to be presented that document clinical efficacy for those agents.⁶ Isolates of staphylococci that are shown to carry the *mecA* gene, or the produce PBP 2a, the *mecA* gene product, should be reported as oxacillin resistant.

Interpretive criteria for coagulase-negative staphylococci correlate with the presence or absence of the gene encoding methicillin resistance (*mecA*) for *S. epidermidis*. These interpretive criteria may overcall resistance for other coagulase-negative staphylococci, e.g., *S. lugdunensis* or *S. saprophyticus*. For serious infections with coagulase-negative staphylococci other than *S. epidermidis*, testing for *mecA* or the protein expressed by *mecA*, the penicillin binding protein 2a (PBP 2a, "also known as" PBP 2') may be appropriate for strains having zone diameters in the intermediate or resistant range. Isolates that are not shown to carry *mecA* or do not produce PBP 2a should be reported as oxacillin-susceptible.

It has been reported that disc susceptibility testing is not an accurate method for the determination of methicillin (oxacillin) susceptibility for coagulase-negative staphylococci (i.e., *S. saprophyticus*).¹⁰ Routine testing of urine isolates of *S. saprophyticus* is not advised, because infections respond to concentrations achieved in urine of antimicrobial agents commonly used to treat acute, uncomplicated urinary tract infections (e.g., nitrofurantoin, trimethoprim/sulfamethoxazole, or a fluoroquinolone).

SIZE: 5.375" W x 19" L
COLOR: Standard Black

A rapid β -lactamase test (e.g., using **Cefinase** discs) may yield clinically relevant information earlier than results of a disc diffusion test with *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* and *Moraxella catarrhalis*; it is the only reliable test for detecting β -lactamase-producing *Enterococcus* spp. A positive β -lactamase test predicts resistance to penicillin, ampicillin and amoxicillin among *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* and *M. catarrhalis* and resistance to penicillin, including acylamino-, carboxy- and ureido-penicillins among staphylococci and enterococci. A negative β -lactamase test does not rule out resistance due to other mechanisms. Do not test members of the *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. and other aerobic gram-negative bacilli because the results may not be predictive of susceptibility to the β -lactams most often used for therapy. Accurate detection of β -lactamase in staphylococci may require induction of the enzyme and incubation of a nitrocefin-based test for up to 1 h. Induction can be easily accomplished by testing the growth from the zone margin surrounding an oxacillin disc test. Care must be exercised to ensure accurate results, including testing of known positive and negative control strains at the time clinical isolates are examined.⁶

Susceptibility testing of penicillins and other β -lactams approved by the U.S. Food and Drug Administration for treatment of Group A and B streptococci is not necessary for clinical purposes and need not be done routinely, since as with vancomycin, resistant strains have not been recognized. However, some strains of *S. agalactiae* may give penicillin-intermediate results. Interpretive criteria are provided for pharmaceutical development, epidemiology or monitoring for emerging resistance. Any strain found to be intermediate or resistant should be referred to a reference laboratory for confirmation.

Disc diffusion tests with ampicillin, penicillin, and rifampin for *Neisseria meningitidis* are unreliable. Minimal inhibitory concentration (MIC) tests should be used for these organisms.⁷

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The test as herein described applies primarily to rapidly growing aerobic pathogens. Fastidious bacteria, other than *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* and other streptococci, should be tested by a dilution method.⁹ Testing of anaerobes requires special procedures.¹¹
- The classifications of Resistant, Intermediate and Susceptible vary only by one millimeter, which is within normal laboratory error. Some cultures may give a borderline zone that varies from day to day or from laboratory to laboratory; such cultures are relatively uncommon.
- For detecting pneumococcal and enterococcal resistance, strictly adhere to NCCLS recommended methods.⁶
- Antimicrobial agents other than those listed in the Chart may be in current use. Susceptibility tests employing these agents should be interpreted on the basis of presence or absence of a definite zone of inhibition and should be considered as only qualitative until such time as interpretive zones have been established. All zone diameters should be recorded.
- ESBL confirmatory testing is only valid when the four discs (cefotaxime, cefotaxime/clavulanic acid, ceftazidime, ceftazidime/clavulanic acid) are used simultaneously. Individual usage of these discs is not recommended by NCCLS.^{6,7}

REFERENCES

- 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.
- Ryan, K.J., F.D. Schoenknecht, and W.M.M. Kirby. 1970. Disc sensitivity testing. *Hospital Practice* 5:91-100.
- Federal Register. 1972. Rules and regulations. Antibiotic susceptibility discs. *Fed. Regist.* 37:20525-20529. Erratum, 38:2756, 1973.
- Ericsson, H.M., and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B. Suppl.* 217:1-90.
- World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. 1977. Technical report series 610. W.H.O., Geneva.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Approved standard M2-A8. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 8th ed. NCCLS, Wayne, Pa.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. M100-S13 (M2). Disk Diffusion Supplemental Tables, NCCLS, Wayne Pa.
- 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.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Approved standard M7-A6. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. NCCLS, Wayne, Pa.
- York, M.K., L. Gibbs, F. Chehab, and G.F. Brooks. 1996. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 34: 249-253.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved standard M11-A5. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, 5th ed. NCCLS, Wayne, Pa.
- Bushby, S.R.M. 1973. Trimethoprim-sulfamethoxazole: in vitro microbiological aspects, p. 10-30. *In* M. Finland and E.H. Kass (ed.), Trimethoprim-sulfamethoxazole: microbiological, pharmacological, and clinical considerations. University of Chicago Press, Chicago.

Zone Diameter Interpretive Chart †												
Antimicrobial Agent	Code	Disc Potency	Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Control Zone Diameter Limits (mm)						
			Resistant	Intermediate ^a	Susceptible ^b	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247 ^c	<i>H. influenzae</i> ATCC 49766 ^c	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 ^d	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 ^e
Amdinocillin ^f <i>Enterobacteriaceae</i>	AMD-10	10 µg	≤15	—	≥16	23 – 29	—	—	—	—	—	—
Amikacin <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci	AN-30	30 µg	≤14	15 – 16	≥17	19 – 26	20 – 26	18 – 26	—	—	—	—
Amoxicillin/Clavulanic Acid ^{g,h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Staphylococcus</i> spp. ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}	AmC-30	20/10 µg	≤13	14 – 17	≥18	18 – 24 ⁱⁱ	28 – 36	—	—	—	—	—
Ampicillin ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> ⁱⁱ and <i>V. cholerae</i> ^m Staphylococci spp. ^{i,iii} <i>Enterococcus</i> spp. ^{n,o,ii} <i>Listeria monocytogenes</i> ^f <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k,p} Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β -hemolytic only) ^{e,i,aaa,ccc}	AM-10	10 µg	≤13	14 – 16	≥17	16 – 22	27 – 35	—	—	15 – 23 ^c	—	30 – 36 ^e
Ampicillin/Sulbactam ^{g,h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> ^q and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}	SAM-20	10/10 µg	≤11	12 – 14 ⁱⁱ	≥15 ⁱⁱ	19 – 24 ⁱⁱ	29 – 37	—	—	—	—	—
Azithromycin <i>Staphylococcus</i> spp. ^r <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{e,r,s}	AZM-15	15 µg	≤13	14 – 17	≥18	—	21 – 26	—	—	14 – 22 ^c	—	19 – 25 ^e
Azlocillin <i>P. aeruginosa</i>	AZ-75	75 µg	≤17	—	≥18	—	—	24 – 30	—	—	—	—
Aztreonam <i>Enterobacteriaceae</i> , ^t <i>P. aeruginosa</i> & <i>Acinetobacter</i> <i>Haemophilus</i> spp. ^c	ATM-30	30 µg	≤15	16 – 21	≥22	28 – 36	—	23 – 29	—	30 – 38 ^c	—	—
Bacitracin ^f <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>	B-10	10 U	≤ 8	9 – 12	≥13	—	12 – 22	—	—	—	—	—
Carbencillin <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>	CB-100	100 µg	≤19 ⁱⁱ	20 – 22 ⁱⁱ	≥23	23 – 29	—	18 – 24	—	—	—	—
Cefaclor ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> ^u and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}	CEC-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	23 – 27	27 – 31	—	—	25 – 31 ^c	—	—
Cefamandole <i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci ^j	MA-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	26 – 32	26 – 34	—	—	—	—	—
Cefazolin <i>Enterobacteriaceae</i> ^u and staphylococci ^j	CZ-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	21 – 27 ⁱⁱ	29 – 35	—	—	—	—	—
Cefdinir ^h <i>Enterobacteriaceae</i> ^{kk} and methicillin-susceptible staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c	CDR-5	5 µg	≤16	17 – 19	≥20	24 – 28	25 – 32	—	—	24 – 31 ^c	—	—
Cefepime ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d Viridans Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,ccc} Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β -hemolytic only) ^{aaa,ccc}	FEP-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	31 – 37 ⁱⁱⁱ	23 – 29	24 – 30	—	25 – 31 ^c	—	37 – 46 ^{d,ii} 28 – 35 ^e
Cefixime ^h <i>Enterobacteriaceae</i> ^v <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d	CFM-5	5 µg	≤15	16 – 18	≥19	23 – 27	—	—	—	25 – 33 ^c	—	37 – 45 ^d
Cefmetazole <i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci ^j <i>N. gonorrhoeae</i> ^d	CMZ-30	30 µg	≤12	13 – 15	≥16	26 – 32	25 – 34	—	—	—	—	31 – 36 ^d
Cefonicid <i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}	CID-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	25 – 29	22 – 28	—	—	30 – 38 ^c	—	—
Cefoperazone <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j	CFP-75	75 µg	≤15	16 – 20	≥21	28 – 34	24 – 33	23 – 29	—	—	—	—
Cefotaxime ^h <i>Enterobacteriaceae</i> , ^{tx} <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d Viridans Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,i,ccc} Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β -hemolytic only) ^{aaa,ccc}	CTX-30	30 µg	≤14	15 – 22 ⁱⁱ	≥23 ⁱⁱ	29 – 35	25 – 31	18 – 22	—	31 – 39 ^c	—	38 – 48 ^d 31 – 39 ^e
Cefotaxime/Clavulanic Acid ^t	CTX/CLA	30/10 µg	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cefotetan <i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci ^j <i>N. gonorrhoeae</i> ^d	CTT-30	30 µg	≤12	13 – 15	≥16	28 – 34	17 – 23	—	—	—	—	30 – 36 ^d
Cefoxitin <i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci ^j <i>N. gonorrhoeae</i> ^d	FOX-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	23 – 29	23 – 29	—	—	—	—	33 – 41 ^d
Cefpodoxime ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> ^{t,u,v} and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d	CPD-10	10 µg	≤17	18 – 20	≥21	23 – 28	19 – 25	—	—	25 – 31 ^c	—	35 – 43 ^d
Cefprozil ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> ^{u,v} and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}	CPR-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	21 – 27	27 – 33	—	—	20 – 27 ^c	—	—
Ceftazidime <i>Enterobacteriaceae</i> , ^t <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d	CAZ-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	25 – 32	16 – 20	22 – 29	—	27 – 35 ^c	—	35 – 43 ^d
Ceftazidime/Clavulanic Acid ^t	CAZ/CLA	30/10 µg	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ceftibuten ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> ^{z,ii} <i>Haemophilus</i> spp. ^c	CTB-30	30 µg	≤17	18 – 20	≥21	27 – 35	—	—	—	29 – 36 ^{c,ii}	—	—
Ceftizoxime ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> , ^{tx} <i>P. aeruginosa</i> , ⁱⁱ <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d	ZOX-30	30 µg	≤14	15 – 19	≥20	30 – 36	27 – 35	12 – 17	—	29 – 39 ^c	—	42 – 51 ^d
Ceftriaxone ^h <i>Enterobacteriaceae</i> , ^{tx} <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d Viridans Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,i,ccc} Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β -hemolytic only) ^{aaa,ccc}	CRO-30	30 µg	≤13	14 – 20 ⁱⁱ	≥21 ⁱⁱ	29 – 35	22 – 28	17 – 23	—	31 – 39 ^c	—	39 – 51 ^d 30 – 35 ^e
Cefuroxime (sodium) ^{h,i} CXM-30 <i>Enterobacteriaceae</i> ^u and staphylococci ^j (parenteral) <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k} <i>N. gonorrhoeae</i> ^d	CXM-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	20 – 26	27 – 35	—	—	28 – 36 ^c	—	33 – 41 ^d
Cephalothin <i>Enterobacteriaceae</i> ^u and staphylococci ^j	CF-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	15 – 21	29 – 37	—	—	—	—	—
Chloramphenicol <i>Enterobacteriaceae</i> , ^r <i>P. aeruginosa</i> , ^r <i>Acinetobacter</i> , ^r staphylococci, ^r enterococci ^{ty} and <i>V. cholerae</i> ^{bb} <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>S. pneumoniae</i> ^{e,r} Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,r}	C-30	30 µg	≤12	13 – 17	≥18	21 – 27	19 – 26	—	—	31 – 40 ^c	—	23 – 27 ^e
Cinoxacin <i>Enterobacteriaceae</i>	CIN-100	100 µg	≤14	15 – 18	≥19	26 – 32	—	—	—	—	—	—

Zone Diameter Interpretive Chart †												
Antimicrobial Agent	Code	Disc Potency	Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Control Zone Diameter Limits (mm)						
			Resistant	Intermediate ^a	Susceptible ^b	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247 ^c	<i>H. influenzae</i> ATCC 49766 ^c	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 ^d	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 ^e
Ciprofloxacin <i>Enterobacteriaceae</i> , ^{ddd} <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci ^{aa} and enterococci <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d	CIP-5	5 µg	≤15	16 – 20	≥21	30 – 40	22 – 30	25 – 33	34 – 42 ^c	—	48 – 58 ^d	—
Clarithromycin <i>Staphylococcus</i> spp. ^r <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{e,f,s}	CLR-15	15 µg	≤13	14 – 17	≥18	—	26 – 32	—	11 – 17 ^c	—	—	25 – 31 ^e
Clindamycin ^r <i>Staphylococcus</i> spp. ⁱⁱ <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^e	CC-2	2 µg	≤14	15 – 20	≥21	—	24 – 30	—	—	—	—	19 – 25 ^e
Colistin ^{f,dd}	CL-10	10 µg	≤ 8	9 – 10	≥11	11 – 15	—	—	—	—	—	—
Doxycycline ^{ee} <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci and enterococci ^{yy}	D-30	30 µg	≤12	13 – 15	≥16	18 – 24	23 – 29	—	—	—	—	—
Enoxacin <i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} and staphylococci ^{aa,ff} <i>N. gonorrhoeae</i> ^{d,cc}	ENX-10	10 µg	≤14	15 – 17	≥18	28 – 36	22 – 28	22 – 28	—	—	43 – 51 ^d	—
Ertapenem ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Staphylococcus</i> spp. ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c	ETP-10	10 µg	≤15	16 – 18	≥19	29 – 36	24 – 31	13 – 21	20 – 28	27 – 33	—	28 – 35
Erythromycin <i>Staphylococcus</i> spp. ^r and enterococci ^{r,yy} <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{e,f,s}	E-15	15 µg	≤13	14 – 22 ⁱⁱ	≥23 ⁱⁱ	—	22 – 30	—	—	—	—	25 – 30 ^e
Fosfomicin ^z <i>E. coli</i> and <i>E. faecalis</i> only	FOS-200	200 µg	≤12	13 – 15	≥16	22 – 30 ⁱⁱ	25 – 33	—	—	—	—	—
Gatifloxacin <i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} and <i>Staphylococcus</i> spp. <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp. and enterococci ² <i>H. influenzae</i> ^c and <i>H. parainfluenzae</i> ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^e	GAT-5	5 µg	≤14	15 – 17	≥18	30 – 37	27 – 33	20 – 28 ^{mm}	33 – 41 ^c	—	45 – 56 ^d	24 – 31 ^e
Gentamicin Testing enterococci for high level resistance ^{n,9,99}	GM-120	120 µg	6	7 – 9 ^{hh}	≥10	—	—	—	—	—	—	—
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci	GM-10	10 µg	≤12	13 – 14	≥15	19 – 26	19 – 27	16 – 21	—	—	—	—
Grepafloxacin <i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} and staphylococci ^{aa} <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^e	GRX-5	5 µg	≤14	15 – 17	≥18	28 – 36	26 – 31	20 – 27 ⁱⁱ	32 – 39 ^c	—	44 – 52 ^d	21 – 28 ^e
Imipenem ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c	IPM-10	10 µg	≤13	14 – 15	≥16	26 – 32	—	20 – 28	—	—	—	—
Kanamycin <i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci	K-30	30 µg	≤13	14 – 17	≥18	17 – 25	19 – 26	—	—	—	—	—
Levofloxacin <i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci ^{aa} and enterococci <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^e	L VX-5	5 µg	≤13	14 – 16	≥17	29 – 37	25 – 30	19 – 26	32 – 40 ^c	—	—	20 – 25 ^e
Linezolid <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^e	LZD-30	30 µg	—	—	≥21	—	25 – 32 ⁱⁱ	—	—	—	—	25 – 34 ^{e,ii}
Lomefloxacin <i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^{aa} <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^{d,cc}	LOM-10	10 µg	≤18	19 – 21	≥22	27 – 33	23 – 29	22 – 28	33 – 41 ^c	—	45 – 54 ^d	—
Loracarbef ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> ^{u,kk} and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}	LOR-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	23 – 29	23 – 31	—	—	26 – 32 ^c	—	—
Meropenem ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j <i>Haemophilus</i> spp. ^c	MEM-10	10 µg	≤13	14 – 15	≥16	28 – 34	29 – 37 ⁱⁱ	27 – 33	—	—	—	—
Methicillin ^{ll}	—	—	—	—	≥20	—	—	—	20 – 28 ^c	—	—	—
Mezlocillin ⁱⁱ <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>	MZ-75	75 µg	≤17	18 – 20	≥21	23 – 29	—	19 – 25	—	—	—	—
Minocycline ^{ee} <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci and enterococci ^{yy}	MI-30	30 µg	≤14	15 – 18	≥19	19 – 25	25 – 30	—	—	—	—	—
Moxalactam <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j	MOX-30	30 µg	≤14	15 – 22	≥23	28 – 35	18 – 24	17 – 25	—	—	—	—
Moxifloxacin <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Staphylococcus</i> spp. <i>H. influenzae</i> ^c and <i>H. parainfluenzae</i> ^c <i>S. pneumoniae</i> ^e	MXF-5	5 µg	≤15	16 – 18	≥19	28 – 35	28 – 35	—	31 – 39 ^c	—	—	25 – 31 ^e
Nafcillin <i>Staphylococcus aureus</i> ^{j,nn}	NF-1	1 µg	≤10	11 – 12	≥13	—	16 – 22	—	—	—	—	—
Nalidixic Acid <i>Enterobacteriaceae</i> ^z	NA-30	30 µg	≤13	14 – 18	≥19	22 – 28	—	—	—	—	—	—
Neomycin ^f	N-30	30 µg	≤12	13 – 16	≥17	17 – 23	18 – 26	—	—	—	—	—
Netilmicin <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci	NET-30	30 µg	≤12	13 – 14	≥15	22 – 30	22 – 31	17 – 23	—	—	—	—
Nitrofurantoin <i>Enterobacteriaceae</i> , staphylococci and enterococci	F/M-300	300 µg	≤14	15 – 16	≥17	20 – 25	18 – 22	—	—	—	—	—
Norfloxacin ⁱⁱ <i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci ^{aa} and enterococci	NOR-10	10 µg	≤12	13 – 16	≥17	28 – 35	17 – 28	22 – 29	—	—	—	—
Novobiocin ^f (Mueller Hinton agar with sheep blood for veterinary use)	NB-30	30 µg	≤17	18 – 21	≥22	—	22 – 31	—	—	—	—	—
Ofloxacin <i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^{aa} <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d <i>S. pneumoniae</i> ^e and other streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^e	OFX-5	5 µg	≤12	13 – 15	≥16	29 – 33	24 – 28	17 – 21	31 – 40 ^c	—	43 – 51 ^d	16 – 21 ^e
Oxacillin <i>Staphylococcus aureus</i> ^{j,nn,oo} Staphylococci, coagulase-negative ^{j,nn,oo} <i>S. pneumoniae</i> (for penicillin G susceptibility) ^{e,h}	OX-1	1 µg	≤10	11 – 12	≥13	—	18 – 24	—	—	—	—	≤12 ^{e,bbb}
Oxolinic Acid ^f <i>Staphylococcus</i> spp. ^{j,pp} <i>Enterococcus</i> spp. ^{n,o} <i>L. monocytogenes</i> ^f <i>N. gonorrhoeae</i> ^{d,qq,ii} Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^{e,i,r,t,aaa,ccc}	OA-2	2 µg	≤10	—	≥11	20 – 24	10 – 13	—	—	—	—	—
Penicillin ^h <i>Staphylococcus</i> spp. ^{j,pp} <i>Enterococcus</i> spp. ^{n,o} <i>L. monocytogenes</i> ^f <i>N. gonorrhoeae</i> ^{d,qq,ii} Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^{e,i,r,t,aaa,ccc}	P-10	10 U	≤28	—	≥29	—	26 – 37	—	—	—	—	26 – 34 ^d
Piperacillin <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>	PIP-100	100 µg	≤17	18 – 20	≥21	24 – 30 ⁹	—	25 – 33	—	—	—	—
Piperacillin/ Tazobactam ⁹ <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> ⁱⁱ <i>Staphylococcus</i> spp. ^{j,ii} and <i>P. aeruginosa</i> ⁱⁱ	TZP-110	100/10 µg	≤17	18 – 20	≥21	24 – 30 ⁹	27 – 36	25 – 33 ⁱⁱ	—	—	—	—
Polymyxin B ^{f,dd}	PB-300	300 U	≤ 8	9 – 11	≥12	12 – 16	—	—	—	—	—	—
Quinupristin/Dalfopristin SYN-15 4.5/10.5 µg <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus faecium</i> and <i>S. pyogenes</i> ^e only	SYN-15	4.5/10.5 µg	≤15	16 – 18	≥19	—	21 – 28 ⁱⁱ	—	—	—	—	19 – 24 ^{e,ii,cc}
Rifampin <i>Staphylococcus</i> spp. ^{ss} and <i>Enterococcus</i> spp. ^{yy} <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>S. pneumoniae</i> ^{e,ss}	RA-5	5 µg	≤16	17 – 19	≥20	8 – 10	26 – 34	—	22 – 30 ^c	—	—	25 – 30 ^e
Sparfloxacin <i>Staphylococcus</i> spp. ^{aa} <i>S. pneumoniae</i> ^e	SPX-5	5 µg	≤15	16 – 18	≥19	30 – 38	27 – 33	21 – 29 ⁱⁱ	—	—	—	21 – 27 ^e
Spectinomycin <i>N. gonorrhoeae</i> ^d	SPT-100	100 µg	≤14	15 – 17 ^w	≥18	—	—	—	—	—	—	23 – 29 ^d
Streptomycin Testing enterococci for high level resistance ^{n,9,99}	S-300	300 µg	6	7 – 9 ^{hh}	≥10	—	—	—	—	—	—	—
<i>Enterobacteriaceae</i>	S-10	10 µg	≤11	12 – 14	≥15	12 – 20	14 – 22	—	—	—	—	—
Sulfisoxazole ^{tt} <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci and <i>V. cholerae</i> ^{tn}	G-.25	250 µg	≤12	13 – 16	≥17	15 – 23	23 – 34	—	—	—	—	—
Tetracycline ^{ee} <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci, enterococci ^{yy} and <i>V. cholerae</i> ^{tn} <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^{d,uu} <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^e	Te-30	30 µg	≤14	15 – 18	≥19	18 – 25	24 – 30	—	14 – 22 ^c	—	30 – 42 ^d	27 – 31 ^e
Ticarcillin <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>	TIC-75	75 µg	≤14	15 – 19	≥20	24 – 30	—	21 – 27 ⁱⁱ	—	—	—	—
Ticarcillin/ Clavulanic Acid ⁹ <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Staphylococcus</i> spp. ^j	TIM-85	75/10 µg	≤14	15 – 19	≥20	24 – 30 ^{9,ii}	29 – 37	20 – 28	—	—	—	—
Tobramycin <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci	NN-10	10 µg	≤12	13 – 14	≥15	18 – 26	19 – 29	19 – 25	—	—	—	—
Trimethoprim <i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci	TMP-5	5 µg	≤10	11 – 15	≥16	21 – 28	19 – 26	—	—	—	—	—
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole ^{tt} <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci and <i>V. cholerae</i> ^{tn} <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>S. pneumoniae</i> ^e	SXT	1.25 µg 23.75 µg	≤10	11 – 15	≥16	23 – 29 ⁱⁱ	24 – 32	—	24 – 32 ^c	—	—	20 – 28 ^e
Trovafloxacin <i>Haemophilus</i> spp. ^c <i>N. gonorrhoeae</i> ^d <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^e	TVA-10	10 µg	≤13 ^f	14 – 16 ^f	≥17 ^f	29 – 36	29 – 35	21 – 27	32 – 39 ^c	—	42 – 55 ^d	25 – 32 ^e

aaa Strains of β -hemolytic streptococci with ampicillin, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone or penicillin zone diameters of less than 24 mm have not been observed; submit such strains to a reference laboratory.

bbb Deterioration in oxacillin disc content is best assessed with *S. aureus* ATCC 25293, with an acceptable zone diameter of 18 - 24 mm.

ccc For ampicillin, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone and penicillin, **Streptococci, β -hemolytic only** includes the large-colony-forming pyogenic strains of streptococci with Group A (*S. pyogenes*), C or G antigens and strains with Group B (*S. agalactiae*) antigen. For cefepime, cefotaxime and ceftriaxone, **Viridans Streptococci** includes small-colony-forming β -hemolytic strains with Group A, C, F or G antigens (*S. anginosus*, previously termed *S. milleri*) as well as *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. mutans* and *S. bovis*.

ddd Fluoroquinolone-susceptible strains of *Salmonella* that test resistant to nalidixic acid may be associated with clinical failure or delayed response in fluoroquinolone-treated patients with extraintestinal salmonellosis. Testing of extraintestinal *Salmonella* isolates for nalidixic acid resistance may be considered.

BD Disques Sensi-Disc BBL pour antibiogramme

Français

APPLICATION – Ces disques sont utilisés pour une évaluation semi-quantitative *in vitro* de la sensibilité aux antibiotiques des agents pathogènes bactériens courants à croissance rapide ainsi que de certaines espèces exigeantes, par un test de diffusion de disques en gélose. Les microorganismes concernés incluent : les *Enterobacteriaceae*, les genres *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Vibrio cholerae* et, avec des procédures modifiées, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* et d'autres streptocoques. **REMARQUE** : Des procédures particulières sont nécessaires pour tester les pneumocoques, les entérocoques et les staphylocoques résistants à la méthicilline/oxacilline et pour réaliser des tests des β -lactamases et des tests de dépistage et de confirmation pour les ESBL ; voir la section « RÉSULTATS ».

Pour connaître les critères d'interprétation de diamètre de zone en vigueur en France, consulter les instructions dans la section en français de cette notice.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION – Les méthodes de diffusion en gélose utilisant des disques en papier filtre séchés contenant des concentrations déterminées en agents antimicrobiens ont été mises au point au cours des années 40. Afin d'éliminer ou de minimiser la variabilité inhérente à ce type de test, Bauer et al. ont mis au point une procédure standardisée dans laquelle la gélose Mueller Hinton était le milieu choisi pour le test.^{1,2}

Divers organismes de réglementation et de rédaction des normes ont ensuite publié des procédures standardisées de référence en se basant sur la méthode Bauer-Kirby. Les normes de la *Food and Drug Administration* (FDA)³ américaine et de l'Organisation mondiale de la santé (OMS)^{4,5} figurent parmi les procédures standardisées les plus anciennes et les plus suivies. La procédure a été adoptée comme norme consensuelle par la *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) et fait l'objet de mises à jour périodiques.^{6,7} Il est recommandé de se reporter aux documents les plus récents du NCCLS pour consulter les recommandations actuelles.

PRINCIPES DE LA MÉTHODE – Des disques contenant toute une gamme d'agents antimicrobiens sont déposés sur la surface de la gélose Mueller Hinton (ou de la gélose du test d'identification d'*Haemophilus* pour *H. influenzae*, de la gélose GC II enrichie d'IsoVitaléX pour *N. gonorrhoeae* ou de la gélose Mueller Hinton avec 5 % de sang de mouton pour *S. pneumoniae*, les streptocoques β -hémolytiques et du groupe viridans) dans des boîtes de Pétri ensemencées avec des cultures pures d'isolats cliniques. Après incubation, les boîtes de Pétri sont examinées et les zones d'inhibition entourant les disques sont mesurées et comparées aux gammes de taille de zone établies pour les différents agents antimicrobiens afin de déterminer l'agent ou les agents les plus adéquats pour le traitement antimicrobien.

RÉACTIFS – Les disques Sensi-Disc sont des disques de 6 mm fabriqués à partir de papier absorbant de haute qualité imprégné d'antibiotiques ou d'autres agents chimiothérapeutiques en quantités déterminées de manière précise. Les disques sont clairement identifiés des deux côtés par des lettres et des chiffres désignant l'agent et sa concentration. (Voir le tableau des concentrations des composants actifs.) La teneur en agent des disques est mesurée par les méthodes définies par la FDA ou par des méthodes similaires ou comparables à celles publiées dans le *Federal Register* américain.

Les agents Sensi-Disc sont fournis en cartouches de 50 disques chacune. Un « X » sur le dernier disque de chaque cartouche indique que celui-ci contient le médicament codé. Les cartouches doivent être utilisées dans les distributeurs Sensi-Disc BBL. Il existe plusieurs modèles de distributeurs : un distributeur de disque unique, un distributeur de 8 disques pour les boîtes de Pétri 100 mm, des distributeurs auto-applicateurs de 6 et 8 disques pour les boîtes 100 mm, un distributeur auto-applicateur de 12 disques pour les boîtes 150 mm.

Précautions : pour le diagnostic *in vitro*.

Suivre le mode d'emploi ; les performances des disques dépendent non seulement de l'activité des disques, mais également de l'utilisation de cultures de contrôle et d'échantillons adéquats, de boîtes de Pétri fonctionnelles pré-testées, d'une température de stockage adéquate et d'autres facteurs.

Toujours utiliser des techniques aseptiques et prendre les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques. Après usage, stériliser les cultures, les récipients et tout le matériel contaminé.

Instructions pour la conservation :

- Dès réception, conserver les disques entre -20 et +8 °C. Si le réfrigérateur du laboratoire est fréquemment ouvert et que la température préconisée n'est pas assurée, n'y placer que la quantité de disques suffisante pour une semaine. Certains disques (p. ex. β -lactamines) doivent être conservés de préférence au congélateur, à -20 °C.
- Laisser les cartouches se réchauffer jusqu'à atteindre la température ambiante avant de les ouvrir. Remettre les disques inutilisés au réfrigérateur une fois la pose des disques terminée.
- Utiliser les disques les moins récents en premier.
- Jeter les disques dont la date de péremption est dépassée. Jeter également les cartouches dont on a fréquemment prélevé les disques durant la semaine. Jeter tout disque laissé à température ambiante pendant toute une nuit, ou en vérifier le niveau acceptable de performance avant de continuer à l'utiliser.
- Si les zones d'inhibition formées par les disques avec les microorganismes de contrôle conseillés ne sont pas conformes, la procédure doit être vérifiée dans sa totalité ; cette erreur peut être due au disque, à l'ensemencement, à la préparation ou à la profondeur (environ 4 mm) du milieu, ou encore à d'autres facteurs.

La date de péremption s'applique uniquement aux disques contenus dans des cartouches intactes conservées conformément aux instructions.

ÉCHANTILLONS – Normalement, ce test ne doit pas être appliqué directement à des échantillons. Voir la rubrique Instructions pour la préparation de l'inoculum. Dans la mesure du possible, les cultures doivent être préparées à partir d'échantillons prélevés avant le début de tout traitement antibiotique.

PROCÉDURE

Matériel fourni : Disques Sensi-Disc pour antibiogrammes, comme indiqué sur l'étiquette.

Matériel requis mais non fourni : Milieux de culture auxiliaires, réactifs, microorganismes de contrôle de qualité et matériel de laboratoire nécessaires pour réaliser des antibiogrammes par la méthode de diffusion de disques en gélose selon la procédure standardisée. Préparer un standard de turbidité McFarland 0,5 en ajoutant 0,5 mL de BaCl₂ 0,048 M [1,175 % (poids/vol.) BaCl₂•2H₂O] à 99,5 mL de H₂SO₄ [1 % (vol./vol.)] 0,18 M [0,36 N]. Vérifier à l'aide d'un spectrophotomètre de 1 cm de raie spectrale et de la cuvette correspondante ; l'absorption à 625 nm doit être comprise entre 0,08 et 0,10.

Instructions, y compris les contrôles réalisés par l'utilisateur :⁶

- Préparation de l'inoculum avec les cultures de contrôle et les cultures de l'échantillon à analyser.
 - Faire une coloration de Gram. Utiliser seulement des cultures pures.
 - Sélectionner de trois à cinq colonies semblables et les transférer avec un ensemencement (fil droit ou anse) dans 4 – 5 mL de bouillon adéquat, comme du bouillon de *Trypticase soja* (ou de Mueller Hinton pour les microorganismes exigeants).
 - Incuber les cultures en bouillon à 35 °C pendant 2 à 6 h si nécessaire, jusqu'à obtenir une turbidité équivalente à un standard de turbidité McFarland 0,5 (environ 1 à 2 x 10⁸ UFC/mL). Il est également possible de préparer directement une suspension à base de bouillon ou de sérum physiologique des colonies prélevées sur une gélose en boîte de Pétri après une nuit d'incubation (utiliser un milieu non sélectif comme une gélose au sang, ou une gélose au chocolat pour *H. influenzae* et *N. gonorrhoeae*). La méthode de préparation d'une suspension directe de colonies est préférable pour les espèces de *Staphylococcus*, *S. pneumoniae* et les autres streptocoques, les espèces d'*Haemophilus* et *N. gonorrhoeae*.⁵
 - Diluer, si nécessaire, pour obtenir une turbidité équivalente à un standard de turbidité McFarland 0,5. Comme diluant, utiliser du bouillon ou du sérum physiologique stérile. On peut également standardiser l'inoculum par photométrie ; pour faciliter cette opération avec les microorganismes à croissance rapide, il est possible d'utiliser le système d'ensemencement **Prompt** (système de préparation volumétrique de l'inoculum).⁸
- Les cultures en bouillon incubées pendant la nuit ne doivent pas être utilisées comme source d'inoculum.
- Ensemencement.
 - Dans les 15 mn qui suivent la préparation, tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum correctement dilué et le faire tourner plusieurs fois en le pressant fermement contre la paroi interne du haut du tube pour en extraire l'excès de bouillon.
 - Inoculer trois fois toute la surface d'une gélose Mueller Hinton (ou d'une autre gélose adéquate) en boîte de Pétri, en tournant chaque fois la boîte de 60° de façon à assurer un ensemencement uniforme.
 - Le couvercle de la boîte peut être laissé ouvert pendant 3 – 5 min, sans dépasser 15 min, pour que toute humidité présente en surface soit résorbée avant la pose des disques imprégnés d'agents antibiotiques.
- Sélectionner les disques appropriés (comme recommandé dans la référence 7, tableaux 1 et 1A de M100-S13 [M2]).
- Déposer les disques avec un distributeur BBL en respectant les précautions d'asepsie habituelles. Placer les disques de telle sorte que leurs centres soient distants d'au moins 24 mm. Il est préférable de déposer les disques de pénicilline et de céphalosporine à une distance d'au moins 10 mm du bord de la boîte de Pétri et de telle sorte que leurs centres soient distants d'au moins 30 mm. Éviter de disposer ces disques l'un à côté de l'autre. Avec les espèces *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* et *S. pneumoniae*, ne pas utiliser plus de neuf disques par boîte de 150 mm et quatre disques par boîte de 100 mm. Si les disques sont déposés sur la gélose sans utiliser un distributeur auto-applicateur, appuyer sur les disques avec une aiguille ou une pince stérile pour assurer le contact avec la surface de la gélose.
- Dans les 15 min qui suivent, placer les boîtes de Pétri avec le côté gélose tourné vers le haut dans un incubateur à 35 °C. Les espèces d'*Haemophilus*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* et les autres streptocoques doivent être incubés dans une atmosphère enrichie avec 5 % de CO₂.
- Examiner les boîtes de Pétri après 16 à 18 h d'incubation (20 à 24 h pour *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* et les autres streptocoques). Une incubation de 24 h complètes est recommandée pour les espèces de *Staphylococcus* afin de mettre en évidence les staphylocoques résistants à la méthicilline/naftilline/oxacilline et pour les espèces d'*Enterococcus* afin de mettre en évidence les entérocoques résistants à la vancomycine. Les diamètres des zones d'inhibition totale sont mesurés sur la base d'une inspection visuelle. Les mesures sont arrondies au millimètre le plus proche. Pour plus d'informations sur la mesure des zones d'inhibition, se reporter à la référence.⁶ Si l'on observe uniquement la croissance de colonies isolées, l'inoculum n'est pas assez dense et le test doit être répété. Les zones situées autour des disques contenant différents agents antimicrobiens ne doivent pas être utilisées à des fins de comparaison de l'activité de ces agents. Consulter le tableau d'interprétation du diamètre des zones pour obtenir les valeurs attendues pour les aérobie courants. La mesure des zones peut être simplifiée grâce à l'utilisation du calibre d'interprétation de zones Sensi-Disc BBL.
- Des tests de contrôle utilisant les cultures prescrites doivent être inclus chaque jour où un antibiogramme est réalisé, ou une fois par semaine si les performances sont satisfaisantes, conformément à la norme NCCLS.⁹ Les tailles typiques des zones pour *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766, *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. coli* ATCC 35218 (souche productrice de β -lactamase), *E. faecalis* ATCC 29212 (pour des tests de contrôle de qualité des disques de gentamycine 120 µg et streptomycine 300 µg) et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (pour les tests de dépistage et de confirmation des ESBL) sont données dans le tableau (ou les notes en bas de page) ; lorsque ces valeurs sont observées, elles témoignent d'une performance satisfaisante de l'ensemble de la procédure. En outre, la souche *E. faecalis* ATCC 29212 (ou 33186) est recommandée pour déterminer si des lots neufs de gélose Mueller Hinton ont des teneurs suffisamment faibles en thymine et thymidine (voir note tt en bas de page). La souche *H. influenzae* ATCC 10211 est recommandée comme contrôle de qualité supplémentaire pour vérifier les propriétés de facteur de croissance de la gélose pour Test d'identification d'*Haemophilus*.⁷

RÉSULTATS^{6,7} – **REMARQUE** : Les critères d'interprétation recommandés sont basés sur les schémas posologiques et les voies d'administration habituelles aux États-Unis.

Comparer les diamètres des zones observés à ceux donnés dans le tableau ; pour un microorganisme donné, trois classifications sont possibles : Résistant, Intermédiaire et Sensible. Pour certaines combinaisons d'antimicrobiens et de microorganismes, l'absence de souches résistantes empêche de définir des classes autres que « sensible ». Pour les souches donnant des résultats suggérant une classe « non sensible », vérifier les résultats des tests d'identification du microorganisme et de sensibilité aux antibiotiques. En cas de confirmation, l'isolat doit être préservé et envoyé à un laboratoire de référence qui confirmera les résultats en utilisant une méthode de dilution de référence NCCLS.

Pour les microorganismes non compris dans le tableau d'interprétation des diamètres de zone (p. ex., *Campylobacter* et les espèces de *Corynebacterium* et de *Bacillus*), les études ne permettent pas pour le moment d'obtenir des normes définitives reproductibles pour l'interprétation des résultats. Si elle est nécessaire, une méthode de dilution s'avérera en général la méthode de test la mieux appropriée, ce qui peut nécessiter d'envoyer le microorganisme à un laboratoire de référence.⁷

Pour les isolats fécaux d'espèces de *Salmonella* et *Shigella*, seuls l'ampicilline, une quinolone et le triméthoprime/sulfaméthoxazole doivent être testés et rapportés en routine. En outre, il faut tester le chloramphénicol et une céphalosporine de troisième génération pour les isolats extraintestinaux d'espèces de *Salmonella*. Pour les espèces de *Salmonella* et *Shigella*, des aminoglycosides et des céphalosporines de première et deuxième générations peuvent s'avérer actifs *in vitro*, mais ils n'ont aucun effet clinique et les isolats ne doivent donc pas être rapportés comme sensibles.⁷

Enterobacter, *Citrobacter*, et *Serratia* peuvent développer une résistance au cours d'un traitement prolongé avec des céphalosporines de troisième génération. C'est pourquoi les isolats qui sont initialement sensibles peuvent devenir résistants au bout de 3 à 4 jours de traitement. Répéter les tests sur des isolats peut s'avérer judicieux.

Les non *Enterobacteriaceae* autres que *P. aeruginosa* et les espèces d'*Acinetobacter* doivent être testées par la méthode de la dilution (voir M7-A6⁹).

P. aeruginosa peut devenir résistante à la suite d'un traitement prolongé avec tous les antibiotiques. Les isolats initialement sensibles peuvent devenir résistants au bout de 3 à 4 jours de traitement et il peut s'avérer judicieux de répéter les tests sur plusieurs isolats.

La sensibilité des *Pseudomonas aeruginosa* isolés à partir d'échantillons prélevés sur des patients souffrant de mucoviscidose peut être évaluée avec fiabilité par la méthode des disques, mais cette méthode peut exiger une durée d'incubation allant jusqu'à 24 h avant de pouvoir rapporter un isolat comme sensible.

Les entérocoques peuvent être résistants à la pénicilline et à l'ampicilline du fait de la production de protéines de faible affinité se liant à la pénicilline (PLP) ou de la production de β -lactamase. La procédure par diffusion de disques en gélose peut détecter avec précision les isolats qui ont des PLP altérées, mais ne pourra pas détecter avec fiabilité les souches qui produisent un β -lactamase. La meilleure méthode pour détecter ces dernières souches consiste à utiliser un test direct des β -lactamases ;⁶ par exemple, des disques **Cefinase** à nitrocéfine ou des disques à céphalosporines chromogènes.

Pour les espèces d'*Enterococcus*, les céphalosporines, les aminoglycosides (sauf pour des tests de dépistage de la résistance de haut niveau), la clindamycine et le triméthoprime/sulfaméthoxazole peuvent s'avérer actifs *in vitro*, mais sont sans effet clinique et, par conséquent, les isolats ne doivent pas être rapportés comme sensibles.

Seuls les résultats des tests pour l'ampicilline, une céphalosporine de troisième génération, le chloramphénicol et le minocycline doivent être rapportés en routine pour tous les isolats de *H. influenzae* issus de prélèvements de liquide céphalo-rachidien.

L'amoxicilline/l'acide clavulanique, l'azithromycine, la clarithromycine, le céfclor, le céfprozil, le loracarbef, le cefdinir, la céfixime, la céfepodoxime et le céfuroxime axétil sont des agents oraux qui peuvent être utilisés pour le traitement empirique d'infections des voies respiratoires dues à des espèces d'*Haemophilus*. Les résultats des antibiogrammes pour ces agents antimicrobiens n'ont en général pas d'utilité pour la prise en charge des patients individuels. Cependant, les antibiogrammes des espèces d'*Haemophilus* pour ces agents peuvent être utiles au suivi ou aux études épidémiologiques.

Les β -lactamases à spectre élargi (ESBL) sont des enzymes produits par les bacilles à Gram négatif, qui proviennent de la mutation des gènes contrôlant les β -lactamases communes à médiation plasmidique. Des souches d'espèces de *Klebsiella* et d'*E. coli* productrices d'ESBL peuvent s'avérer cliniquement résistantes au traitement par les pénicillines, les céphalosporines ou l'aztréonam malgré leur

sensibilité apparente *in vitro* à certains de ces agents. Certaines de ces souches présenteront une zone d'inhibition plus réduite que celle de la population normale sensible, mais plus étendue que les valeurs seuils standard de certaines céphalosporines à spectre étendu ou de l'aztréonam ; la mise en évidence de la production d'ESBL par de telles souches peut être réalisée au moyen de seuils de dépistage appropriés avant de rapporter les résultats pour les pénicillines, les céphalosporines à spectre élargi ou l'aztréonam. Selon les valeurs seuils standard, d'autres souches peuvent apparaître intermédiaires ou résistantes à un ou plusieurs de ces agents. Pour toutes les souches à ESBL, le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant certaines céphalosporines à spectre élargi ou l'aztréonam devrait augmenter en présence d'acide clavulanique comme le montre le test de confirmation phénotypique. Les souches productrices d'ESBL devraient donner des résultats de test interprétés comme résistants pour toutes les pénicillines, céphalosporines et l'aztréonam. Voir la note en bas de page 1 pour les tests de dépistage et de confirmation des ESBL. La décision d'effectuer des tests de dépistage sur tous les isolats d'urine doit être prise au niveau de l'établissement, en considérant la prévalence, le traitement et la prévention de l'infection.⁷

Pour la détection des staphylocoques résistants à la méthicilline, les disques d'oxacilline sont plus susceptibles de déceler la résistance que les disques de méthicilline ou de nafcilline. Par conséquent, des disques de 1 µg d'oxacilline doivent être utilisés pour tester la résistance à la méthicilline/oxacilline. Toute zone entourant les disques d'oxacilline doit être examinée soigneusement par transparence à la lumière à la recherche de petites colonies ou d'un mince « film » de croissance dans la zone d'inhibition après 24 h complètes d'incubation. La plupart des staphylocoques résistants à la méthicilline sont aussi en général résistants à plusieurs classes d'agents antimicrobiens, notamment les aminoglycosides, les macrolides, la clindamycine, les pénicols, les quinolones, les sulfonamides et la tétracycline. L'observation d'une polyrésistance est une indication d'une possible résistance à la méthicilline. Cependant, des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline ne montrant aucune résistance à d'autres classes d'agents antimicrobiens ont été isolées chez des populations de patients hospitalisés ou ambulatoires. Si le résultat du test de diffusion de disques en gélose est douteux pour des espèces de *Staphylococcus* qui pourraient être résistantes à la méthicilline, réaliser des tests de vérification supplémentaires tels que décrits dans le document M7 du NCCLS.⁹ *S. aureus* résistant à la méthicilline/oxacilline (MRSA) et les staphylocoques à coagulase négative résistants à la méthicilline/oxacilline (MRS) devraient être désignés résistants à toutes les pénicillines (ou ne pas être rapportés du tout), tous les céphèmes, tous les carbapénems et toutes les autres β-lactamines, comme l'amoxicilline/l'acide clavulanique, l'ampicilline/le sulbactam, la ticarcilline/l'acide clavulanique, la pipéracilline/le tazobactam et l'imipénème, sans considérer les résultats *in vitro* des tests avec ces agents. Il faut les désigner ainsi parce que la plupart des infections confirmées causées par les staphylocoques résistants à la méthicilline sont peu sensibles au traitement par une β-lactamine et qu'il n'existe pour le moment aucune donnée clinique convaincante démontrant l'efficacité clinique de ces agents.⁶ Les isolats de staphylocoques qui portent le gène *mecA* ou le produit BPP 2a du gène *mecA*, doivent être rapportés comme résistants à l'oxacilline.

Les critères d'interprétation pour les staphylocoques à coagulase négative sont corrélatifs de la présence ou de l'absence du gène codant la résistance à la méthicilline (*mecA*) pour *S. epidermidis*. Ces critères d'interprétation peuvent faire rapporter à tort une résistance pour d'autres staphylocoques à coagulase négative, comme *S. lugdunensis* ou *S. saprophyticus*. Pour des infections graves à staphylocoques à coagulase négative autres que *S. epidermidis*, le test de *mecA* ou de la protéine exprimée par *mecA*, la protéine se liant à la pénicilline 2a (BPP 2a, « également connue comme » PBP 2') peut être approprié pour les souches dont les diamètres de zone se situent dans la gamme intermédiaire ou résistante. Les isolats qui ne portent pas le gène *mecA* ou ne produisent pas BPP 2a doivent être rapportés comme sensibles à l'oxacilline.

On a rapporté que les tests de diffusion de disques en gélose ne constituaient pas une méthode fiable de détermination de la sensibilité à la méthicilline (oxacilline) des staphylocoques à coagulase négative (c'est-à-dire *S. saprophyticus*).¹⁰ Il n'est pas recommandé d'effectuer des tests de routine de *S. saprophyticus* sur des isolats urinaires parce que les infections sont sensibles aux concentrations urinaires d'agents antimicrobiens couramment utilisés pour traiter les infections urinaires aiguës non compliquées (p. ex. nitrofurantoïne, triméthoprime/sulfaméthoxazole ou une fluoroquinolone).

Un test rapide de la β-lactamase (p. ex. en utilisant des disques Cefinase) peut fournir des résultats cliniquement importants avant que les résultats du test de diffusion de disques ne soient obtenus pour les espèces d'*Haemophilus*, *N. gonorrhoeae* et *Moraxella catarrhalis* ; c'est le seul test fiable pour la détection des entérocoques producteurs de β-lactamase. Un résultat positif pour les β-lactamines prédit une résistance à la pénicilline, l'ampicilline et l'amoxicilline chez les espèces d'*Haemophilus*, *N. gonorrhoeae* et *M. catarrhalis*, et une résistance à la pénicilline, y compris les acylamino-, carboxy- et uréido-pénicillines, chez les staphylocoques et les entérocoques. Un résultat négatif pour la β-lactamase n'élimine pas la possibilité d'une résistance due à d'autres mécanismes. Ne pas tester les espèces des genres *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, ni les autres bacilles aérobies à Gram négatif, car les résultats peuvent ne pas prédire leur sensibilité aux β-lactamines les plus souvent utilisées en traitement. Une mise en évidence exacte des β-lactamases chez les staphylocoques peut nécessiter l'induction de leur enzyme et l'incubation jusqu'à 1 h d'un test basé sur la nitrocéfine. L'induction peut être facilement accomplie en testant la croissance dans la zone marginale entourant le disque d'oxacilline. Procéder avec soin pour garantir l'exactitude des résultats ; ainsi, des souches de contrôle positives et négatives connues doivent être testées en même temps que les isolats cliniques.⁶

Les tests de sensibilité aux pénicillines et autres β-lactamines approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) américaine pour le traitement des streptocoques des groupes A et B n'ont pas d'utilité clinique et sont donc superflus en routine puisque, comme pour la vancomycine, aucune souche résistante n'a été identifiée. Certaines souches de *S. agalactiae* peuvent toutefois donner des résultats intermédiaires vis-à-vis de la pénicilline. Les critères d'interprétation sont fournis à des fins de recherche pharmaceutique, d'épidémiologie ou de suivi de l'apparition des nouvelles résistances. Toute souche qui donne des résultats intermédiaires ou résistants doit être envoyée à un laboratoire de référence pour confirmation.

Les tests de diffusion en gélose de disques contenant de l'ampicilline, de la pénicilline et de la rifampine ne sont pas fiables pour *Neisseria meningitidis*. Des tests de concentrations minimales inhibitrices (CMI) doivent être utilisés pour ces microorganismes.⁷

LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Le test décrit ici s'applique essentiellement aux bactéries aérobies à croissance rapide. Les bactéries exigeantes, outre *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* et les autres streptocoques, doivent être évaluées par une méthode de dilution.⁹ L'évaluation des anaérobies requiert des procédures spéciales.¹¹
- Les classifications Résistant, Intermédiaire et Sensible varient seulement d'un millimètre, ce qui correspond à une marge d'erreur courante en laboratoire. Certaines cultures peuvent donner une taille de zone de taille limite variant selon la journée ou le laboratoire ; ce type de culture est relativement rare.
- Pour la détection de la résistance chez les pneumocoques et les entérocoques, suivre scrupuleusement les procédures recommandées par le NCCLS.⁶
- D'autres agents antimicrobiens que ceux cités dans le tableau sont parfois utilisés. Les tests de sensibilité à ces agents doivent être interprétés en se basant sur la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition nette, et considérés uniquement comme qualitatifs en attendant que les zones d'interprétation soient établies. Tous les diamètres des zones doivent être relevés.
- Le test de confirmation de l'ESBL n'est valide que lorsque les quatre disques (céfotaxime, céfotaxime/acide clavulanique, ceftazidime, ceftazidime/acide clavulanique) sont utilisés simultanément. Le NCCLS ne recommande pas l'utilisation individuelle de ces disques.^{6,7}

† Partiellement adapté du document M100-S13 du NCCLS (M2) : Disk Diffusion Supplemental Tables, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, avec autorisation. La norme complète peut être obtenue auprès du National Committee for Clinical Laboratory Standards, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 États-Unis. Les valeurs non comprises dans la norme M100-S13 sont expliquées dans les autres notes en bas de page. Pour les corrélations appropriées avec les CMI, se reporter à la norme M100-S13.^{6,7,9}

- La classe « Intermédiaire » comprend les isolats dont les CMI d'agents antimicrobiens approchent en général les niveaux atteints dans le sang et les tissus et pour lesquels les taux de réponse peuvent être plus faibles que pour les isolats sensibles. La classe « Intermédiaire » suggère une possibilité d'application clinique au niveau des sites anatomiques où les antibiotiques sont physiologiquement concentrés (par exemple, quinolones et β-lactamines dans l'urine), ou lorsque des doses d'antibiotique plus élevées que la normale peuvent être administrées (p. ex., β-lactamines). La classe « Intermédiaire » comprend aussi une « zone tampon » qui devrait empêcher que des facteurs techniques mineurs non contrôlés causent des discordances majeures d'interprétation, en particulier dans le cas d'antibiotiques ayant une marge de pharmacotoxicité étroite.
- Des politiques relatives à la production d'antibiogrammes cumulatifs devraient être définies en accord avec le service des maladies infectieuses, le personnel engagé dans la prévention des infections et le comité de pharmacologie et de thérapeutique. Dans la plupart des cas, les pourcentages de résultats sensibles et intermédiaires ne devraient pas être combinés dans une même donnée statistique.
- Ces normes de diamètre des zones et limites du contrôle de qualité s'appliquent seulement aux tests pour les espèces d'*Haemophilus* utilisant le milieu pour Test d'identification d'*Haemophilus* (MTH) avec incubation sous 5 % de CO₂ (16 à 18 h). *H. influenzae* (ATCC 10211) est recommandée comme souche de contrôle de qualité complémentaire pour vérifier les propriétés de facteur de croissance du MTH. La limite des zones doit être considérée comme la région ne montrant aucune croissance manifeste visible à l'œil nu. Une croissance peu visible de colonies minuscules ayant tendance à s'atténuer de la zone la plus apparente ne doit pas être prise en compte lors de la mesure.
- Ces normes de diamètre des zones et limites du contrôle de qualité s'appliquent seulement aux tests utilisant une gélose GC additionnée d'1 % d'un supplément de croissance déterminé (p. ex., gélose BBL GC II enrichie d'IsoVitaleX) avec incubation sous 5 % de CO₂ (20 à 24 h).
- Ces normes de diamètre des zones et limites du contrôle de qualité s'appliquent seulement aux tests utilisant une gélose Mueller Hinton enrichie de 5 % de sang de mouton défibriné, avec incubation sous 5 % de CO₂ (20 à 24 h). Les normes d'interprétation s'appliquent à *S. pneumoniae* et aux autres streptocoques comme indiqué. Les résultats peuvent être inexacts si les critères spécifiés sont appliqués à des microorganismes autres que ceux qui ont été mentionnés. Les critères d'interprétation pour les streptocoques autres que *S. pneumoniae* sont proposés sur la base de la distribution des populations des diverses espèces, la pharmacocinétique des agents antimicrobiens, les études déjà publiées et l'expérience clinique de certains membres du sous-comité du NCCLS. Les données cliniques collectées systématiquement n'étaient disponibles que pour un nombre limité des composants du groupe.⁷ En dépit du manque de critères d'interprétation fiables de la diffusion de disques pour *S. pneumoniae* avec certains β-lactamines, *S. pneumoniae* ATCC 49619 est la souche retenue pour le contrôle de qualité de tous les tests de diffusion de disques réalisés avec les espèces de *Streptococcus*.
- Diamètres des zones recommandés par les fabricants d'antibiotiques et approuvés par la FDA, non inclus dans le M100-S13 du NCCLS (M2-A8).⁷
- Une autre souche d'*E. coli* (ATCC 35218) a été désignée pour le contrôle de qualité des disques contenant des combinaisons de β-lactamines et d'inhibiteurs des β-lactamases. Cette souche produit une β-lactamase qui devrait être inactivée par l'inhibiteur. Lorsqu'elle est utilisée conjointement avec la souche ATCC 25922, les deux composants des disques mixtes peuvent être évalués. Pour cette souche, les limites de contrôle pour l'association amoxicilline/acide clavulanique sont de 17 à 22 mm ; elles sont de 13 à 19 mm pour l'association ampicilline/sulbactam, de 12 à 18 mm pour la pipéracilline, de 24 à 30 mm pour l'association pipéracilline/tazobactam et de 21 à 25 mm pour l'association ticarcilline/acide clavulanique.
- Les isolats de pneumocoques donnant pour l'oxacilline des diamètres de zone ≥ 20 mm sont sensibles (CMI ≤ 0,06 µg/mL) à la pénicilline et peuvent être considérés comme sensibles à l'ampicilline, à l'amoxicilline, aux associations amoxicilline/acide clavulanique et ampicilline/sulbactam, au céfador, au cefdinir, au céfépime, au céfétafem, à la céfixime, au céfotaxime, au céfprozil, au ceftibuten, à la ceftrixaxone, au céfuroxime, à la cefpodoxime, au ceftiozime, à l'ertapénème, à l'imipénème, au loracarbef et au méropénème si la prescription en est indiquée, et ces agents n'ont pas besoin d'être testés. Les CMI de la pénicilline, du méropénème et du céfotaxime ou de la ceftrixaxone doivent être déterminées pour les isolats présentant pour l'oxacilline des diamètres de zone ≤ 19 mm parce que des diamètres de zone ≤ 19 mm sont obtenus avec des souches résistantes à la pénicilline, des intermédiaires ou certaines souches sensibles. Les isolats ne doivent pas être considérés comme résistants à la pénicilline ou intermédiaires uniquement sur la base d'une zone ≤ 19 mm pour l'oxacilline. L'amoxicilline, l'ampicilline, le céfépime, le céfotaxime, la ceftrixaxone, le céfuroxime, l'ertapénème, l'imipénème et le méropénème peuvent être utilisés pour traiter les infections à pneumocoques, mais des tests de sensibilité fiables par la méthode de diffusion en gélose de disques n'existent pas encore pour ces agents. Leur activité *in vitro* est mieux déterminée au moyen d'une méthode CMI. La pénicilline, le céfotaxime ou la ceftrixaxone et le méropénème doivent être testés par une méthode CMI fiable (telle que celle décrite dans le document M7⁹ du NCCLS) et rapportés en routine pour des isolats de LCR de *S. pneumoniae*. De tels isolats doivent aussi être testés vis-à-vis de la vancomycine au moyen d'une méthode CMI ou de diffusion de disques en gélose. Avec des isolats provenant d'autres sites, le test de dépistage au disque à l'oxacilline peut être utilisé. Les CMI de la pénicilline et du céfotaxime ou de la ceftrixaxone doivent être déterminées lorsque le diamètre de zone est ≤ 19 mm pour l'oxacilline. Pour déterminer la sensibilité des streptocoques autres que *S. pneumoniae* au cefdinir, utiliser le disque à 10 unités de pénicilline ; les isolats donnant des diamètres de zone ≥ 28 mm sont sensibles à la pénicilline et peuvent être considérés comme sensibles au cefdinir.
- Un isolat de streptocoque qui est sensible à la pénicilline peut être considéré comme étant sensible à l'ampicilline, l'amoxicilline, l'amoxicilline/acide clavulanique, l'ampicilline/sulbactam, au céfador, au cefdinir, au céfépime, au céfprozil, au céfotaxime, au ceftibuten (streptocoques du groupe A seulement), à la ceftrixaxone, au céfuroxime, à la cefpodoxime, au ceftiozime, à la céfalotine, à la céfapirine, à la céfadine, à l'ertapénème (β-hémolytiques uniquement), à l'imipénème, au loracarbef et au méropénème si la prescription en est indiquée, et n'a pas besoin d'être testé vis-à-vis de ces agents. Les streptocoques viridans, y compris ceux isolés à partir du sang et de sites anatomiques normalement stériles (p. ex., liquide céphalo-rachidien, sang, os, etc.) doivent être testés au moyen d'une méthode CMI quant à leur sensibilité à la pénicilline ou l'ampicilline.
- Les staphylocoques sensibles à la pénicilline sont aussi sensibles à d'autres pénicillines, combinaisons d'inhibiteurs des β-lactamines/β-lactamases, céphèmes et carbapénèmes, dont l'emploi a été approuvé par la FDA pour traiter les infections à staphylocoques. Les souches résistantes à la pénicilline et sensibles à l'oxacilline sont résistantes aux pénicillines sensibles aux pénicillines, mais sensibles aux autres pénicillines résistantes aux pénicillines, aux combinaisons d'inhibiteurs des β-lactamines/β-lactamases, aux céphèmes appropriés et aux carbapénèmes. Les staphylocoques résistants à l'oxacilline sont résistants à tous les antibiotiques de la famille des β-lactamines actuellement disponibles. Ainsi, la sensibilité ou la résistance à une large gamme d'antibiotiques de la famille des β-lactamines peut être dérivée des seuls tests vis-à-vis de la pénicilline et l'oxacilline. Des tests de routine des autres pénicillines, combinaisons d'inhibiteurs des β-lactamines/β-lactamases, des céphèmes et des carbapénèmes sont déconseillés.⁷ Pour les staphylocoques résistants à l'oxacilline, rapporter les résultats comme résistant ou ne pas les rapporter.
- Les rares souches d'*Haemophilus influenzae* à β-lactamase négative et résistantes à l'ampicilline (BLNAR) devraient être considérées comme résistantes aux associations amoxicilline/acide clavulanique et ampicilline/sulbactam, au céfador, au céfétafem, au céfonicide, au céfprozil, au céfuroxime et au loracarbef malgré l'apparente sensibilité *in vitro* de certaines souches BLNAR envers ces agents.
- Classe représentative pour l'ampicilline et l'amoxicilline.
- Pour *V. cholerae*, les résultats des tests de diffusion de disques en gélose vis-à-vis de l'ampicilline, la tétracycline, du triméthoprime/sulfaméthoxazole et des sulfonamides (soit le pourcentage de sensibles, intermédiaires et résistants) sont fortement corrélés à ceux des tests de microdilution en bouillon. Les résultats obtenus pour la tétracycline peuvent servir à prédire la sensibilité probable des isolats à la doxycycline ; ne pas utiliser la méthode de diffusion en gélose de disques pour la doxycycline ou l'érythromycine car la corrélation avec les résultats des CMI est faible.
- L'ampicilline est le représentant des molécules ampicilline et amoxicilline. Les résultats de test vis-à-vis de l'ampicilline peuvent servir à prédire la sensibilité des entérocoques ne produisant pas de β-lactamases aux associations amoxicilline/acide clavulanique, ampicilline/sulbactam, pipéracilline et pipéracilline/tazobactam. La sensibilité à la pénicilline peut servir à prédire la sensibilité des entérocoques ne produisant pas de β-lactamines à l'ampicilline, l'amoxicilline, aux associations ampicilline/sulbactam et amoxicilline/acide clavulanique, à la pipéracilline et l'association pipéracilline/tazobactam. Pour la pénicilline ou l'ampicilline, la classe « sensible » suggère la nécessité d'un traitement à haute dose pour les infections sévères à entérocoques. L'endocardite à entérocoques requiert un traitement combiné incluant de hautes doses de pénicilline ou de hautes doses d'ampicilline, ou de vancomycine ou de téicoplanine en plus de la gentamycine ou de la streptomycine pour obtenir un effet bactéricide. Dans le cas des entérocoques, la résistance à l'ampicilline ou la pénicilline n'est pas détectée avec fiabilité du fait de la production de β-lactamases par les méthodes de routine de diffusion de disques en gélose ou de dilution ; un test direct des β-lactamases basé sur la nitrocéfine est donc recommandé pour les isolats sanguins ou de liquide céphalorachidien. Un test positif pour les β-lactamases prédit la résistance à la pénicilline ainsi qu'aux acylamino-, carboxy- et uréido-pénicillines. Certains entérocoques résistants à la pénicilline ou à l'ampicilline peuvent présenter une résistance de haut niveau (par exemple, CMI de la pénicilline ≥ 128 µg/mL ou CMI de l'ampicilline ≥ 64 µg/mL). Le test des disques ne pourra différencier ceux dont la résistance est normale de ceux présentant une résistance de haut niveau. Pour les entérocoques récupérés dans le sang et le LCR, le laboratoire doit envisager de déterminer la CMI réelle de la pénicilline ou de l'ampicilline étant donné que les souches de *E. faecium* présentant une résistance normale de plus bas niveau (CMI de la pénicilline ≤ 64 µg/mL et de l'ampicilline ≤ 32 µg/mL) doivent être considérées comme potentiellement sensibles à une synergie avec un aminoglycoside (en l'absence d'une résistance à l'aminoglycoside de haut niveau), tandis que les souches présentant une résistance de plus haut niveau peuvent être résistantes à une telle synergie.⁶
- Dans le cas des entérocoques, la synergie entre l'ampicilline, la pénicilline ou la vancomycine et un aminoglycoside peut être prédite au moyen d'un test de dépistage des aminoglycosides (gentamycine et streptomycine) de haut niveau. Il n'est pas nécessaire de tester les autres aminoglycosides car leur activité vis-à-vis des entérocoques est inférieure à celle de la gentamycine et de la streptomycine.
- Les résultats des tests de sensibilité à l'ampicilline doivent servir à prédire l'activité de l'amoxicilline. La majorité des isolats de *H. influenzae* qui sont résistants à l'ampicilline et l'amoxicilline produisent des β-lactamases de type TEM. Dans la plupart des cas, un test direct des β-lactamases peut offrir un moyen rapide de déceler la résistance à l'ampicilline et l'amoxicilline.
- Peut être rapporté pour les espèces d'*Acinetobacter* résistantes aux autres agents.
- N'est pas rapporté en routine pour les isolats à partir d'échantillons aux autres agents.
- La sensibilité et la résistance à l'azithromycine, la clarithromycine et la dirithromycine peuvent être prédites à partir de l'érythromycine.
- Voir la discussion des ESBL à la rubrique « RÉSULTATS ». Pour les tests de dépistage et de confirmation des ESBL chez *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* et *E. coli*, se reporter à la section « RÉSULTATS » et la référence 7. Les seuils de dépistage (procédure standard de diffusion de disques en gélose Mueller Hinton, 35 °C, air ambiant, 16 à 18 h) sont : aztréonam (≤ 27 mm), ceftazidime (≤ 22 mm), céfotaxime (≤ 27 mm), cefpodoxime (≤ 17 mm) et ceftrixaxone (≤ 25 mm). Sont recommandés pour le contrôle de qualité *E. coli* ATCC 25922 (cel qui est mentionné dans la liste) ; *K. pneumoniae* ATCC 700603 (aztréonam 9 à 17 mm), ceftazidime (10 à 18 mm), céfotaxime (17 à 25 mm), cefpodoxime (9 à 16 mm) et ceftrixaxone (16 à 24 mm).⁷ L'utilisation de plus d'un agent antimicrobien pour le dépistage améliore la sensibilité de la détection. Le test de confirmation du phénotype nécessite l'utilisation du céfotaxime ainsi que de la ceftazidime, seuls et combinés à l'acide clavulanique. Un accroissement du diamètre de zone ≥ 5 mm pour l'un des agents antimicrobiens testés en association avec l'acide clavulanique par rapport au diamètre de zone de l'agent antimicrobien testé seul indique des ESBL. Les recommandations issues du contrôle de qualité sont les suivantes : souche négative de *E. coli* ATCC 25922 qui produit une augmentation ≤ 2 mm du diamètre de la zone de l'agent antimicrobien testé seul par rapport au diamètre de la zone correspondante en association avec l'acide clavulanique ; souche positive de *K. pneumoniae* ATCC 700603 qui produit une augmentation ≥ 3 mm du diamètre de la zone du céfotaxime et une augmentation ≥ 5 mm du diamètre de la zone de la ceftazidime. Voir « Limites de la méthode ». Voir la référence 7 pour les détails de la procédure.

- u La céfalotine peut servir à prédire l'activité de la céfalotine, de la céfapirine, de la céphadrine, de la céfalexine, du céfador et du céfadroxil. La céfazoline, le céfuroxime, le céfepodoxime, le céfprozil et le loracarbef (isolats urinaires seulement) peuvent être testés individuellement car ils peuvent être actifs lorsque la céfalotine ne l'est pas.
- v Pas applicable aux tests des espèces de *Morganella*.
- w Pour *N. gonorrhoeae*, l'obtention d'un résultat intermédiaire avec un agent antimicrobien indique, soit un problème technique qui devrait se résoudre en répétant le test, soit un manque d'expérience clinique dans le traitement des microorganismes donnant de tels résultats. La dernière hypothèse semble être vraie pour le cefmétrazole, le céfotétan, le céfoxitine et la spectinomycine. Les souches présentant des zones intermédiaires avec les autres agents présentent un taux de guérison clinique documenté inférieur (85 à 95 %) à celui > 95 % des souches sensibles.
- x Dans le cas des isolats issus de LCR, il faut tester et rapporter les résultats du céfotaxime, ceftiozime et/ou de la ceftriaxone à la place de la céfalotine et la céfazoline.
- y Comme certaines souches du genre *Providencia* ont donné des résultats faussement sensibles avec les disques de ceftprozil, il convient de ne pas tester les souches appartenant à ce genre avec ces disques, ni de rapporter les résultats correspondants.
- z Prescrit pour les isolats urinaires seulement. En plus des tests sur les isolats urinaires, l'acide nalidixique peut être utilisé pour tester la sensibilité réduite aux fluoroquinolones des isolats extraintestinaux d'espèces de *Salmonella*. Voir note ddd en bas de page.
- aa Les espèces de *Staphylococcus* peuvent développer une résistance lors d'une antibiothérapie prolongée avec des quinolones. C'est pourquoi les isolats qui sont initialement sensibles peuvent devenir résistants au bout de 3 à 4 jours de traitement. Répéter les tests sur des isolats peut s'avérer judicieux.
- bb Dans le cas de *V. cholerae*, à utiliser avec circonspection car la méthode de diffusion de disques en gélose peut classer de nombreux microorganismes de façon erronée (taux d'erreur secondaire plus élevé).
- cc Aucun critère n'a été établi en faveur du test de ce médicament avec *Streptococcus pneumoniae*. L'étendue des contrôles n'est énumérée que pour des raisons de contrôle de qualité.
- dd La colistine et la polymyxine B diffusent mal dans la gélose et, par conséquent, l'exactitude de la méthode de diffusion est inférieure à celle obtenue avec d'autres antibiotiques. Une résistance est toujours significative, mais lorsque le traitement des infections systémiques causées par des souches sensibles est envisagé, il est prudent de confirmer les résultats d'un test de diffusion en gélose par une méthode de dilution.
- ee Certains microorganismes sensibles à la tétracycline peuvent également être considérés comme sensibles à la minocycline et la doxycycline. Cependant, certains microorganismes intermédiaires ou résistants à la tétracycline peuvent être plus sensibles à la doxycycline ou la minocycline, ou les deux.
- ff Approuvé par la FDA pour *S. saprophyticus* et *S. epidermidis* (mais pas *S. aureus*).
- gg Pour les limites de contrôle des diamètres de zone produites par les disques de gentamycine 120 µg et de streptomycine 300 µg, utiliser *E. faecalis* ATCC 29212 (gentamycine : 16 – 23^h mm ; streptomycine : 14 – 20^h mm).
- hh Si la zone est de 7 à 9 mm, le test n'est pas concluant et un test de dépistage par dilution en gélose ou par microdilution en bouillon doit être fait pour confirmer la résistance.
- ii Diamètres des zones recommandés par le NCCLS qui diffèrent des recommandations approuvées par la FDA.
- kk Comme certaines souches des genres *Citrobacter*, *Providencia* et *Enterobacter* ont donné des résultats faussement sensibles avec les disques de céfprozil et de loracarbef, il convient de ne pas tester les souches appartenant à ces genres avec ces disques, ni de rapporter les résultats correspondants.
- ll Les disques de méthicilline ne sont plus disponibles en raison de l'indisponibilité de la poudre de méthicilline.
- mm Aucun critère n'a été établi en faveur du test de ce médicament avec *Pseudomonas aeruginosa*. L'étendue des contrôles n'est énumérée que pour des raisons de contrôle de qualité.
- nn Parmi les pénicillines résistantes aux pénicillinases, l'oxacilline peut être testée et les résultats appliqués aux autres pénicillines résistantes à la pénicillinase, à savoir la cloxacilline et la dicloxacilline. L'oxacilline est préférée parce qu'elle résiste mieux à la dégradation pendant le stockage et qu'elle est plus susceptible de déceler les souches de staphylocoques hétéro-résistants. Les disques de cloxacilline ne doivent pas être utilisés parce qu'ils peuvent ne pas déceler les *S. aureus* résistants à l'oxacilline. Si des résultats intermédiaires sont obtenus pour *S. aureus*, effectuer le test de dépistage sur gélose hypersalée à l'oxacilline. (Voir M7-A6⁹.)
- oo Après une incubation de 24 h complètes, rechercher par transparence (en tenant la boîte de Pétri devant une source lumineuse) une légère croissance dans la zone d'inhibition du disque d'oxacilline. Les staphylocoques résistants à la méthicilline (MRS) sont souvent résistants à de multiples classes d'agents antimicrobiens, notamment les aminoglycosides, les macrolides, la clindamycine, les phénols, les quinolones, les sulfonamides et la tétracycline. L'observation d'une polyrésistance est une indication d'une possible résistance à la méthicilline. Cependant, des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline ne montrant aucune résistance à d'autres classes d'agents antimicrobiens ont été isolées chez des populations de patients hospitalisés ou ambulatoires.
- pp Les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline et sensibles à l'oxacilline produisent des β-lactamases et il est préférable d'utiliser un test avec disque de 10 unités de pénicilline à la place d'un disque d'ampicilline. La pénicilline devrait être utilisée pour tester la sensibilité de toutes les pénicillines sensibles aux β-lactamases telles que l'ampicilline, l'amoxicilline, l'azlocilline, la carbénicilline, la mezlocilline, la pipéracilline et la ticarcilline. De même, un test positif pour les β-lactamases prédit la résistance à ces agents.⁶ Pour les staphylocoques résistants à l'oxacilline, rapporter les résultats comme résistant ou ne pas les rapporter.
- qq Un test positif pour les β-lactamases prédit la résistance à la pénicilline, l'ampicilline et l'amoxicilline. Un test des β-lactamases permettra de déceler une des formes de résistance aux pénicillines chez *N. gonorrhoeae* et servira aussi à obtenir une information épidémiologique. Les souches dont la résistance est à médiation chromosomique ne peuvent être mises en évidence que par des tests de sensibilité supplémentaires tels que la méthode de diffusion de disques ou de dilution CMI en gélose. Les gonocoques produisant des diamètres de zone ≤ 19 mm avec des disques de 10 unités de pénicilline sont probablement des souches productrices de β-lactamases. Toutefois, le test des β-lactamases demeure préférable aux autres méthodes de sensibilité pour une identification rapide et exacte de la résistance à la pénicilline à médiation plasmidique.
- rr Les tests de sensibilité de *S. pyogenes* à la pénicilline sont rarement nécessaires puisque ce microorganisme est resté universellement sensible à la pénicilline. Certaines souches de *S. agalactiae* peuvent toutefois donner des résultats intermédiaires vis-à-vis de la pénicilline.⁷
- ss La rifampine ne doit pas être utilisée comme seule chimiothérapie.⁷
- tt Le disque de sulfisoxazole peut être utilisé comme représentant de n'importe quel sulfamide actuellement commercialisé. Les milieux contenant du sang (à l'exception de ceux contenant du sang de cheval lysé) ne conviennent généralement pas pour tester les sulfamides ou le triméthoprim. La gélose Mueller Hinton doit contenir le moins possible de thymidine pour tester les sulfamides et/ou le triméthoprim. Pour déterminer si la gélose Mueller Hinton a des niveaux suffisamment faibles de thymine et de thymidine, on peut tester les souches d'*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ou ATCC 33186 avec des disques de triméthoprim-sulfaméthoxazole (voir réf. 12). Une zone d'inhibition ≥ 20 mm, qui est essentiellement dépourvue de petites colonies, indique un niveau suffisamment faible de thymine et de thymidine.⁶
- uu Les gonocoques donnant des diamètres de zone ≤ 19 mm autour d'un disque de tétracycline 30 µg correspondant en général à un isolat de *Neisseria gonorrhoeae* résistant à la tétracycline (TRNG) dont la résistance est à médiation plasmidique. Ces souches devraient être confirmées par un test de dilution (CMI ≥ 16 µg/mL) et/ou envoyées à un laboratoire public pour enquête épidémiologique.
- vv Tous les isolats de staphylocoques associés à des diamètres de zone de 14 mm ou moins doivent être testés par une méthode de CMI. Envoyer tout staphylocoque déterminé comme résistant à la vancomycine à un laboratoire de référence.⁷ La procédure de diffusion de disques ne pourra différencier les souches présentant une sensibilité réduite à la vancomycine (CMI de 4 à 8 µg/mL) des souches sensibles (CMI comprise entre 0,5 et 2 µg/mL), même après 24 h d'incubation. Pour pouvoir reconnaître les souches présentant des CMI pour la vancomycine comprises entre 4 et 8 µg/mL, il faut effectuer un test de CMI. Le test de dépistage sur gélose pour la vancomycine décrit pour les entérocoques peut être utilisé avec succès pour détecter ces isolats, en incubant les géloses pendant 24 h complètes à 35 °C, mais le résultat doit être confirmé par CMI. L'utilisation d'une souche de contrôle de qualité sensible, telle que *S. aureus* ATCC 29213, est déterminante pour garantir la spécificité. Tant que des informations complémentaires sur la prévalence ou la signification clinique de ces isolats ne sont pas disponibles, les laboratoires peuvent juger bon d'examiner les souches MRSA avec plus d'attention afin de détecter des CMI élevées pour la vancomycine.⁵
- ww Lorsque l'on teste l'action de la vancomycine contre des entérocoques, les géloses devraient être conservées pendant 24 h complètes et examinées par transparence à la lumière ; la présence d'un voile ou de toute autre forme de croissance à l'intérieur de la zone d'inhibition indique une résistance. Les microorganismes présentant des zones intermédiaires doivent être testés avec une méthode de CMI comme décrit dans le document M7 du NCCLS. Consulter aussi le test de dépistage sur gélose pour la vancomycine décrit dans le tableau 2D des CMI (M100-S13).⁹
- xx On n'a jamais été observé de souche de *S. pneumoniae* donnant un diamètre de zone d'inhibition pour la vancomycine < 17 mm ; envoyer de telles souches à un laboratoire de référence.⁷
- yy En raison du nombre limité d'autres possibilités, le chloramphénicol, l'érythromycine, la tétracycline (ou la doxycycline ou la minocycline) et la rifampine peuvent être utilisés pour les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE) et il est recommandé de consulter un spécialiste des maladies infectieuses.⁷
- aaa On n'a jamais été observé de souche de streptocoques β-hémolytiques donnant un diamètre de zone d'inhibition de moins de 24 mm pour l'ampicilline, le céfépime, le céfotaxime, la ceftriaxone ou la pénicilline ; envoyer de telles souches à un laboratoire de référence.
- bbb La détérioration du contenu des disques d'oxacilline s'évalue dans les meilleures conditions avec *S. aureus* ATCC 25293, avec un diamètre de zone acceptable de 18 à 24 mm.
- ccc Pour l'ampicilline, le céfépime, le céfotaxime, la ceftriaxone et la pénicilline, les streptocoques β-hémolytiques uniquement, comprennent les souches de streptocoques pyogéniques formatrices de grandes colonies avec les antigènes de groupe A (*S. pyogenes*), C ou G et les souches avec l'antigène de groupe B (*S. agalactiae*). Pour le céfépime, le céfotaxime et la ceftriaxone, les streptocoques Viridans comprennent les souches β-hémolytiques formatrices de petites colonies avec les antigènes du groupe A, C, F ou G (*S. anginosus*, anciennement appelé *S. milleri*), ainsi que *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. mutans* et *S. bovis*.
- ddd Les souches de *Salmonella* sensibles aux fluoroquinolones résistantes à l'acide nalidixique peuvent être associées à un échec thérapeutique ou une réponse retardée chez les patients traités par fluoroquinolones pour une salmonellose extraintestinale. Le test des isolats extraintestinaux de *Salmonella* pour la résistance à l'acide nalidixique peut être envisagé.

REFFÉRENCES: Voir la rubrique « References » du texte anglais.

BD BBL Sensi-Disc-Blättchen zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK – Diese Blättchen sind zur halbquantitativen *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung von häufig vorkommenden, schnell wachsenden und bestimmten anspruchsvollen bakteriellen Erregern mit Hilfe des Agar-Blättchen-Diffusionsverfahrens bestimmt. Zu diesen Erregern gehören *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*-Spezies, *Pseudomonas*-Spezies, *Acinetobacter*-Spezies, *Enterococcus*-Spezies, *Vibrio cholerae* und mit abgewandelten Verfahren, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* und andere Streptokokken. HINWEIS: Spezielle Verfahren sind notwendig, um Pneumokokken, Enterokokken und methicillin-foxacillinresistente Staphylokokken nachzuweisen, um β-Lactamase-Tests sowie Such- und Bestätigungstests für Breitspektrum-β-Lactamase (ESBL, extended spectrum β-lactamases) durchzuführen; siehe Abschnitt „ERGEBNISSE“.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG – Agar-Diffusionsverfahren unter Verwendung von getrockneten Filterpapierblättchen, die mit bestimmten Konzentrationen von antimikrobiellen Substanzen imprägniert wurden, wurden in den 40er Jahren entwickelt. Um

Die in Frankreich angenommenen Interpretationskriterien für die Zonendurchmesser sind in den französischen Anleitungen dieser Packungsbeilage aufgeführt.

die Testvariabilität zu minimieren oder auszuschalten entwickelten Bauer *et al.* ein Standardverfahren, bei dem Mueller Hinton-Agar als Testmedium verwendet wird.^{1,2}

Im Anschluß daran veröffentlichten mehrere Ausführungsbehörden und Organisationen zur Festlegung von Normen Standard-Referenzverfahren auf der Grundlage der Bauer-Kirby-Methode. Zu den frühesten und gebräuchlichsten dieser Standardverfahren gehören die von der U.S. Food and Drug Administration (FDA)³ und der Weltgesundheitsorganisation (WHO)^{4,5} veröffentlichten Methoden. Die Verfahren wurden als Übereinkunft-Standard vom National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) angenommen und werden regelmäßig auf den neuesten Stand gebracht.^{6,7} Für die **aktuellen Empfehlungen wird auf das letzte NCCLS-Dokument verwiesen**.

VERFAHRENSPRINZIP – Blättchen mit verschiedenen antimikrobiellen Substanzen werden auf die Oberfläche von Mueller-Hinton-Agarplatten (oder Haemophilus-Testmediumagar zum Nachweis von *H. influenzae*, GC II-Agar mit IsoVitalEx-Anreicherungsmedium für *N. gonorrhoeae* oder Mueller-Hinton-Agar mit 5 % Schafblut für *S. pneumoniae*, β-hämolytische Streptokokken und Streptokokken der Viridans-Gruppe) gebracht, die mit Reinkulturen klinischer Isolate beimpft wurden. Nach der Inkubation werden die Platten untersucht, die Hemmzonen um die Blättchen gemessen und dann mit festgelegten Hemmzonengrößen für einzelne antimikrobielle Substanzen verglichen, um die Substanzen zu bestimmen, die für eine Antibiotikatherapie am besten geeignet sind.

REAGENZEN – Sensi-Disc-Blättchen sind 6 mm große Blättchen, die hergestellt werden, indem hochwertiges Filterpapier mit genau abgemessenen Mengen Antibiotika oder anderen chemotherapeutischen Substanzen imprägniert wird. Die Blättchen enthalten auf beiden Seiten eindeutig erkennbare Buchstaben und Ziffern zur Identifizierung der Substanz und zur Angabe der verwendeten Arzneimittelmenge. (Vgl. die Tabelle mit den Konzentrationen der reaktiven Bestandteile.) Die in den Blättchen enthaltene Arzneimittelmenge wird mit von der FDA festgelegten Methoden oder mit Methoden, die denen im US-Bundesregister (United States Federal Register) ähnlich sind oder gleichen, bestimmt.

Die Sensi-Disc-Substanzen werden in Kartuschen mit jeweils 50 Blättchen geliefert. Das letzte Blättchen in jeder Kartusche ist mit einem „X“ gekennzeichnet und enthält das laut Code angegebene Arzneimittel. Die Kartuschen werden in BBL Sensi-Disc-Dispensiergeräten verwendet; es sind dies ein 1-Blättchen-Dispensiergerät, ein 8-Blättchen-Dispensiergerät für Petrischalen von 100 mm und 6- bzw. 8-Blättchen-Dispensiergeräte mit automatischer Andruckvorrichtung für Petrischalen von 100 mm und ein 12-Blättchen-Dispensiergerät mit automatischer Andruckvorrichtung für Petrischalen von 150 mm.

Sicherheitshinweise: *In-vitro*-Diagnostikum.

Die Gebrauchsanleitung befolgen. Die Leistungsfähigkeit der Blättchen hängt nicht nur von der Substanzkonzentration auf den Blättchen, sondern auch von der Verwendung eines geeigneten Inokulums und geeigneter Kontrollkulturen, funktionsfähiger, vorgetesteter Platten, vorschriftsmäßiger Lagerungstemperatur und anderen Faktoren ab.

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen und Verwendung aseptischer Techniken erfolgen. Nach Gebrauch Kulturen, Behälter und andere kontaminierte Materialien sterilisieren.

Aufbewahrung:

- Blättchen nach Erhalt bei -20 bis +8 °C aufbewahren. Wird der Laborkühlschrank häufig geöffnet und geschlossen und die richtige Temperatur kann **nicht** aufrechterhalten werden, nur die für eine Woche ausreichende Menge Blättchen in diesem Kühlschrank lagern. Einige Blättchen (z.B. solche, die β-Lactame enthalten) sind vorzugsweise bei -20 °C tiefgekühlt aufzubewahren.
- Behälter vor dem Öffnen auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach dem Dispensieren die unbenutzten Blättchen wieder im Kühlschrank aufbewahren.
- Die ältesten Blättchen zuerst verwenden.
- Verfallene Blättchen entsorgen. Außerdem sollten Kartuschen, aus denen während einer Woche häufig Blättchen entnommen wurden sowie Blättchen, die über Nacht nicht im Kühlschrank aufbewahrt wurden, entsorgt werden. Zumindest sollten diese Blättchen vor einer weiteren Verwendung auf akzeptable Leistungsfähigkeit hin getestet werden.
- Falls die Blättchen mit den empfohlenen Kontrollorganismen falsche Hemmzonen ergeben, muß das gesamte Verfahren überprüft werden. Die Ursache einer falschen Hemmzonengröße kann auf den Blättchen, der Inokulation, der Vorbereitung oder Tiefe (ungefähr 4 mm) des Mediums und anderen Faktoren beruhen.

Das angegebene Verfallsdatum gilt nur für in ungeöffneten Packungen aufbewahrte Blättchen und bei Beachtung der entsprechenden Lagervorschriften.

KLINISCHES MATERIAL – Normalerweise sollte klinisches Material bei diesem Test nicht direkt verwendet werden. Siehe die Anleitung mit Anweisungen zur Zubereitung des Inokulums. Falls möglich, sollten die Kulturen aus klinischem Material angelegt werden, das den Patienten vor Beginn einer Antibiotikatherapie entnommen wurde.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Sensi-Disc-Blättchen zur Empfindlichkeitsprüfung je nach Kennzeichnung.

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Bakterienstämme zur Qualitätskontrolle und erforderliche Laborgeräte zur Durchführung einer Blättchen-Empfindlichkeitsprüfung mit dem Diffusionstest nach dem Standardverfahren. Einen 0,5-McFarland-Trübungsstandard herstellen, indem 0,5 mL 0,048 M BaCl₂ [1,175 % (Gew./Vol.) BaCl₂·2H₂O] zu 99,5 mL 0,18 M [0,36N] H₂SO₄ [1 % (Vol./Vol.)] zugegeben werden. Den Trübungsstandard mit Hilfe eines Spektralphotometers mit Vergleichsküvette bei einer Schichtdicke von 1 cm überprüfen; die Extinktion bei 625 nm muß zwischen 0,08 und 0,10 liegen.

Anleitungen, einschließlich Qualitätskontrolle durch den Anwender:⁶

- Zubereitung des Inokulums mit Test- und Kontrollkulturen.
 - Eine Gramfärbung anfertigen. Nur Reinkulturen verwenden.
 - Drei bis fünf ähnliche Kolonien auswählen und mit Inokulationsnadel oder -öse in 4–5 mL einer geeigneten Bouillon wie z.B. **Trypticase-Soja-Bouillon** (oder Mueller-Hinton-Bouillon für anspruchsvolle Organismen) überführen.
 - Falls nötig, die Kulturen in der Bouillon bei 35 °C 2–6 h lang inkubieren, bis eine Trübung erreicht ist, die einem Trübungsstandard von 0,5 McFarland entspricht (ungefähr 1 zu 2 x 10⁸ KBE/mL). Es kann als Alternative auch eine direkte Bouillon- oder Kochsalzsuspension mit Kolonien von einer Agarplatte, die über Nacht inkubiert wurde, hergestellt werden (es sollte ein nichtselektives Medium wie Blutagar oder Schokoladenagar für *H. influenzae* und *N. gonorrhoeae* verwendet werden). Die direkte Kolonie-Suspensionsmethode ist bei *Staphylococcus*-Spezies, *S. pneumoniae* und anderen Streptokokken, *Haemophilus*-Spezies und *N. gonorrhoeae* vorzuziehen.⁶
 - Falls nötig, verdünnen, bis die Trübung dem 0,5-McFarland-Trübungsstandard entspricht. Als Verdünnungsmittel wird sterile Bouillon oder Kochsalzlösung verwendet. Als Alternativmethode kann das Inokulum photometrisch standardisiert werden. Um die Einstellung des Inokulums von schnell wachsenden Organismen zu erleichtern, kann das Inokulationssystem **Prompt** (volumetrische Vorrichtung zur Zubereitung des Inokulums) verwendet werden.⁸
- Über Nacht aufbewahrte Bouillonkulturen sollten nicht als Inokulum verwendet werden.
- Inokulation.
 - Innerhalb von 15 min einen sterilen Wattetupfer in das korrekt eingestellte Inokulum tauchen und gegen die obere Innenwand des Röhrchens mehrmals fest hin und her drehen, um überschüssige Flüssigkeit auszurücken.
 - Die gesamte Oberfläche einer Mueller-Hinton-Agarplatte (oder einer anderen geeigneten Agarplatte) dreimal ausstreichen, wobei die Platte zwischen jedem Ausstreichen um 60 Grad gedreht wird, um eine gleichmäßige Inokulation zu erzielen.
 - Der Deckel kann 3–5 min, aber nicht länger als 15 min geöffnet bleiben, damit eventuelle oberflächliche Feuchtigkeit vor dem Aufbringen der mit Arzneimittel imprägnierten Blättchen absorbiert wird.
- Geeignete Blättchen auswählen (siehe Empfehlungen in Literaturangabe 7, Tabelle 1 und 1A M100-513 [M2]).
- Die Blättchen unter Einhaltung aseptischer Vorsichtsmaßnahmen mit einem BBL-Dispensiergerät plazieren, und zwar so, daß die Blättchenzentren mindestens 24 mm voneinander entfernt sind. Penicillin- und Cephalosporin-Blättchen vorzugsweise mindestens 10 mm vom Rand der Petrischale und mit einem Abstand von mindestens 30 mm zwischen den Blättchenzentren plazieren. Diese Blättchen nicht nebeneinander plazieren. Bei *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* und *S. pneumoniae* nicht mehr als neun Blättchen pro 150-mm-Platte bzw. vier Blättchen pro 100-mm-Platte verwenden. Würden die Blättchen nicht mit Dispensiergeräten mit automatischer Andrückvorrichtung auf dem Agar plaziert, Blättchen für guten Kontakt mit der Plattenoberfläche mit einer sterilen Nadel oder Pinzette andrücken.
- Die Platten mit dem Agar nach oben innerhalb von 15 min in einen Inkubator von 35 °C bringen. *Haemophilus*-Spezies, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* und andere Streptokokken sollten in einer mit 5 % CO₂ angereicherten Atmosphäre inkubiert werden.
- Die Platten nach einer Inkubationszeit von 16–18 h (20–24 h für *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* und andere Streptokokken) untersuchen. Für *Staphylococcus*-Spezies wird die volle 24stündige Inkubationszeit empfohlen, um methicillin-/nafticillin-/oxacillinresistente Staphylokokken nachzuweisen; das gleiche gilt für den Nachweis von vancomycinresistenten *Enterococcus*-Spezies. Die Durchmesser der Hemmzonen, die bei visueller Überprüfung eine vollständige Hemmung aufweisen, werden gemessen. Die Zonendurchmesser werden auf den nächsten Millimeter gerundet. Weitere Einzelheiten zur Messung von Hemmzonen sind der Literatur zu entnehmen.⁶ Sind nur einzeln stehende Kolonien gewachsen, so war das Inokulum zu dünn, und der Test muß wiederholt werden. Hemmzonen um Blättchen mit verschiedenen Arzneimitteln können nicht zum Vergleich der Arzneimittelaktivität herangezogen werden. Siehe die Tabelle zur Interpretation der Hemmzonen, die zu erwartende Werte aus Tests mit häufig vorkommenden Aerobiern enthält. Die Verwendung eines **BBL Sensi-Disc**-Zoneninterpretations-Sets kann die Hemmzonenmessung vereinfachen.
- Kontrolltests mit vorgeschriebenen Kulturen sollten an jedem Tag, an dem Empfindlichkeitsprüfungen durchgeführt werden, mitlaufen. Falls eine laut NCCLS-Standard⁶ zufriedenstellende Testleistung dokumentiert werden kann, können die Kontrolltests wöchentlich durchgeführt werden. Typische Hemmzonengrößen für *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766, *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. coli* ATCC 35218 (β-Lactamase-produzierender Stamm) und *E. faecalis* ATCC 29212 (zur Qualitätskontrolle von Blättchen mit 120 µg Gentamycin und 300 µg Streptomycin) und *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (zur Durchführung von Such- und Bestätigungstests für Breitspektrum-β-Lactamasen) sind in der Tabelle (oder den Fußnoten) aufgeführt und zeigen die einwandfreie Leistungsfähigkeit des gesamten Verfahrens an. *E. faecalis* ATCC 29212 (oder 33186) wird auch zur Überprüfung eines niedrigen Thymin- und Thymidingehalts in neuen Chargen von Mueller-Hinton-Agar empfohlen (siehe Fußnote tt). *H. influenzae* ATCC 10211 wird als nützlicher Bakterienstamm zur zusätzlichen Qualitätskontrolle empfohlen, um die wachstumsstimulierenden Eigenschaften von *Haemophilus*-Testmediumagar zu überprüfen.⁷

ERGEBNISSE^{6,7} – HINWEIS: Die empfohlenen Interpretationskriterien basieren auf gebräuchlichen Dosierungen und Verabreichungswegen in den USA.

Die gemessenen Zonendurchmesser werden mit denen in der Tabelle verglichen. Die Ergebnisse für einen spezifischen Organismus können als resistent, intermediär oder empfindlich bewertet werden. Für manche Kombinationen von Organismen und Antibiotika schließt die Abwesenheit von resistenten Stämmen die Festlegung von Ergebniskategorien mit Ausnahme von „Empfindlich“ aus. Bei Stämmen mit Ergebnissen, die auf die Kategorie „Unempfindlich“ hindeuten, sollten Organismus-Identifikations-Tests und antimikrobielle Empfindlichkeitstests bestätigt werden. Danach sollten die Isolate aufbewahrt und an ein Referenzlabor gegeben werden, das die Ergebnisse mittels einer NCCLS-Referenz-Verdünnungsmethode bestätigt.

Für Organismen, die nicht in der Tabelle zur Interpretation von Hemmzonendurchmessern aufgelistet sind (z.B. *Campylobacter*, *Corynebacterium*-Spezies, *Bacillus*-Spezies) gibt es noch keine adäquaten Studien, aus denen sich reproduzierbare feste Standards zur Ergebnisinterpretation entwickeln lassen. Falls notwendig, ist normalerweise eine Verdünnungsmethode die am besten geeignete Testmethode, bei der ggf. der Organismus an ein Referenzlabor geschickt werden muß.⁷

Für Fäkalisolate von *Salmonella*- und *Shigella*-Spezies sollten nur Ampicillin, ein Chinolon und Trimethoprim/Sulfamethoxazol routinemäßig getestet und dokumentiert werden. Darüber hinaus sollten extraintestinale Isolate von *Salmonella*-Spezies auf Empfindlichkeit gegen Chloramphenicol und ein Cephalosporin der dritten Generation getestet und dokumentiert werden. Bei *Salmonella*- und *Shigella*-Spezies können Aminoglykoside und Cephalosporine der ersten und zweiten Generation *In vitro* aktiv erscheinen, sind aber klinisch nicht wirksam und Isolate sollten nicht als empfindlich dokumentiert werden.⁷

Enterobacter, *Citrobacter* und *Serratia* können während längerer Therapie mit Cephalosporinen dritter Generation resistent werden. Deshalb können anfangs empfindliche Isolate innerhalb von 3 bis 4 Tagen nach Therapiebeginn resistent werden. Wiederholte Isolate-Tests müssen ggf. durchgeführt werden.

Nicht-*Enterobacteriaceae* außer *P. aeruginosa* und *Acinetobacter*-Spezies sollten mit der Verdünnungsmethode getestet werden (M7-A6⁹).

P. aeruginosa kann bei längerer Therapie mit allen Antibiotika resistent werden. Isolate, die anfangs empfindlich sind, können innerhalb von 3 bis 4 Tagen nach Therapiebeginn resistent werden. Die wiederholte Untersuchung von Isolaten kann notwendig werden.

Die Empfindlichkeit von *Pseudomonas aeruginosa*, die bei Patienten mit zystischer Fibrose isoliert wurden, läßt sich durch die Blättchenmethode zuverlässig ermitteln, kann aber eine verlängerte Inkubationszeit von bis zu 24 h erfordern, bevor das Ergebnis als empfindlich angegeben werden kann.

Aufgrund der Bildung von penicillinbindenden Proteinen (PBP) mit niedriger Affinität oder der Bildung von β-Lactamase können Enterokokken resistent gegen Penicillin und Ampicillin sein. Mit dem Blättchen-Diffusionstest können Isolate mit abweichenden penicillinbindenden Proteinen genau, aber β-Lactamase produzierende Stämme nur unzuverlässig nachgewiesen werden. Die letzteren Stämme werden am besten mit einem direkten β-Lactamase-Test nachgewiesen,⁶ z.B. mit **Cefinase**-Nitrocefin-Blättchen oder mit chromogenen Cephalosporin-Blättchen.

Für *Enterococcus*-Spezies können Cephalosporine, Aminoglykoside (außer für hochgradige Resistenz-Reihentests), Clindamycin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol *In vitro* aktiv erscheinen, sind aber klinisch nicht wirksam und Isolate sollten nicht als empfindlich dokumentiert werden.

Nur die Testergebnisse mit Ampicillin, einem Cephalosporin der dritten Generation, Chloramphenicol und Meropenem sollten routinemäßig für *H. influenzae*-Isolate aus Zerebrospinalflüssigkeit protokolliert werden.

Amoxicillin/Clavulansäure, Azithromycin, Clarithromycin, Cefaclor, Cefprozil, Loracarbef, Cefdinir, Cefixim, Cefpodoxim und Cefuroxim-Axetil sind orale Arzneimittel, die empirisch gegen *Haemophilus*-Spezies zur Therapie von Atemwegsinfektionen eingesetzt werden können. Die Ergebnisse der Empfindlichkeitstests mit diesen Antibiotika sind oft von geringem Nutzen zur Therapie individueller Patienten. Überprüfung der Empfindlichkeit von *Haemophilus*-Spezies für diese Substanzen kann jedoch bei Übersichtsstudien oder epidemiologischen Studien angebracht sein.

Breitspektrum-β-Lactamasen (ESBL) sind von gramnegativen Bakterien produzierte Enzyme, die durch Mutation in Genen für normale plasmidvermittelte β-Lactamasen entstehen. Stämme von *Klebsiella*-Spezies und *E. coli*, die ESBL produzieren, sind möglicherweise trotz scheinbarer *In-vitro*-Empfindlichkeit gegen einige dieser Substanzen therapieresistent gegen Penicilline, Cephalosporine oder Aztreonam. Manche dieser Stämme zeigen Hemmzonen unterhalb der normalen empfindlichen Population, jedoch oberhalb der normalen Grenzwerte für bestimmte Breitspektrum-Cephalosporine oder Aztreonam. Solche Stämme sollten unter Anwendung der ESBL-Grenzwerte auf potentielle ESBL-Produktion getestet werden, bevor Ergebnisse für Penicilline, Breitspektrum-Cephalosporine oder Aztreonam angegeben werden. Andere Stämme erweisen sich gegebenenfalls im Test mit Hilfe der normalen Grenzwerte als intermediär oder resistent gegen eine oder mehrere dieser Substanzen. Bei allen ESBL-produzierenden Stämmen sollten die Zonendurchmesser für eines oder mehrere der Breitspektrum-Cephalosporine oder Aztreonam in Gegenwart von Clavulansäure im phänotypischen Bestätigungstest größer werden. Bei allen bestätigten ESBL-produzierenden Stämmen sollte die Testinterpretation als resistent gegen alle Penicilline, Cephalosporine und Aztreonam angegeben werden. Siehe Fußnote t für ESBL-Such- und Bestätigungstests. Die Entscheidung, ob ESBL-Suchtests bei allen Urinisolaten durchgeführt werden, sollte auf laborinterner Basis getroffen werden, wobei Prävalenz-, Therapie- und Infektionskontrollaspekte zu berücksichtigen sind.⁷

Beim Nachweis von methicillinresistenten Staphylokokken ist es wahrscheinlich, daß eine Resistenz mit Oxacillin-Blättchen besser als mit Methicillin- oder Nafticillin-Blättchen festgestellt werden kann. Aus diesem Grund ist das 1-µg-Oxacillin-Blättchen beim Testen auf Methicillin/Oxacillin-Resistenz zu verwenden. Alle Oxacillin-Hemmzonen sollten sorgfältig mit durchscheinendem Licht untersucht werden, um kleine Kolonien oder eine dünne Wachstumsschicht der Bakterien innerhalb der Zone nach einer Inkubationszeit von 24 h feststellen zu können. Methicillinresistente Staphylokokken sind gewöhnlich gegen mehrere Antibiotikaklassen resistent, einschließlich Aminoglykoside, Macrolide, Clindamycin, Phenicol, Chinolone, Sulfonamide und Tetracycline. Eine festgestellte Mehrfachresistenz sollte als Hinweis auf die Möglichkeit einer Methicillin-Resistenz gedeutet werden. Methicillinresistente *S. aureus*-Stämme, die gegen andere Antibiotikaklassen nicht resistent sind, wurden jedoch sowohl von stationären als auch ambulanten Patienten isoliert. Wenn der Blättchendiffusionstest bei einem potentiellen methicillinresistenten *Staphylococcus*-Stamm zweifelhaft ausfällt, sollten zusätzliche Bestätigungstests gemäß NCCLS-Dokument M7⁹ durchgeführt werden. Unabhängig von den mit den folgenden Substanzen erhaltenen *In-vitro*-Ergebnissen müssen methicillin-/oxacillinresistente *S. aureus* (MRSA) sowie koagulasenegative Staphylokokken (MRS) als resistent gegen alle Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und andere β-Lactame, wie z.B. Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin/Subactam, Ticarcillin/Clavulansäure, Piperacillin/Tazobactam und Imipenem, protokolliert oder gar nicht berichtet werden. Der Grund dafür ist, daß in den meisten Fällen dokumentierte Infektionen durch methicillinresistente Staphylokokken nur schlecht auf β-Lactam-Antibiotika angesprochen haben und bisher klinisch überzeugende Daten zur Dokumentation der klinischen Wirksamkeit eben genannter Substanzen fehlen.⁶ Staphylokokken-Isolate, die nachweislich das *mecA*-Gen tragen oder das *mecA*-Gen-Produkt PBP 2a produzieren, sollten als oxacillinresistent angegeben werden.

Die Interpretationskriterien für koagulasenegative Staphylokokken korrelieren mit dem Vorhandensein oder Fehlen des Methicillin-Resistenz-Gens (*mecA*) bei *S. epidermidis*. Diese Interpretationskriterien können bei Resistenz anderer koagulasenegativer Staphylokokken wie *S. lugdunensis* oder *S. saprophyticus* vorrangig sein. Bei schwerwiegenden Infektionen mit koagulasenegativen Staphylokokken außer *S. epidermidis* ist ein Test auf *mecA* oder das von *mecA* exprimierte penicillinbindende Protein 2a (PBP 2a oder PBP 2' bei Stämmen mit Zonendurchmessern im intermediären oder resistenten Bereich ggf. angebracht). Isolate, die *mecA* nachweislich nicht tragen oder das PBP 2a nicht produzieren, sollten als oxacillinempfindlich angegeben werden.

Es wurde berichtet, daß der Blättchenempfindlichkeitstest keine genaue Methode für die Bestimmung der Methicillin-(Oxacillin)-Empfindlichkeit bei koagulasenegativen Staphylokokken (d.h. *S. saprophyticus*) ist.¹⁰ Eine Routinetestung von *S. saprophyticus*-Urinisolaten wird nicht empfohlen, da Infektionen auf Konzentrationen reagieren, die von den herkömmlicheren zur Behandlung akuter, unkomplizierter Harnwegsinfektionen verwendeten Antibiotika (wie Nitrofurantoin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol oder ein Fluorchinolon) im Urin erzielt werden.

Bei *Haemophilus*-Spezies, *N. gonorrhoeae* und *Moraxella catarrhalis* kann ein schnell reagierender β-Lactamase-Test (z.B. mit **Cefinase**-Blättchen) schneller klinisch relevante Ergebnisse liefern als ein Blättchen-Diffusionstest. Ein β-Lactamase-Test ist auch der einzig zuverlässige Test zum Nachweis von β-Lactamase-produzierenden *Enterococcus*-Spezies. Mit einem positiven β-Lactamase-Test kann Resistenz gegen Penicillin, Ampicillin und Amoxicillin bei *Haemophilus*-Spezies, *N. gonorrhoeae* und *M. catarrhalis* und Resistenz gegen Penicillin, einschließlich Acylamino-, Carboxyl- und Ureido-Penicilline bei Staphylokokken und Enterokokken vorausgesagt werden. Ein negativer β-Lactamase-Test schließt eine Resistenz aufgrund anderer Mechanismen nicht aus. *Enterobacteriaceae*- und *Pseudomonas*-Spezies und andere aerobe gramnegative Bakterien sollten nicht getestet werden, da die Ergebnisse keine sichere Vorhersage der Empfindlichkeit gegen die therapeutisch am häufigsten verwendeten β-Lactam-Antibiotika erlauben. Zum genauen Nachweis von β-Lactamase bei Staphylokokken ist u.U. eine Enzyminduktion und Inkubation eines Tests auf Nitrocefin-Basis bis zu 1 h erforderlich. Dies läßt sich leicht erreichen, indem Bakterien vom Rand der Hemmzone eines Oxacillin-Blättchens getestet werden. Auf die Erhaltung genauer Ergebnisse muß sorgfältig geachtet werden. Hierzu gehört das Testen bekannter positiver und negativer Kontrollstämme zur Zeit der Untersuchung von klinischen Isolaten.⁶

Von der U.S. Food and Drug Administration zugelassene Empfindlichkeitstests für Penicilline und andere β-Lactame zur Behandlung von Streptokokken der Gruppen A und B sind nicht uneingeschränkt für klinische Zwecke geeignet und müssen nicht routinemäßig durchgeführt werden, da wie bei Vancomycin resistente Stämme nicht bekannt sind. Einige Stämme von *S. agalactiae* können jedoch intermediäre Ergebnisse hinsichtlich Penicillin ergeben. Für pharmazeutische Entwicklungen, epidemiologische Zwecke oder zur Überwachung auf sich entwickelnde Resistenzen werden Interpretationskriterien zur Verfügung gestellt. Ein als intermediär oder resistent bewerteter Stamm sollte zur Bestätigung an ein Referenzlabor weitergegeben werden.

Blättchen-Diffusionstests mit Ampicillin, Penicillin und Rifampin für *Neisseria meningitidis* sind unzuverlässig. Minimale Hemmkonzentration (MHK)-Tests sollten für diese Organismen benutzt werden.⁷

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

- Der hier beschriebene Test gilt hauptsächlich für schnell wachsende aerobe Erreger. Anspruchsvolle Bakterien, außer *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* und anderen Streptokokken, sollten mit einem Verdünnungsverfahren getestet werden.⁹ Anaerobier müssen mit Spezialverfahren getestet werden.¹¹
- Die Einteilung in resistente, intermediäre und empfindliche Bakterien unterscheidet sich nur durch einen Millimeter, was innerhalb des normalen Laborfehlerbereichs liegt. Bei einigen Kulturen erhält man Hemmzonen im Grenzbereich, die von Tag zu Tag oder Labor zu Labor anders ausfallen können. Allerdings sind solche Kulturen relativ selten.
- Zum Resistenznachweis von Pneumokokken und Enterokokken müssen die vom NCCLS empfohlenen Methoden strikt befolgt werden.⁶
- Unter Umständen werden derzeitige andere als die in der Tabelle aufgeführten antimikrobiellen Substanzen verwendet. Die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung solcher Substanzen müssen auf der Grundlage der Anwesenheit oder des Fehlens einer definierten Hemmzone interpretiert werden. Außerdem müssen diese Ergebnisse solange als qualitativ angesehen werden, bis eine Hemmzoneninterpretation erarbeitet wurde. Alle Hemmzonendurchmesser müssen schriftlich festgehalten werden.
- ESBL-Bestätigungstests sind nur gültig, wenn die vier Blättchen (Cefotaxim, Cefotaxim/Clavulansäure, Ceftazidim, Ceftazidim/Clavulansäure) gleichzeitig eingesetzt werden. Ein einzelner Einsatz dieser Blättchen wird vom NCCLS nicht empfohlen.^{6,7}

† Teilweise übernommen und angepaßt von NCCLS-Dokument M100-513 (M2): Disk Diffusion Supplemental Tables, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, mit Erlaubnis. Das vollständige Normenwerk ist erhältlich vom National Committee for Clinical Laboratory Standards, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA. Nicht im Dokument M100-513 aufgeführte Werte werden in anderen Fußnoten erläutert. Siehe M100-513 für entsprechende MHK-Korrelate.

- Die Kategorie „Intermediär“ beinhaltet auch Isolate mit MHK von antimikrobiellen Substanzen. Die MHK-Werte für diese Isolate nähern sich den normalerweise erreichbaren Blut- und Gewebespiegeln und die Reaktivitäten sind möglicherweise geringer als bei empfindlichen Isolaten. Die Kategorie „Intermediär“ bedeutet klinische Anwendbarkeit an Körperstellen, an denen die Arzneimittel physiologisch konzentriert sind (z.B. Chinolone und β-Lactame im Urin), oder wenn eine höher als normale Dosis des Arzneimittels verwendet werden kann (z.B. β-Lactame). Die Kategorie „Intermediär“ beinhaltet auch eine „Pufferzone“, die verhindern sollte, daß kleine unkontrollierte technische Faktoren größere Diskrepanzen bei der Interpretation verursachen, besonders bei Arzneimitteln mit einem kleinen pharmakotoxischen Sicherheitsbereich.

- b Richtlinien bezüglich der Erstellung von kumulativen Antibiogrammen sollten in Zusammenarbeit mit der für Infektionskrankheiten zuständigen Behörde, dem Seuchenbekämpfungspersonal und dem Pharmazie- und Therapieausschuß erarbeitet werden. In den meisten Fällen sollte der prozentuale Anteil von empfindlichen und intermediären Ergebnissen nicht in denselben Statistiken zusammengefaßt werden.
- c Diese Zonendurchmesser und Qualitätskontrollgrenzen gelten nur für Tests mit *Haemophilus*-Spezies im Haemophilus-Testmedium (HTM) bei Inkubation in 5 % CO₂ (16–18 h). *H. influenzae* ATCC 10211 wird als ein zusätzlicher nützlicher Qualitätskontrollstamm empfohlen, um die wachstumsfördernden Eigenschaften von HTM zu überprüfen. Der Zonenrand sollte als der Bereich betrachtet werden, in dem mit dem bloßen Auge kein Wachstum festzustellen ist. Schwaches Wachstum in winzigen Kolonien, das aus der offensichtlicheren Zone heraus schnell schwächer wird, sollte in den Messungen ignoriert werden.
- d Diese Zonendurchmesser und Qualitätskontrollgrenzen gelten nur für Tests, die unter Verwendung von GC-Agarbasen und 1 % definiertem Wachstumssupplement (z.B. BBL GC II Agar mit IsoVitalEX Anreicherungsmedium) und Inkubation in 5%igem CO₂ (20–24 h) durchgeführt wurden.
- e Diese Zonendurchmesser und Qualitätskontrollgrenzen gelten nur für Tests, die unter Verwendung von Mueller-Hinton-Agar mit 5 % defibriertem Schafblut durchgeführt und in 5%igem CO₂ (20–24 h) inkubiert wurden. Richtlinien der Interpretation gelten für *S. pneumoniae* und für andere Streptokokken wie angegeben. Bei Anwendung der spezifischen Kriterien auf andere als die hier angegebenen Organismen kann es zu falschen Ergebnissen kommen. Die vorgeschlagenen Interpretationskriterien für Streptokokken außer *S. pneumoniae* beruhen auf den Populationsverteilungen verschiedener Spezies, der Pharmakokinetik antimikrobieller Agenzien, früher veröffentlichten Ergebnissen und der klinischen Erfahrung bestimmter Mitglieder des NCCLS-Unterausschusses. Systematisch gewonnene klinische Daten für viele Verbindungen in dieser Gruppe standen zur Überprüfung nicht zur Verfügung.⁷ Trotz des Fehlens von zuverlässigen Interpretationskriterien zur Blättchendiffusion von bestimmten β-Lactamen mit *S. pneumoniae* ist *S. pneumoniae* ATCC 49619 für alle *Streptococcus*-Spezies der zur Qualitätskontrolle aller Diffusionstests designierte Stamm.
- f Von der FDA zugelassene Empfehlungen des Arzneimittelherstellers bezüglich der Hemmzonengröße sind in NCCLS Dokument M100-513 (M2-A8) nicht enthalten.⁷
- g Zur Qualitätskontrolle von Blättchen, die Kombinationen von β-Lactamen und β-Lactamase-Hemmstoffen enthalten, ist ein anderer Stamm von *E. coli* (ATCC 35218) bestimmt worden. Dieser Stamm produziert β-Lactamase, die durch den Hemmstoff inaktiviert werden sollte. Bei Verwendung in Verbindung mit ATCC 25922 können beide Komponenten der Kombinationsblättchen überwacht werden. Die Kontrollgrenzen mit diesem Stamm für Amoxicillin/Clavulansäure betragen 17–22 mm, für Ampicillin/Sulbactam 13–19 mm, für Piperacillin 12–18 mm, für Piperacillin/Tazobactam 24–30 mm und für Ticarcillin/Clavulansäure 21–25 mm.
- h Isolate von Pneumokokken mit Oxacillin-Hemmzonen von ≥20 mm Größe sind empfindlich (MHK ≤0,06 µg/mL) gegen Penicillin und können für zugelassene Indikationen als empfindlich gegen Ampicillin, Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin/Sulbactam, Cefaclor, Cefdinir, Cefepim, Cefetamet, Cefixim, Cefotaxim, Cefprozil, Cefbuten, Ceftriaxon, Cefuroxim, Cefpodoxim, Ceftizoxim, Ertapenem, Imipenem, Loracarbef und Meropenem angesehen werden; diese Substanzen brauchen nicht geprüft zu werden. Bei Isolaten mit Oxacillin-Zonengrößen von ≤19 mm sollten die MHK für Penicillin, Meropenem und Cefotaxim oder Ceftriaxon bestimmt werden, da Zonen von ≤19 mm Größe bei penicillinresistenten oder -intermediären Stämmen oder bei bestimmten empfindlichen Stämmen auftreten. Isolate sollten nicht allein aufgrund einer Oxacillinhemmzone von ≤19 mm als penicillinresistent oder -intermediär protokolliert werden. Amoxicillin, Ampicillin, Cefepim, Cefotaxim, Ceftriaxon, Cefuroxim, Ertapenem, Imipenem und Meropenem können zur Behandlung von Pneumokokken-Infektionen eingesetzt werden, es gibt derzeit jedoch keine zuverlässigen Blättchendiffusions-Empfindlichkeitstests für diese Substanzen. Ihre *In-vitro*-Aktivität wird am besten mit Hilfe einer MHK-Methode bestimmt. Penicillin, Cefotaxim oder Ceftriaxon und Meropenem sollten mit einer empfindlichen MHK-Methode (z.B. die im NCCLS-Dokument M77 beschriebene) geprüft und routinemäßig mit *S. pneumoniae*-Isolaten aus Zerebrospinalflüssigkeit protokolliert werden. Solche Isolate sollten mit der MHK-Methode oder einem Blättchentest ebenfalls gegen Vancomycin getestet werden. Bei Isolaten von anderen Körperstellen kann der Oxacillin-Blättchentest verwendet werden. Wenn die Oxacillinzone ≤19 mm ist, sollten die MHK für Penicillin und Cefotaxim oder Ceftriaxon bestimmt werden. Zur Bestimmung der Empfindlichkeit von anderen Streptokokken als *S. pneumoniae* gegen Cefdinir wird das 10-Einheiten-Penicillinblättchen verwendet; Isolate mit Größen der Penicillinzone von ≥28 mm sind penicillinempfindlich und können auch als empfindlich gegen Cefdinir betrachtet werden.
- i Ein gegen Penicillin empfindliches Streptokokken-Isolat kann für zugelassene Indikationen als empfindlich gegen Ampicillin, Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin/Sulbactam, Cefaclor, Cefazolin, Cefdinir, Cefepim, Cefprozil, Cefotaxim, Cefbuten (nur Streptokokken der Gruppe A), Ceftriaxon, Cefuroxim, Cefpodoxim, Ceftizoxim, Cephalothin, Cephadrin, Ertapenem (nur β-hämolytische Streptokokken), Imipenem, Loracarbef und Meropenem angesehen werden und muß gegen diese Substanzen nicht geprüft werden. Aus Blut und normalerweise sterilen Körpergeweben (z.B. Zerebrospinalflüssigkeit, Knochen etc.) isolierte Viridans-Streptokokken sollten mit einer MHK-Methode auf Penicillin- oder Ampicillinempfindlichkeit geprüft werden.
- j Penicillinempfindliche Staphylokokken sind auch gegen andere Penicillinarten, β-Lactam/β-Lactamase-Hemmstoff-Kombinationen, Cephe und Carbapeneme empfindlich, die von der FDA für Infektionen mit Staphylokokken genehmigt sind. Penicillinresistente, oxacillinempfindliche Stämme sind gegen penicillininaselelabile Penicilline resistent, aber empfindlich gegen andere penicillinaselelabile Penicilline, β-Lactam/β-Lactamase-Hemmstoff-Kombinationen, relevante Cephe und Carbapeneme. Oxacillinresistente Staphylokokken weisen Resistenz gegen alle derzeit erhältlichen β-Lactam-Antibiotika auf. Deshalb kann Empfindlichkeit oder Resistenz gegen eine Reihe von β-Lactam-Antibiotika nach einem Empfindlichkeitstest nur gegen Penicillin und Oxacillin abgeleitet werden. Das routinemäßige Testen anderer Penicilline, β-Lactam/β-Lactamase-Hemmstoff-Kombinationen, Cephe und Carbapeneme wird nicht empfohlen.⁷ Oxacillinresistente Staphylokokken sollten als resistent oder gar nicht berichtet werden.
- k Seltene, β-Lactamase-negative, ampicillinresistente (BLNAR) Stämme von *Haemophilus influenzae* sollten als resistent gegen Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin/Sulbactam, Cefaclor, Cefetamet, Cefonicid, Cefprozil, Cefuroxim und Loracarbef angesehen werden, obwohl einige BLNAR-Stämme eine scheinbare *In-vitro*-Empfindlichkeit gegenüber diesen Agenzien aufweisen.
- l Gruppenrepräsentativ für Ampicillin und Amoxicillin.
- m Bei *V. cholerae* stimmen die Ergebnisse der Blättchen-Diffusions-Test auf Empfindlichkeit gegen Ampicillin, Tetracyclin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Sulfonamide (z.B. Prozentsatz von empfindlich, intermediär und resistent) mit den Ergebnissen, die mit der Bouillon-Mikroverdünnung bestimmt wurden, gut überein. Tetracyclin-Ergebnisse können dazu benutzt werden, um die wahrscheinliche Empfindlichkeit von Isolaten gegen Doxycyclin vorherzusagen; Blättchen-Tests sollten für Doxycyclin oder Erythromycin nicht benutzt werden, da keine gute Übereinstimmung mit MHK-Ergebnissen vorliegt.
- n Ampicillin ist gruppenrepräsentativ für Ampicillin und Amoxicillin. Die Ergebnisse des Ampicillin-Tests können zur Vorhersage der Empfindlichkeit gegen Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin/Sulbactam, Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam unter nicht-β-Lactamase-produzierenden Enterokokken verwendet werden. Die Penicillinempfindlichkeit kann zur Vorhersage der Empfindlichkeit für Ampicillin, Amoxicillin, Ampicillin/Sulbactam, Amoxicillin/Clavulansäure, Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam unter nicht-β-Lactamase-produzierenden Enterokokken verwendet werden. Die Kategorie „Empfindlich“ für Penicillin oder Ampicillin impliziert, daß eine Hochdosis-Therapie gegen schwere Infektionen durch Enterokokken erforderlich ist. Eine durch Enterokokken ausgelöste Endokarditis erfordert eine Kombinationstherapie mit Penicillin oder Ampicillin hoher Dosis oder Vancomycin, oder Teicoplanin plus Gentamicin oder Streptomycin zur bakteriziden Wirkung. Da eine Ampicillin- oder Penicillinresistenz bei Enterokokken infolge der Produktion von β-Lactamase mit routinemäßigen Blättchen- oder Verdünnungsmethoden nicht zuverlässig erkannt werden kann, wird für Isolate aus Blut und Zerebrospinalflüssigkeit ein direkter, auf Nitrocefin basierender β-Lactamasetest empfohlen. Ein positiver β-Lactamasetest sagt eine Resistenz gegen Penicillin sowie Acylamino-, Carboxy- und Ureidopenicilline voraus. Bestimmte penicillin- oder ampicillinresistente Enterokokken können eine sehr hohe Resistenz aufweisen (d.h. Penicillin-MHK ≥128 µg/mL oder Ampicillin-MHK ≥64 µg/mL). Der Blättchentest erlaubt keine Differenzierung zwischen normaler Resistenz und dieser sehr hohen Resistenz. Bei aus Blut und Zerebrospinalflüssigkeit isolierten Enterokokken sollte das Labor eine Bestimmung des eigentlichen MHK für Penicillin oder Ampicillin in Betracht ziehen, da Stämme von *E. faecium* mit normalerweise niedriger Resistenz (Penicillin-MHK ≤64 µg/mL und Ampicillin ≤32 µg/mL) als potentiell empfindlich für eine synergetische Wirkung mit einem Aminoglykosid (in Abwesenheit von hoher Aminoglykosidresistenz) angesehen werden sollten, während Stämme mit einer höheren Resistenz für eine solche Synergie unempfindlich sein können.⁵
- o Synergismus zwischen Ampicillin, Penicillin oder Vancomycin und einem Aminoglykosid kann für Enterokokken durch Verwendung eines Reihentests mit hohen Konzentrationen von Aminoglykosiden (Gentamicin und Streptomycin) vorhergesagt werden. Andere Aminoglykoside müssen nicht getestet werden, weil ihre Aktivität gegen Enterokokken nicht besser als die von Gentamicin und Streptomycin ist.
- p Die Ergebnisse von Ampicillin-Empfindlichkeitstests sollten zur Vorhersage der Amoxicillinaktivität verwendet werden. Die meisten *H. influenzae*-Isolate, die gegen Ampicillin und Amoxicillin resistent sind, produzieren eine TEM-Typ-β-Lactamase. In den meisten Fällen kann ein direkter β-Lactamase-Test Ampicillin- und Amoxicillinresistenz schnell feststellen.
- q Kann für *Acinetobacter*-Spezies als resistent gegen andere Agenzien dokumentiert werden.
- r Bei Isolaten aus der Harnröhre nicht routinemäßig dokumentiert.
- s Die Verwendung von Erythromycin kann Empfindlichkeit und Resistenz gegen Azithromycin, Clarithromycin und Dirithromycin vorhersagen.
- t Siehe Besprechung von ESBL unter „ERGBNISSE“. Hinsichtlich Screening- und Bestätigungstests für ESBL in *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* und *E. coli*, siehe den Abschnitt „ERGBNISSE“. Hinsichtlich Screening- und Bestätigungstests für ESBL in *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* und *E. coli*, siehe den Abschnitt „ERGBNISSE“. Muellers Grenzwerte (Mueller-Hinton-Agar, Standard-Blättchendiffusionsverfahren, 35 °C, Umgebungsluft, 16–18 h) sind: Aztreonam (≤27 mm), Ceftazidim (≤27 mm), Cefotaxim (≤27 mm), Cefpodoxim (≤17 mm) und Ceftriaxon (≤25 mm). Qualitätskontrollempfehlungen sind *E. coli* ATCC 25922 (wie in der Tabelle aufgeführt); *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Aztreonam 9–17 mm), Ceftazidim (10–18 mm), Cefotaxim (17–25 mm), Cefpodoxim (9–16 mm) und Ceftriaxon (16–24 mm).⁷ Die Empfindlichkeit der Bestimmung wird durch Anwendung von mehr als einem Antibiotikum beim Screening verbessert. Phänotypische Bestätigungstests erfordern die Anwendung von Cefotaxim und Ceftazidim zusammen, allein und in Kombination mit Clavulansäure. Ein Hemmzonendurchmesser von ≥5 mm für einen der antimikrobiellen Wirkstoffe, in Verbindung mit Clavulansäure getestet, gegenüber seiner Hemmzone, wenn dieser Wirkstoff allein getestet wird, = ESBL Qualitätskontrollempfehlungen sind: negativer Stamm *E. coli* ATCC 25922, der eine Vergrößerung des Hemmzonendurchmessers um ≤2 mm bei einem allein getesteten antimikrobiellen Wirkstoff bewirkt, gegenüber seiner Hemmzone bei einer Prüfung in Kombination mit Clavulansäure; positiver Stamm *K. pneumoniae* ATCC 700603, der eine Vergrößerung des Cefotaxim-Hemmzonendurchmessers um ≥3 mm und des Ceftazidim-Hemmzonendurchmessers um ≥5 mm bewirkt. (Siehe „Verfahrensbeschränkungen“.) Einzelheiten des Verfahrens werden in Referenz 7 beschrieben.
- u Cephalothin kann dazu verwendet werden, um Aktivität von Cephalotin, Cephadrin, Cephalexin, Cefaclor und Cefadroxil vorherzusagen. Cefazolin, Cefuroxim, Cefpodoxim, Cefprozil und Loracarbef (nur für Urin-Isolate) können individuell getestet werden, da manche Isolate gegen diese Agenzien empfindlich sein könnten, wenn sie gegen Cephalotin resistent sind.
- v Nicht anwendbar zur Prüfung von *Morganella*-Spezies.
- w Für *N. gonorrhoeae* zeigt ein intermediäres Ergebnis für einen antimikrobiellen Wirkstoff das Vorliegen eines technischen Problems an, das durch wiederholtes Testen zu korrigieren ist, oder das Fehlen der klinischen Erfahrung bei der Behandlung von Organismen mit diesen Zonen. Das letztere scheint bei Cefmetazol, Cefotetan, Cefoxitin und Spectinomycin vorzuliegen. Stämme mit intermediären Zonen gegen die anderen Wirkstoffe besitzen eine dokumentierte, niedrigere klinische Heilungsquote (85–95 %) als empfindliche Stämme (>95 %).
- x Cefotaxim, Ceftizoxim oder Ceftriaxon sollten bei ZSF-Isolaten anstelle von Cephalothin und Cefazolin getestet und angegeben werden.
- y Da berichtet wurde, daß bestimmte Stämme von *Providencia*-Spezies mit Cefprozil-Blättchen falsch-empfindliche Ergebnisse liefern, sollten Stämme dieses Genus mit diesem Blättchen nicht getestet und berichtet werden.
- z Nur für Urin-Isolate angezeigt. Außer zum Testen von Urinisolaten kann Nalidixinsäure bei Isolaten von Patienten mit extraintestinalen *Salmonella*-Infektionen zum Testen auf reduzierte Fluorchinolone-Empfindlichkeit eingesetzt werden. Siehe Fußnote ddd.
- aa *Staphylococcus*-Spezies kann während einer längeren Therapie mit Chinolonen resistent werden. Deshalb können anfangs empfindliche Isolate innerhalb von 3 bis 4 Tagen nach Therapiebeginn resistent werden. Wiederholte Isolate-Tests müssen ggf. durchgeführt werden.
- bb Für *V. cholerae* vorsichtig benutzen, da der Blättchen-Diffusionstest viele Organismen falsch klassifizieren könnte (höhere Fehlerrate).
- cc Zur Unterstützung einer Prüfung dieses Arzneimittels mit *Streptococcus pneumoniae* wurden noch keine Kriterien festgelegt. Der Kontrollbereich wird ausschließlich für Qualitätskontrollzwecke angegeben.
- dd Colistin und Polymyxin B diffundieren schlecht in Agar und die Genauigkeit der Diffusionsmethode ist deshalb geringer als bei anderen Antibiotika. Resistenz ist immer signifikant, aber bei der Behandlung von systemischen Infektionen aufgrund empfindlicher Stämme ist es angeraten, die Ergebnisse eines Diffusionstests mit einem Verdünnungstest zu bestätigen.
- ee Organismen, die gegenüber Tetracyclin empfindlich sind, werden ebenfalls als empfindlich gegenüber Doxycyclin und Minocyclin angesehen. Einige Organismen, die intermediär oder resistent gegen Tetracyclin sind, können jedoch empfindlich gegenüber Doxycyclin oder Minocyclin bzw. beide Antibiotika sein.
- ff Von der FDA für *S. saprophyticus* und *S. epidermidis* (nicht *S. aureus*) zugelassen.
- gg Für Kontrollgrenzen der Blättchen mit 120 µg Gentamicin und 300 µg Streptomycin ist *E. faecalis* ATCC 29212 zu verwenden (Gentamicin: 16–23ⁱⁱ mm; Streptomycin: 14–20ⁱⁱⁱ mm).
- hh Wenn die Hemmzone 7–9 mm groß ist, ist der Test ergebnislos und ein Agarverdünnungstest oder ein Bouillon-Mikroverdünnungstest ist durchzuführen, um die Resistenz zu bestätigen.
- ii Vom NCCLS empfohlene Hemmzonengrößen, die sich von der FDA zugelassenen Empfehlungen für Hemmzonengrößen unterscheiden.
- kk Da berichtet wurde, daß bestimmte Stämme von *Citrobacter*, *Providencia* und *Enterobacter*-Spezies mit Cefdinir und Loracarbef-Blättchen falsch-empfindliche Ergebnisse liefern, sollten Stämme dieser Genera mit diesen Blättchen nicht getestet und berichtet werden.
- ll Da Methicillinpuder nicht erhältlich ist, werden Methicillin-Blättchen nicht mehr zur Verfügung gestellt.
- mm Zur Unterstützung einer Prüfung dieses Arzneimittels mit *Pseudomonas aeruginosa* wurden noch keine Kriterien festgelegt. Der Kontrollbereich wird ausschließlich für Qualitätskontrollzwecke angegeben.
- nn Von den gegen Staphylokokken wirksamen, penicillinasestabilen Penicillinen kann Oxacillin getestet werden und die Ergebnisse sind auf die anderen penicillinasestabilen Penicilline, Cloxacillin und Diclaxacillin übertragbar. Oxacillin wird bevorzugt, da es lagerungsstabiler ist und mit höherer Wahrscheinlichkeit heteroresistente Staphylokokkenstämme detektiert. Cloxacillin-Blättchen sollten nicht verwendet werden, da sie unter Umständen bei oxacillinresistentem *S. aureus* unwirksam sind. Werden für *S. aureus* intermediäre Ergebnisse erhalten, muß der Oxacillin-Salzagar-Screeningtest durchgeführt werden. (Siehe M7-A6⁹.)
- oo Nach einer Inkubationszeit von 24 h das leichte Wachstum innerhalb der Hemmzone des Oxacillin-Blättchens mit durchscheinendem Licht untersuchen (Platte gegen das Licht halten). Methicillinresistente Staphylokokken (MRS) sind gewöhnlich gegen mehrere Antibiotikaklassen resistent, einschließlich Aminoglykoside, Macrolide, Clindamycin, Phenicol, Chinolone, Sulfonamide und Tetracyclin. Eine festgestellte Mehrfachresistenz sollte als Hinweis auf die Möglichkeit einer Methicillin-Resistenz gedeutet werden. Methicillinresistente *S. aureus*-Stämme, die gegen andere Antibiotikaklassen nicht resistent sind, wurden jedoch sowohl von stationären als auch ambulanten Patienten isoliert.
- pp Penicillinresistente, oxacillinempfindliche *Staphylococcus aureus*-Stämme produzieren β-Lactamase und es wird empfohlen, das 10-Einheiten-Penicillin-Blättchen statt dem Ampicillin-Blättchen zu testen. Penicillin sollte zur Empfindlichkeitsprüfung aller β-Lactamase-lablen Penicilline, wie z.B. Ampicillin, Amoxicillin, Azlocillin, Carbenicillin, Mezlocillin, Piperacillin und Ticarcillin, verwendet werden. Gießermaßen sagt ein positiver β-Lactamase-Test Resistenz gegen diese Agenzien vorher.⁶ Oxacillinresistente Staphylokokken sollten als resistent oder gar nicht angegeben werden.
- qq Ein positiver β-Lactamase-Test sagt Resistenz gegen Penicillin, Ampicillin und Amoxicillin vorher. Ein β-Lactamase-Test weist eine Form der Penicillinresistenz in *N. gonorrhoeae* nach und kann auch zum Erhalt epidemiologischer Informationen eingesetzt werden. Stämme mit chromosomvermittelter Resistenz können nur durch zusätzliche Empfindlichkeitstests wie z.B. die Blättchen-Diffusionsmethode oder Agarverdünnung-MHK-Methode nachgewiesen werden. Gonokokken mit Penicillin (10 E)-Hemmzonendurchmessern von ≤19 mm sind wahrscheinlich β-Lactamase-produzierende Stämme. Zur schnellen, genauen Erkennung dieser Plasmid-vermittelten Penicillin-Resistenz ist der β-Lactamase-Test jedoch anderen Empfindlichkeitsüberprüfungen überlegen.
- rr *S. pyogenes*-Empfindlichkeitstests gegen Penicillin sind selten notwendig, da dieser Mikroorganismus allgemein penicillinempfindlich ist. Manche *S. agalactiae*-Stämme zeigen jedoch penicillinintermediäre Ergebnisse auf.⁷
- ss Für Chemotherapie sollte Rifampin nicht allein benutzt werden.⁷
- tt Das Sulfoxazol-Blättchen kann für alle derzeit erhältlichen Sulfonamide verwendet werden. Medien, die Blut enthalten (außer lysiertem Perdeblut), sind normalerweise zur Prüfung von Sulfonamiden und Trimethoprim nicht geeignet. Zur Prüfung von Sulfonamiden und/oder Trimethoprim sollte der Mueller-Hinton-Agar so weit wie möglich frei sein von Thymidin. Um zu bestimmen, ob die Konzentrationen von Thymidin und Thymidin im Mueller-Hinton-Agar gering genug sind, kann *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, oder ATCC 33186 mit dem Trimethoprim-Sulfamethoxazol-Blättchen getestet werden (siehe Literaturangabe 12). Eine Hemmzone von ≥20 mm, die im wesentlichen frei ist von feinen Kolonien, zeigt an, daß hinreichend geringe Konzentrationen von Thymidin und Thymidin vorliegen.⁶
- uu Gonokokken mit 30-µg-Tetracyclin-Blättchenzonendurchmessern von ≤19 mm zeigen üblicherweise Isolate von *N. gonorrhoeae* mit plasmidvermittelter Tetracyclinresistenz (TRNG) an. Diese Stämme sollten durch einen Verdünnungstest (MHK ≥16 µg/mL) bestätigt und/oder an ein Labor der Gesundheitsbehörde zur epidemiologischen Untersuchung geschickt werden.
- vv Alle Staphylokokken-Isolate mit Hemmzonendurchmessern von 14 mm oder weniger sollten mit einer MHK-Methode nachgeprüft werden. Alle vancomycinresistenten Staphylokokken-Isolate sollten an ein Referenzlabor gesendet werden.⁷ Der Blättchendiffusionstest differenziert Stämme mit reduzierter Vancomycin-Empfindlichkeit (MHK 4 bis 8 µg/mL) nicht von empfindlichen Stämmen (MHK 0,5 bis 2 µg/mL), selbst bei einer Inkubationszeit von 24 h. Zum Nachweis von Stämmen mit einer Vancomycin-MHK von 4 bis 8 µg/mL muß ein MHK-Test durchgeführt werden. Der für Enterokokken beschriebene Vancomycinagar-Screeningtest kann mit Erfolg zur Bestimmung dieser Isolate eingesetzt werden (Inkubation der Platten über volle 24 h bei 35 °C). Das Ergebnis sollte über einen MHK-Test bestätigt werden. Zur Gewährleistung der Spezifität ist es besonders wichtig, daß ein empfindlicher Qualitätskontrollstamm wie z.B. *S. aureus* ATCC 29213 verwendet wird. Solange keine weiteren Daten zur Prävalenz oder klinischen Signifikanz dieser Isolate vorliegen, sollte das Labor eine besonders sorgfältige Untersuchung der MRSA-Stämme hinsichtlich erhöhter MHK bei Vancomycin in Betracht ziehen.⁶
- ww Bei der Prüfung von Vancomycin gegen Enterokokken sollten die Platten für 24 h aufbewahrt und im Transmissionslicht untersucht werden; die Anwesenheit eines Schleiers oder jede Art von Wachstum innerhalb der Hemmzone zeigt Resistenz an. Organismen mit intermediären Hemmzonen sollten mit einer im NCCLS-Dokument M7 beschriebenen MHK-Methode geprüft werden. Siehe auch den in der MHK-Tabelle 2D (M100-513) beschriebenen Vancomycinagar-Screeningtest.⁹
- xx Bisher wurde kein *S. pneumoniae*-Stamm mit einem Hemmzonendurchmesser von <17 mm beobachtet. Derartige Stämme an ein Referenzlabor schicken.⁷

- yy Aufgrund begrenzter Alternativen können Chloramphenicol, Erythromycin, Tetracyclin (bzw. Doxycyclin oder Minocyclin) und Rifampin für vancomycinresistente Enterokokken (VRE) verwendet werden; Konsultation mit einem Facharzt für Infektionskrankheiten wird empfohlen.⁷
- aaa Stämme β -hämolytischer Streptokokken mit Ampicillin-, Cefepim-, Cefotaxim-, Ceftriaxon- oder Penicillin-Hemmzonendurchmessern von <24 mm sind noch nicht beobachtet worden; solche Stämme sollten an ein Referenzlabor eingesendet werden.
- bbb Oxacillin-Blättchen lassen sich am besten mit *S. aureus* ATCC 25293 auf einen möglichen Verderb hin überprüfen; der akzeptable Hemmzonendurchmesser beträgt 18–24 mm.
- ccc Für Ampicillin, Cefepim, Cefotaxim, Ceftriaxon und Penicillin schließt das Ergebnis **nr β -hämolytische Streptokokken** die große Kolonien bildenden pyogenen Streptokokkenstämme mit Gruppe A- (*S. pyogenes*), C- oder G-Antigenen und Stämme mit Group B-Antigenen (*S. agalactiae*) ein. Für Cefepim, Cefotaxim und Ceftriaxon schließt das Ergebnis **Viridans-Streptokokken** die kleine Kolonien bildenden β -hämolytischen Stämme mit Gruppe A-, C-, F- oder G-Antigenen (*S. anginosus*, vormalis *S. milleri*) sowie *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. mutans* und *S. bovis* ein.
- ddd Fluorchinolonempfindliche *Salmonella*-Stämme, die im Test gegen Nalidixinsäure resistent sind, können mit einem Therapieversagen oder einer verzögerten Wirkung bei fluorochinolonbehandelten Patienten mit extraintestinaler Salmonellose assoziiert sein. Die Prüfung extraintestinaler *Salmonella*-Isolate auf Resistenz gegen Nalidixinsäure sollte erwägt werden.

LITERATURNACHWEIS: S. "References" im englischen Text.

BD Dischi BBL Sensi-Disc per test di sensibilità agli antibiotici

Italiano

USO PREVISTO – Questi dischi sono usati per il test semi-quantitativo *in vitro* della sensibilità agli antibiotici di comuni batteri patogeni a crescita rapida e di alcune specie esigenti, mediante disco-diffusione in agar. Tali batteri comprendono *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Vibrio cholerae* e - attraverso procedure modificate - *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* e altri streptococchi. NOTA: per le procedure speciali richieste per testare pneumococchi, enterococchi e stafilococchi meticillino/oxacillino-resistenti, nonché per il test delle β -lattamasi ed eseguire i test di screening e di conferma per ESSL, vedere la sezione "RISULTATI".

Per i criteri di interpretazione del diametro di zona adottati in Francia, vedere le istruzioni riportate nella sezione in lingua francese di questo inserto.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE – I metodi di diffusione in agar, che impiegano dischi di carta da filtro asciutti e impregnati con concentrazioni specifiche di agenti antibiotici, furono sviluppati negli Anni 40. Al fine di eliminare o minimizzare la componente di variabilità in questi test, Bauer et al. svilupparono una procedura standardizzata che utilizzava l'agar Mueller Hinton come terreno di coltura.^{1,2}

Successivamente, varie agenzie di regolamentazione e organizzazioni preposte alla definizione di norme pubblicarono procedure di riferimento standardizzate basate sul metodo Bauer-Kirby. Le procedure pubblicate dalla U.S. Food and Drug Administration (FDA)³ e dall'Organizzazione Mondiale per la Sanità (OMS) furono tra le prime e più largamente accettate.^{4,5} Le procedure vennero adottate come consensus standard dal National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) e sono oggetto di periodici aggiornamenti.^{6,7} Per le raccomandazioni vigenti, consultare la documentazione NCCLS più recente in merito.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA – I dischi contenenti un'ampia varietà di agenti antibiotici vengono applicati sulla superficie delle piastre agar Mueller Hinton (o terreno agar Haemophilus Test Medium (HTM) per *H. influenzae*, Agar GC II con IsoVitalEx Enrichment per *N. gonorrhoeae*, o Agar Mueller Hinton con sangue di montone al 5% per *S. pneumoniae*, streptococchi β -emolitici e del gruppo viridans) inoculate con colture pure di isolati clinici. Dopo l'incubazione, le piastre vengono esaminate e le zone di inibizione intorno ai dischi misurate e comparate con range di riferimento predefiniti per ciascun antibiotico al fine di determinare gli agenti più adatti alla terapia antibiotica.

REAGENTI – I Sensi-Disc sono dischi del diametro di 6 mm, preparati impregnando carta assorbente di alta qualità con quantitativi accuratamente determinati di antibiotici o di altri agenti chemioterapici. I dischi sono chiaramente contrassegnati su entrambi i lati con lettere e numeri indicanti l'agente e la rispettiva concentrazione (vedere la tabella che riporta le concentrazioni di ingredienti reattivi). L'antibiotico contenuto nei dischi viene testato con le metodiche stabilite dall'FDA o procedure simili o comparabili a quelle pubblicate nel *Federal Register* statunitense.

Gli agenti Sensi-Disc vengono forniti in cartucce da 50 dischi ciascuna. L'ultimo disco di ogni cartuccia è contrassegnato con una "X" e contiene l'antibiotico indicato dal codice. Le cartucce vanno utilizzate nei dispensatori BBL Sensi-Disc, disponibili in vari modelli: dispensatore a disco singolo, dispensatore da 8 posti per piastre Petri da 100 mm, dispensatore auto-applicatore da 6 od 8 posti per piastre da 100 mm e dispensatore auto-applicatore da 12 posti per piastre da 150 mm.

Precauzioni - Per uso diagnostico *in vitro*.

Seguire le istruzioni per l'uso; la performance dei dischi non dipende solo dalla loro potenza specifica, ma anche dall'uso di inoculo e colture di controllo appropriati, da piastre pre-testate funzionali, da una temperatura di conservazione idonea e da altri fattori.

Durante tutte le procedure, adottare tecniche asettiche e seguire le precauzioni standard contro i rischi microbiologici. Dopo l'uso, sterilizzare le colture, i contenitori e i materiali contaminati.

Modalità di conservazione

- Una volta ricevuti, i dischi devono essere conservati a una temperatura compresa tra -20 e +8 °C. Se il frigorifero del laboratorio viene aperto e chiuso di frequente e non riesce a mantenere una temperatura idonea, conservarli soltanto una quantità di dischi sufficiente per una settimana. Alcuni dischi (es. β -lattamici) devono preferibilmente essere conservati in freezer a -20 °C.
- Prima dell'apertura, attendere che i contenitori raggiungano la temperatura ambiente. Una volta completata l'applicazione dei dischi, rimettere in frigorifero quelli non utilizzati.
- Usare prima i dischi più vecchi.
- Gettare i dischi scaduti. Gettare anche le cartucce a cui dischi siano stati rimossi frequentemente nell'arco di una settimana e i dischi non conservati in frigorifero nel laboratorio durante la notte. In alternativa, testare i dischi per verificare che assicurino performance accettabili prima di continuare ad usarli.
- Se i dischi sviluppano zone di inibizione non corrette con i controlli raccomandati, verificare l'intera procedura; le errate dimensioni della zona possono essere attribuite al disco, all'inoculo, alla preparazione o allo spessore (ca. 4 mm) del terreno di coltura o ad altri fattori.

La data di scadenza vale solo per i dischi conservati in contenitori integri secondo le istruzioni.

CAMPIONI – Normalmente i campioni non devono essere impiegati direttamente in questo test. Vedere le Istruzioni che illustrano la procedura di preparazione dell'inoculo. Se possibile, preparare le colture da campioni prelevati da pazienti prima dell'inizio della terapia antibiotica.

PROCEDURA

Materiale fornito: Dischi Sensi-Disc qualificati per il test di sensibilità.

Materiali necessari ma non forniti: Terreni di coltura ausiliari, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie per eseguire il test di sensibilità mediante disco-diffusione con la procedura standardizzata. Preparare uno standard di torbidità McFarland 0,5 aggiungendo 0,5 mL di 0,048 M BaCl₂ [1,175% (peso/vol) BaCl₂·2H₂O] a 99,5 mL di 0,18 M [0,36N] H₂SO₄ [1% (vol/vol)]. Per la verifica usare uno spettrofotometro con percorso ottico di 1 cm e cuvetta corrispondente; l'assorbanza a 625 nm deve essere pari a 0,08 – 0,10.

Istruzioni, inclusi i controlli da parte dell'utente:⁶

- Preparazione dell'inoculo con colture per il test e il controllo
 - Allestire un vetrino colorato con Gram. Utilizzare soltanto colture pure.
 - Selezionare da tre a cinque colonie simili e trasferirle con ago o ansa da inoculo in 4 – 5 mL di brodo adatto, come per esempio Trypticase Soy Broth (o brodo Mueller Hinton per microrganismi esigenti).
 - Incubare le colture del brodo a 35 °C per 2 – 6 h, se necessario, fino a sviluppare una torbidità equivalente allo standard McFarland 0,5 (circa 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL). In alternativa, preparare una sospensione diretta di brodo o di soluzione fisiologica con colonie selezionate da una piastra agar incubata durante la notte (per *H. influenzae* e *N. gonorrhoeae* usare un terreno di coltura non selettivo come agar sangue o agar cioccolato). La metodica di sospensione diretta delle colonie è da preferire per *Staphylococcus* spp., *S. pneumoniae* e altri streptococchi, *Haemophilus* spp. e *N. gonorrhoeae*.⁶
 - Diluire, se necessario, per ottenere una torbidità equivalente allo standard 0,5 di McFarland. Per diluire, usare brodo o soluzione fisiologica sterile. In alternativa, standardizzare l'inoculo mediante fotometria; per facilitare la regolazione dell'inoculo con i microrganismi a crescita rapida, si può utilizzare il sistema di inoculo Prompt (dispositivo di preparazione volumetrica dell'inoculo).⁸
- Non usare come inoculo le brodo-colture incubate durante la notte.
- Inoculo
 - Entro 15 min, immergere un tampone di cotone sterile nell'inoculo correttamente diluito ed eliminare il liquido in eccesso facendo ruotare il tampone e premendolo parecchie volte sulla parte superiore della parete interna della provetta.
 - Seminare l'intera superficie di una piastra agar Mueller Hinton (o altro agar appropriato) per tre volte, girando ogni volta la piastra di 60° per ottenere un'inoculo uniforme.
 - Si può lasciare il coperchio sochiuso per 3 – 5 min, ma non più di 15 min, per permettere l'assorbimento di eventuale umidità dalla superficie, prima di applicare i dischi impregnati di antibiotico.
- Selezionare i dischi appropriati (vedere nota bibliografica 7, Tabelle 1 e 1A di M100-S13 [M2]).
- Applicare i dischi con l'ausilio di un dispensatore BBL, adottando tecniche asettiche. Depositare i dischi in modo tale che la distanza tra i rispettivi centri sia di almeno 24 mm. I dischi di penicillina e di cefalosporina devono essere preferibilmente depositati a una distanza di almeno 10 mm dal bordo della piastra Petri, assicurandosi che i rispettivi centri distino almeno 30 mm l'uno dall'altro. Evitare di disporre i dischi l'uno adiacente all'altro. Con *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* e *S. pneumoniae*, non usare più di nove dischi per piastra da 150 mm o più di quattro dischi per piastra da 100 mm. Se i dischi sono stati depositati sull'agar senza dispensatore auto-applicatore, premere su di essi con un ago o pinze sterili in modo da porli a contatto con la superficie della piastra.
- Entro 15 min porre in incubatore a 35 °C le piastre, con il lato dell'agar rivolto verso l'alto. *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* e altri streptococchi devono essere incubati in un'atmosfera arricchita con CO₂ al 5%.
- Esaminare le piastre dopo 16 – 18 h di incubazione (20 – 24 h per *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* e altri streptococchi). Si raccomanda un'incubazione di almeno 24 h al fine di rilevare ceppi resistenti a meticillina/nafcillina/oxacillina in caso di *Staphylococcus* spp. e a vancomicina in caso di *Enterococcus* spp. I diametri delle zone di inibizione completa vengono misurati mediante controllo visivo macroscopico. La misurazione delle zone viene arrotondata al millimetro. Per ulteriori dettagli sulla misurazione delle zone di inibizione, consultare la bibliografia.⁶ La sola crescita di colonie isolate indica che l'inoculo è troppo leggero; in tal caso, il test deve essere ripetuto. Le zone intorno a dischi contenenti antibiotici differenti non sono rapportabili ai fini della comparazione dell'attività degli antibiotici in questione. Per i valori attesi dai test di aerobi comuni, vedere la tabella di interpretazione del diametro delle zone. La misurazione delle zone può essere facilitata dall'uso del set di interpretazione BBL Sensi-Disc.
- Includere test di controllo - che utilizzino le colture prescritte - ogni giorno in cui si eseguono test di sensibilità, oppure una volta alla settimana nel caso in cui si possano documentare performance soddisfacenti in conformità alle norme NCCLS.⁶ Le dimensioni tipiche delle zone di *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766, *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. coli* ATCC 35218 (ceppo produttore di β -lattamasi), *E. faecalis* ATCC 29212 (per il controllo di qualità dei dischi di gentamicina 120 µg e streptomina 300 µg) e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (per i test di screening e conferma delle ESSL) sono riportate in tabella (o nelle note a piè di pagina). Tali valori indicano la corretta performance della procedura nel suo complesso. *E. faecalis* ATCC 29212 (o 33186) è raccomandato anche per valutare se i nuovi lotti di agar Mueller Hinton presentino un contenuto basso di timina e timidina (v. nota a piè di pagina tt). *H. influenzae* ATCC 10211 è raccomandato come ceppo utile per un controllo di qualità supplementare al fine di verificare le proprietà di stimolazione della crescita dell'agar per test Haemophilus.⁷

RISULTATI^{6,7} – NOTA: I criteri di interpretazione raccomandati si basano sui regimi di dosaggio e le vie di somministrazione prevalenti negli Stati Uniti.

Confrontare il diametro delle zone rilevate con quello della tabella; per ogni microrganismo specifico si possono ottenere risultati refertabili come Resistente, Intermedio o Sensibile. Per certe combinazioni microrganismo-antibiotico, l'assenza di ceppi resistenti preclude la possibilità di definire categorie di risultati diversi da "Sensibile". Per ceppi con risultati che suggeriscono una categoria "non sensibile", è necessario verificare l'identificazione del microrganismo e i risultati del test di sensibilità antibiotica. Gli isolati devono essere successivamente conservati e inviati a un laboratorio di riferimento che confermi i risultati utilizzando il metodo di diluizione standard NCCLS.

Per microrganismi non inclusi nella tabella di interpretazione del diametro delle zone (es. *Campylobacter*, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp.), gli studi non consentono ancora di sviluppare standard definitivi riproducibili per l'interpretazione dei risultati. Se necessario, il metodo di test più appropriato è di norma quello di diluizione, che può richiedere l'invio del microrganismo a un laboratorio di riferimento.⁷

Per isolati fecali di *Salmonella* e *Shigella* spp., è necessario testare e refertare di routine solo ampicillina, un chinolone e trimetoprim/sulfametozolo. Per isolati extraintestinali di *Salmonella* spp., è inoltre necessario testare e refertare cloramfenicolo e una cefalosporina di terza generazione. Per *Salmonella* e *Shigella* spp., gli aminoglicosidi e le cefalosporine di prima e seconda generazione possono apparire attivi *in vitro*, ma sono clinicamente inefficaci e non devono essere refertati come sensibili.⁷

Enterobacter, *Citrobacter* e *Serratia* possono sviluppare resistenza in caso di terapia protratta con cefalosporine di terza generazione. Isolati inizialmente sensibili possono pertanto sviluppare resistenza entro 3 – 4 giorni dall'inizio della terapia. È opportuno testare isolati ripetuti.

Le non-*Enterobacteriaceae* diverse da *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. devono essere testate con il metodo di diluizione (vedere M7-A6³).

P. aeruginosa può sviluppare resistenza in caso di terapia protratta con qualsiasi antibiotico: gli isolati inizialmente sensibili possono diventare resistenti entro 3 o 4 giorni dopo l'inizio della terapia ed è pertanto opportuno testare isolati ripetuti.

La sensibilità di *Pseudomonas aeruginosa* isolata da pazienti con fibrosi cistica può essere determinata in modo affidabile con il metodo del disco, ma può richiedere un'incubazione di ulteriori 24 h prima che il risultato possa essere refertato come sensibile.

Gli enterococchi possono risultare resistenti a penicillina e ampicillina a causa della produzione di proteine leganti penicillina (PBP) a bassa affinità o della produzione di β -lattamasi. Il test di disco-diffusione consente di identificare con precisione isolati con PBP alterate, ma non individua in modo affidabile ceppi produttori di β -lattamasi. Questi ultimi possono essere identificati in modo ottimale usando un test diretto delle β -lattamasi⁹, es. con dischi di nitrocefina Cefinase o dischi di cefalosporine cromogene.

Per *Enterococcus* spp., cefalosporine, aminoglicosidi (eccetto lo screening di resistenza ad alti dosaggi), clindamicina e trimetoprim/sulfametozolo possono apparire attivi *in vitro*, ma sono clinicamente inefficaci e gli isolati non devono essere refertati come sensibili.

Solo i risultati di test con ampicillina (una cefalosporina di terza generazione), cloramfenicolo e meropenem devono essere refertati di routine con isolati di liquido cerebrospinale di *H. influenzae*.

Amoxicillina/acido clavulanico, azitromicina, claritromicina, cefalor, cefprozol, loracarbef, cefdinir, cefixime, cefpodoxime e cefuroxime axetil sono agenti orali utilizzabili come terapia empirica per infezioni delle vie respiratorie da *Haemophilus* spp. I risultati dei test di sensibilità con questi antibiotici sono spesso inutili per il trattamento di singoli pazienti. Tuttavia, il test di sensibilità di *Haemophilus* spp. con tali agenti può essere appropriato a fini di monitoraggio o studi epidemiologici.

Le β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) sono enzimi prodotti da bacilli gram-negativi, che vengono generati dalla mutazione in geni per comuni β -lattamasi plasmide-mediate. I ceppi di *Klebsiella* spp. ed *E. coli* che producono ESBL possono essere clinicamente resistenti alla terapia con penicilline, cefalosporine o aztreonam, nonostante l'apparente sensibilità *in vitro* ad alcuni di tali agenti. Alcuni di questi ceppi presentano zone di inibizione al di sotto della popolazione di sensibilità normale ma al di sopra dei breakpoint standard per certe cefalosporine a spettro esteso o aztreonam; tali ceppi possono essere sottoposti a screening per la potenziale produzione di ESBL usando i breakpoint di screening ESBL prima di refertare i risultati per penicilline, cefalosporine a spettro esteso o aztreonam. Altri ceppi possono dare risultati intermedi o resistenti - con breakpoint standard - a uno o più di tali agenti. In tutti i ceppi con ESBL, il diametro della zona per una o più cefalosporine a spettro esteso o aztreonam deve aumentare in presenza di acido clavulanico, come determinato dal test fenotipico di conferma. Per tutti i ceppi produttori di ESBL confermati, i risultati dei test devono essere refertati come resistenti per tutte le penicilline, cefalosporine e aztreonam. Per i test di screening e conferma delle ESBL, vedere la nota a piè di pagina t. La decisione di eseguire test di screening delle ESBL su tutti gli isolati urinari spetta all'istituto e deve tenere conto di prevalenza, terapia e problemi di controllo delle infezioni.⁷

Ai fini della rilevazione di stafilococchi meticillino-resistenti, il disco di oxacillina è verosimilmente più efficace di quelli di meticillina o di nafcillina. Per testare la resistenza a meticillina/oxacillina, usare quindi il disco di oxacillina da 1 µg. Effettuare attentamente ogni zona circostante il disco di oxacillina usando luce trasmessa allo scopo di rilevare l'eventuale formazione di piccole colonie o di un

sottile film all'interno della zona d'inibizione, dopo almeno 24 h di incubazione. Gli stafilococchi meticillino-resistenti sono spesso resistenti a più antibiotici, tra cui aminoglicosidi, macrolidi, clindamicina, fenicoli, chinoloni, sulfonamidi e tetracicline. L'osservazione di resistenza multipla deve suggerire la possibilità di resistenza a meticillina. Ceppi di *S. aureus* meticillino-resistente ma non resistenti ad altre classi di antibiotici, sono stati tuttavia isolati da popolazioni di pazienti ospedalizzati e ambulatoriali. Se il risultato dei test di disco-diffusione per la resistenza a meticillina di *Staphylococcus* spp. è dubbio, eseguire ulteriori test di conferma come illustrato nel documento NCCLS M7.⁹ *S. aureus* (MRSA) e refertare gli stafilococchi coagulasi-negativi (MRS) resistenti a meticillina/oxacillina come resistenti (oppure non refertati affatto) a tutte le penicilline, cefemi, carbapenemi e altri β -lattami quali amoxicillina/acido clavulanico, ampicillina/sulbactam, ticarcillina/acido clavulanico, piperacillina/tazobactam e imipenem, indipendentemente dai risultati di test *in vitro* con tali agenti. La maggior parte dei casi di infezioni documentate da stafilococchi meticillino-resistenti ha infatti risposto mediocrementemente alla terapia β -lattamica e non sono stati ancora presentati dati clinici comprovanti l'efficacia clinica di tali agenti.⁶ Gli isolati di stafilococchi portatori accertati del gene *mecA* o produttori accertati di PBP 2a, prodotto del gene *mecA*, devono essere refertati come oxacillino-resistenti.

I criteri di interpretazione degli stafilococchi coagulasi-negativi sono correlati alla presenza o assenza del gene codificante la meticillino-resistenza (*mecA*) per *S. epidermidis*. Tali criteri possono ugualmente definire la resistenza per altri stafilococchi coagulasi-negativi, es. *S. lugdunensis* o *S. saprophyticus*. Per le infezioni gravi con stafilococchi coagulasi-negativi diversi da *S. epidermidis*, può essere opportuno eseguire test per *mecA* o per la proteina espressa da *mecA*, la proteina legante la penicillina 2a (PBP 2a, nota anche come PBP 2') quando si trattano ceppi aventi diametri di zona nel range intermedio o resistente. Gli isolati non portatori accertati del gene *mecA* o non produttori accertati di PBP 2a, devono essere refertati come oxacillino-sensibili.

È stato riportato che il test di sensibilità su disco non è accurato ai fini della determinazione della sensibilità a meticillina (oxacillina) degli stafilococchi coagulasi-negativi (es. *S. saprophyticus*).¹⁰ Si sconsigliano i test di routine di isolati urinari di *S. saprophyticus* in quanto le infezioni rispondono alle concentrazioni raggiunte nell'urina dagli agenti antibiotici normalmente usati per trattare infezioni acute non complicate delle vie urinarie (es. nitrofurantoina, trimetoprim/sulfametossazolo o un fluorochinolone).

Un test rapido della β -lattamasi (es. usando i dischi Cefinase) può offrire informazioni clinicamente rilevanti prima che siano disponibili i risultati dei test di disco-diffusione con *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* e *Moraxella catarrhalis*; è questo l'unico test affidabile ai fini della rilevazione di *Enterococcus* spp. produttori di β -lattamasi. Un test β -lattamasi predittivo di resistenza a penicillina, ampicillina e amoxicillina tra *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* e *M. catarrhalis* e di resistenza a penicillina, comprese le acilamino-, carbossi- e ureido-penicilline, tra gli stafilococchi e gli enterococchi. Un test β -lattamasi negativo non esclude tuttavia la possibilità di resistenza dovuta ad altri meccanismi. Non testare membri di *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e altri bacilli aerobi gram-negativi, in quanto i risultati possono non essere predittivi di sensibilità ai β -lattamici più comunemente usati per la terapia clinica. La rilevazione accurata di β -lattamasi negli stafilococchi può richiedere l'induzione dell'enzima e l'incubazione fino a 1 h di un test a base di nitrocefina. L'induzione può essere facilmente ottenuta testando la crescita della zona intorno al bordo del disco di oxacillina. Per garantire risultati accurati, è necessario prestare estrema attenzione e condurre test di controllo positivi e negativi conosciuti contemporaneamente all'esame degli isolati clinici.⁶

Il test di sensibilità di penicilline e altri β -lattamici approvati dalla U.S. Food and Drug Administration per il trattamento di streptococchi di gruppo A e B non è necessario a scopi clinici e non deve essere eseguito di routine poiché, come per la vancomicina, non sono stati riscontrati ceppi resistenti. Alcuni ceppi di *S. agalactiae* possono tuttavia dare risultati penicillino-intermedi. I criteri di interpretazione sono forniti a fini di sviluppi farmaceutici, epidemiologici o per il monitoraggio di resistenza emergente. I ceppi risultati intermedi o resistenti devono essere inviati a un laboratorio di riferimento per la conferma.

I test di disco-diffusione con ampicillina, penicillina e rifampicina per *Neisseria meningitidis* non sono affidabili. Tali microrganismi devono essere testati con il metodo MIC (concentrazione minima inibente).⁷

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Il test qui descritto si applica essenzialmente ad agenti patogeni aerobi a crescita rapida. I batteri esigenti diversi da *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* e altri streptococchi, devono essere testati con un metodo di diluizione.⁹ Il test degli anaerobi richiede procedure speciali.¹¹
2. Le classificazioni di Resistente, Intermedio e Sensibile variano solamente di un millimetro, che corrisponde al normale margine di errore di laboratorio. Alcune colture possono dare una zona borderline che varia da un giorno all'altro o da un laboratorio all'altro; tali colture sono relativamente rare.
3. Per la rilevazione della resistenza di pneumococchi ed enterococchi, seguire rigorosamente le metodiche raccomandate dall'NCCLS.⁶
4. È possibile usare agenti antibiotici diversi da quelli elencati nella tabella. I test di sensibilità con tali agenti devono essere interpretati in base alla presenza o assenza di una zona definita di inibizione e considerati soltanto qualitativi finché non siano state stabilite le zone di interpretazione. Tutti i diametri delle zone devono essere rilevati.
5. Il test di conferma delle ESBL è valido solo quando i quattro dischi (cefotaxime, cefotaxime/acido clavulanico, ceftazidime, ceftazidime/acido clavulanico) vengono usati simultaneamente. L'NCCLS sconsiglia l'uso di singoli dischi.^{6,7}

† Adattamento parziale autorizzato dal documento NCCLS M100-513 (M2): Disk Diffusion Supplemental Tables, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Il documento completo può essere richiesto al National Committee for Clinical Laboratory Standards, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA. I valori non compresi in M100-513 sono spiegati in altre note a piè di pagina. Per le correlazioni appropriate con i valori MIC, consultare M100-513.^{6,7,9}

- a La categoria "Intermedio" comprende isolati con valori MIC degli agenti antibiotici prossimi ai livelli generalmente riscontrabili nel sangue e nei tessuti e per i quali i tassi di risposta possono essere inferiori a quelli degli isolati considerati sensibili. La categoria "Intermedio" implica l'applicabilità clinica nei siti corporei in cui gli antibiotici sono fisiologicamente concentrati (es. l'urina per chinoloni e β -lattamici) o laddove è possibile un dosaggio di antibiotico più elevato del normale (es. β -lattamici). La categoria "Intermedio" comprende anche una "zona tampone", che dovrebbe impedire discrepanze di interpretazione dovute a fattori tecnici secondari non controllati, specialmente nel caso di antibiotici con margini ristretti di farmacotossicità.
 - b Le politiche concernenti la generazione di antibiogrammi cumulativi devono essere elaborate in collaborazione con il servizio di malattie infettive, il personale addetto al controllo infezioni e il comitato per il prontuario farmaceutico. Nella maggior parte dei casi, la percentuale di risultati sensibili e intermedi non deve essere combinata nella stessa statistica.
 - c Questi standard dei diametri di zona e limiti per il controllo di qualità si applicano solo a test con *Haemophilus* spp. mediante terreno di test *Haemophilus* Test Medium (HTM) incubato in CO₂ al 5% (16 – 18 h). Per verificare le proprietà di stimolazione della crescita dell'HTM, si raccomanda l'uso di *H. influenzae* (ATCC 10211) come ceppo supplementare di controllo di qualità. L'area priva di crescita evidente ad occhio nudo deve essere considerata il margine della zona. Nella misurazione, ignorare ogni debole crescita di colonie minute, poco evidente rispetto alla zona più significativa.
 - d Questi standard dei diametri di zona e limiti per il controllo di qualità sono applicabili solo ai test eseguiti usando la base agar GC con un supplemento di crescita all'1% (es. agar BBL GC II con IsoVitalE Enrichment), con incubazione in CO₂ al 5% (20 – 24 h).
 - e Questi standard dei diametri di zona e limiti per il controllo qualità sono applicabili solo ai test eseguiti su agar Mueller Hinton supplementato con sangue defibrinato di montone al 5% e incubazione in CO₂ al 5% (20 – 24 h). Le norme d'interpretazione si applicano a *S. pneumoniae* e ad altri streptococchi, come indicato. L'applicazione dei criteri specificati a microrganismi diversi da quelli elencati può dare risultati non attendibili. I criteri di interpretazione per streptococchi diversi da *S. pneumoniae* sono proposti sulla base della distribuzione di popolazione delle varie specie, la farmacocinetica degli agenti antibiotici, le pubblicazioni esistenti in merito e l'esperienza clinica di alcuni membri del sottocomitato dell'NCCLS. Per l'esame di molti composti del gruppo non sono disponibili dati clinici raccolti sistematicamente.⁷ Nonostante la mancanza di criteri di interpretazione affidabili sulla disco-diffusione per *S. pneumoniae* con certi β -lattamici, *S. pneumoniae* ATCC 49619 è il ceppo designato per il controllo di qualità con tutte le *Streptococcus* spp.
 - f Le raccomandazioni per le dimensioni di zona definite dalle case farmaceutiche e approvate dall'FDA non sono incluse in NCCLS M100-513 (M2-A8).⁷
 - g Un altro ceppo di *E. coli* (ATCC 35218) è stato designato per il controllo di qualità dei dischi. Esso contiene β -lattamici combinati con inibitori delle β -lattamasi. Questo ceppo produce una β -lattamasi che dovrebbe essere inattivata dall'inibitore. Quando usato insieme al ceppo ATCC 25922, è possibile monitorare entrambi i componenti combinati nei dischi. Con questo ceppo, i limiti di controllo sono 17 – 22 mm per amoxicillina/acido clavulanico, 13 – 19 mm per ampicillina/sulbactam, 12 – 18 mm per piperacillina, 24 – 30 mm per piperacillina/tazobactam e 21 – 25 mm per ticarcillina/acido clavulanico.
 - h Gli isolati di pneumococchi con zone di oxacillina ≥ 20 mm sono penicillino-sensibili (MIC $\leq 0,06$ $\mu\text{g/mL}$) e possono essere considerati sensibili ad ampicillina, amoxicillina, amoxicillina/acido clavulanico, ampicillina/sulbactam, cefalor, cefdinir, cefepime, cefetamet, cefixime, cefotaxime, cefprozil, cefbutene, ceftriaxone, cefuroxime, cefuroxime, cefepodoxime, ceftiozime, ertapenem, imipenem, loracarbef e meropenem per le indicazioni approvate. Non è necessario testare questi agenti. Per isolati con zone di oxacillina ≤ 19 mm, si deve determinare il valore MIC di penicillina, meropenem e cefotaxime o ceftriaxone, in quanto le zone di tali dimensioni si riscontrano sia con ceppi penicillino-resistenti o intermedi sia con determinati ceppi sensibili. Non refertare gli isolati come penicillino-resistenti o intermedi unicamente in base a una zona di oxacillina ≤ 19 mm. Amoxicillina, ampicillina, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone, cefuroxime, ertapenem, imipenem e meropenem possono essere usati per trattare le infezioni pneumococche, per quanto non esistano ancora affidabili test di sensibilità per disco-diffusione con questi agenti. Il metodo migliore per determinarne l'attività *in vitro* è mediante MIC. Penicillina, cefotaxime o ceftriaxone e meropenem devono essere testati con un metodo MIC affidabile (come quello illustrato nel documento NCCLS M7⁹) e refertati di routine in caso di isolati di *S. pneumoniae*. Tali isolati devono essere ritestati per la vancomicina usando il metodo di disco o MIC. Con isolati di altre sedi, si può usare il test di screening con disco di oxacillina. Se le dimensioni della zona di oxacillina sono ≤ 19 mm, è necessario determinare le MIC di penicillina e cefotaxime o ceftriaxone. Per determinare la sensibilità a cefdinir di streptococchi diversi da *S. pneumoniae*, usare il disco di penicillina da 10 unità; gli isolati con zone di penicillina ≥ 28 mm sono penicillino-sensibili e possono essere considerati sensibili anche a cefdinir.
 - i Gli isolati di streptococchi penicillino-sensibili possono essere considerati sensibili ad ampicillina, amoxicillina, amoxicillina/acido clavulanico, ampicillina/sulbactam, cefalor, cefazolina, cefdinir, cefepime, cefprozil, cefotaxime, cefbutene (solo streptococchi gruppo A), ceftriaxone, cefuroxime, cefepodoxime, cefalotina, cefapirina, cefradina, ertapenem (solo β -emolitici), imipenem, loracarbef e meropenem per le indicazioni approvate e non necessitano di test contro tali agenti. La sensibilità a penicillina o ampicillina di streptococchi viridans isolati da sangue e siti corporei normalmente sterili (es. liquido cerebrospinale, sangue, tessuto osseo, ecc.) deve essere testata con un metodo MIC.
 - j Gli stafilococchi penicillino-sensibili sono sensibili anche ad altre penicilline, a combinazioni di β -lattamici/inibitori della β -lattamasi, cefemi e carbapenemi approvati dalla FDA per l'uso in infezioni stilococche. I ceppi penicillino-resistenti, oxacillino-sensibili sono resistenti a penicilline penicillinas-labili ma sensibili ad altre penicilline penicillinas-stabili, a combinazioni di β -lattamici/inibitori della β -lattamasi, a cefemi appropriati e carbapenemi. Gli stafilococchi oxacillino-resistenti sono resistenti a tutti gli antibiotici β -lattamici attualmente in commercio. La sensibilità o resistenza a un'ampia gamma di antibiotici β -lattamici può pertanto essere dedotta testando solo penicillina e oxacillina. Si sconsigliano test di routine con altre penicilline, combinazioni di β -lattamici/inibitori della β -lattamasi, cefemi e carbapenemi.⁷ Gli stafilococchi oxacillino-resistenti devono essere refertati come resistenti o non refertati.
 - k I ceppi rari di *Haemophilus influenzae*, β -lattamasi-negativi e ampicillino-resistenti (BLNAR) devono essere considerati resistenti ad amoxicillina/acido clavulanico, ampicillina/sulbactam, cefalor, cefetamet, cefonicid, cefprozil, cefuroxime e loracarbef, nonostante l'apparente sensibilità *in vitro* di alcuni ceppi BLNAR a questi agenti.
- I Rappresentativo di classe per ampicillina e amoxicillina.
 - m Per *V. cholerae*, i risultati ottenuti con i test di disco-diffusione per ampicillina, tetracicline, trimetoprim/sulfametossazolo e sulfonamidi (cioè la percentuale di sensibili, intermedi e resistenti) si correlano bene con i risultati ottenuti mediante microdiluzione in brodo. I risultati per la tetracicline possono essere usati come indice predittivo della probabile sensibilità degli isolati alla doxiciclina; non usare il test su disco per la doxiciclina o l'eritromicina poiché vi è scarsa correlazione con i risultati MIC.
 - n L'ampicillina è rappresentativa di classe per ampicillina e amoxicillina. I risultati per l'ampicillina possono essere usati come indice predittivo di sensibilità ad amoxicillina/acido clavulanico, ampicillina/sulbactam, piperacillina e piperacillina/tazobactam tra enterococchi non produttori di β -lattamasi. La sensibilità a penicillina può essere usata come indice predittivo di sensibilità ad ampicillina, amoxicillina, ampicillina/sulbactam, amoxicillina/acido clavulanico, piperacillina e piperacillina/tazobactam per enterococchi non produttori di β -lattamasi. Per penicillina o ampicillina, la categoria "sensibile" implica la necessità di terapia ad alto dosaggio per il trattamento di infezioni enterococche gravi. L'endocardite da enterococchi richiede una terapia combinata con penicillina o ampicillina ad alto dosaggio o vancomicina o teicoplanina più gentamicina o streptomina per l'azione battericida. Poiché tra gli enterococchi la resistenza a penicillina o ampicillina dovuta a produzione di β -lattamasi non viene rilevata in modo affidabile con il metodo del disco o della diluizione, si raccomanda un test diretto delle β -lattamasi a base di nitrocefina per gli isolati ematici e da liquido cerebrospinale. Un test β -lattamasi positivo è indice predittivo di resistenza a penicillina, così come ad acilamino-, carbossi- e ureido-penicilline. Certi enterococchi penicillino- o ampicillino-resistenti possono avere una resistenza elevata (con MIC di penicillina ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$ o MIC di ampicillina ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$). Il test del disco non distingue gli enterococchi con resistenza normale da quelli con resistenza elevata. In caso di enterococchi isolati da campioni ematici e di liquido cerebrospinale, il laboratorio deve determinare la MIC effettiva per penicillina o ampicillina poiché i ceppi di *E. faecium* con resistenza normalmente inferiore (MIC di penicillina ≤ 64 $\mu\text{g/mL}$ e di ampicillina ≤ 32 $\mu\text{g/mL}$) devono essere considerati potenzialmente sensibili al sinergismo con aminoglicosidi (in assenza di elevata resistenza ad aminoglicosidi) mentre i ceppi con resistenza più elevata possono essere resistenti a tale sinergismo.⁶
 - o Per gli enterococchi, il sinergismo tra ampicillina, penicillina o vancomicina e un aminoglicoside può essere predetto con un test di screening per alti livelli di aminoglicosidi (gentamicina e streptomina). Non è necessario testare altri aminoglicosidi in quanto la loro attività contro gli enterococchi non è superiore a quella di gentamicina e streptomina.
 - p I risultati dei test di sensibilità ad ampicillina devono essere usati come indice predittivo dell'attività dell'amoxicillina. La maggior parte degli isolati di *H. influenzae* resistenti ad ampicillina e amoxicillina producono β -lattamasi di tipo TEM. Nella maggior parte dei casi, un test diretto delle β -lattamasi può pertanto rilevare rapidamente la resistenza ad ampicillina e ad amoxicillina.
 - q Può essere refertato per *Acinetobacter* spp. resistente ad altri agenti.
 - r Non refertato di routine su microrganismi isolati dalle vie urinarie.
 - s La sensibilità e la resistenza ad azitromicina, claritromicina e diritromicina possono essere definite usando eritromicina.
 - t Vedere la discussione sulle ESBL nella sezione "RISULTATI". Per i test di screening e conferma delle ESBL in *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli*, vedere la sezione "RISULTATI" e la nota bibliografica 7. I breakpoint di screening (agar Mueller Hinton, procedura standard di disco-diffusione, 35 °C, aria ambiente, 16 – 18 h) sono: aztreonam (≤ 27 mm), ceftazidime (≤ 22 mm), cefotaxime (≤ 27 mm), cefepodoxime (≤ 17 mm) e ceftriaxone (≤ 25 mm). Per il controllo di qualità si raccomandano *E. coli* ATCC 25922 (elencato nella tabella), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (aztreonam 9 – 17 mm), ceftazidime (10 – 18 mm), cefotaxime (17 – 25 mm), cefepodoxime (9 – 16 mm) e ceftriaxone (16 – 24 mm).⁷ L'uso di più antibiotici per lo screening migliora la sensibilità di rilevazione. Il test fenotipico di conferma richiede l'uso di cefotaxime e ceftazidime, sia soli che in combinazione con acido clavulanico. Diametro di zona ≥ 5 mm per uno degli antibiotici in caso di test in combinazione con acido clavulanico rispetto a zona corrispondente in caso di test non in combinazione = ESBL. Per il controllo di qualità si raccomandano: ceppo negativo *E. coli* ATCC 25922, che produce un aumento ≤ 2 mm del diametro di zona per l'antibiotico testato da solo rispetto a quando viene testato in combinazione con acido clavulanico; ceppo positivo *K. pneumoniae* ATCC 700603, che produce un aumento ≥ 3 mm del diametro di zona con cefotaxime e un aumento ≥ 5 mm del diametro di zona con ceftazidime. Vedere "Limitazioni della procedura". Per dettagli sulla procedura, vedere la nota bibliografica 7.
 - u La cefalotina può essere usata anche come indice predittivo dell'attività di cefalotina, cefapirina, cefradina, cefalexina, cefalor e cefadroxil. Cefazolina, cefuroxime, cefepodoxime, cefprozil e loracarbef (solo isolati delle vie urinarie) devono essere testati individualmente perché alcuni isolati possono essere sensibili a questi agenti pur essendo resistenti a cefalotina.
 - v Non applicabile al test di *Morganella* spp.
 - w Per *N. gonorrhoeae*, un risultato intermedio con un agente antibiotico indica un problema tecnico da risolvere ripetendo il test oppure la mancanza di esperienza clinica nel trattamento di microrganismi con tali zone. Quest'ultimo sembra essere il caso di cefmetazolo, cefotetan, cefoxitina e spectinomina. I ceppi che producono zone intermedie con gli altri agenti, hanno un tasso inferiore di guarigione clinica documentata (85 – 95%) rispetto a un tasso di >95% per i ceppi sensibili.
 - x I risultati per cefotaxime, ceftiozime o ceftriaxone devono essere testati e refertati su isolati da liquido cerebrospinale al posto di cefalotina e cefazolina.
 - y Poiché è stato riportato che alcuni ceppi di *Providencia* spp. danno risultati falsamente sensibili con i dischi di cefprozil, i ceppi in questione non devono essere testati e refertati con tale tipo di disco.
 - z Indicato solo per isolati urinari. Oltre che per i test di isolati urinari, l'acido nalidissico può essere usato per testare la ridotta sensibilità al fluorochinolone in isolati da pazienti con infezioni extraintestinali da *Salmonella*. Vedere la nota a piè ddd.
- aa *Staphylococcus* spp. può sviluppare resistenza in caso di terapia protratta con chinoloni. Isolati inizialmente sensibili possono pertanto sviluppare resistenza entro 3 – 4 giorni dall'inizio della terapia. È opportuno testare isolati ripetuti.
 - bb Per *V. cholerae*, usare con cautela poiché il test di disco-diffusione può classificare in modo errato molti microrganismi (tasso più elevato di errore secondario).
 - cc Non sono stati stabiliti criteri che supportano il test di questo antibiotico con *Streptococcus pneumoniae*. Il range di controllo è elencato esclusivamente ai fini del controllo di qualità.
 - dd La colistina e la polymixina B si diffondono in modo mediocre in agar e l'accuratezza del metodo di diffusione risulta pertanto inferiore rispetto ad altri antibiotici. La resistenza è sempre significativa, ma quando si considera il trattamento di infezioni sistemiche causate da ceppi sensibili, è opportuno confermare i risultati di un test di diffusione con un metodo di diluizione.
 - ee I microrganismi tetracicline-sensibili sono considerati sensibili anche a doxiciclina e minociclina. Alcuni microrganismi intermedi o resistenti a tetracicline possono tuttavia essere sensibili anche doxiciclina o minociclina o a entrambi.
 - ff Approvato dall'FDA per *S. saprophyticus* e *S. epidermidis* (non *S. aureus*).
 - gg Per i limiti per il controllo di qualità dei dischi di gentamicina 120 μg e streptomina 300 μg , utilizzare *E. faecalis* ATCC 29212 (gentamicina: 16 – 23ⁱⁱ mm, streptomina: 14 – 20ⁱⁱⁱ mm).
 - hh Se la zona è di 7 – 9 mm, il test non è conclusivo ed è necessario eseguire un test di screening per diluizione su agar o microdiluzione in brodo, per confermare la resistenza.
 - ii Diametri di zona raccomandati dall'NCCLS che differiscono dalle raccomandazioni approvate dall'FDA.

- kk Poiché certi ceppi di *Citrobacter*, *Providencia* e *Enterobacter* spp. hanno dato risultati falsamente sensibili con i dischi di cefdinir e loracarbef, i ceppi in questione non devono essere testati e refertati con tale tipo di dischi.
- ll I dischi di meticillina non sono più in commercio in quanto non è disponibile la polvere di meticillina.
- mm Non sono stati stabiliti criteri che supportino il test di questo antibiotico con *Pseudomonas aeruginosa*. Il range di controllo è elencato esclusivamente ai fini del controllo di qualità.
- nn Delle penicilline penicillinasi-stabili, si può testare l'oxacillina e si possono applicare i risultati alle altre penicilline penicillinasi-stabili, cioè cloxacillina e dicloxacillina. L'oxacillina è preferita in quanto meno soggetta a degradazione durante la conservazione e maggiormente in grado di rilevare ceppi di stafilococchi etero-resistenti. Non usare dischi di cloxacillina perché è possibile che non riescano a rilevare *S. aureus* oxacillina-resistente. Se si ottengono risultati intermedi per *S. aureus*, eseguire uno screening su agar sale con oxacillina (vedere M7-A6⁹).
- oo Dopo un'incubazione di almeno 24 h, verificare la formazione di una leggera crescita nella zona d'inibizione del disco di oxacillina usando luce trasmessa (esponendo la piastra alla luce). Gli stafilococchi meticillino-resistenti sono spesso resistenti a più antibiotici, tra cui aminoglicosidi, macrolidi, clindamicina, fenicoli, chinoloni, sulfonamidi e tetracicline. L'osservazione di resistenza multipla dovrebbe suggerire la possibilità di resistenza alla meticillina. Ceppi di *S. aureus* meticillino-resistente ma non resistente ad altre classi di antibiotici, sono stati tuttavia isolati da popolazioni di pazienti ospedalizzati e ambulatoriali.
- pp I ceppi di *Staphylococcus aureus* penicillino-resistenti e oxacillino-sensibili producono β-lattamasi e si preferisce eseguire il test con il disco di penicillina da 10 unità anziché con il disco di ampicillina. La penicillina deve essere usata per testare la sensibilità di tutte le penicilline sensibili a β-lattamasi, come ampicillina, amoxicillina, azlocillina, carbenicillina, mezlocillina, piperacillina e ticarcillina. Analogamente, un test β-lattamasi positivo è predittivo di resistenza a tali agenti.⁶ Gli stafilococchi oxacillino-resistenti devono essere refertati come resistenti o non refertati.
- qq Un test β-lattamasi positivo è predittivo di resistenza a penicillina, ampicillina e amoxicillina. Il test per le β-lattamasi permette di rilevare una forma di resistenza a penicillina in *N. gonorrhoeae* e può essere usato anche per fornire informazioni epidemiologiche. I ceppi con resistenza cromosomica possono essere rilevati solo mediante test di sensibilità supplementari, come per esempio il metodo di disco-diffusione o il metodo MIC di diluizione in agar. I gonococchi con diametri di zona di ≤19 mm attorno ai dischi di penicillina da 10 unità sono verosimilmente ceppi produttori di β-lattamasi. Tuttavia, il test delle β-lattamasi rimane preferibile rispetto ad altri metodi di sensibilità ai fini di un'identificazione rapida e accurata di tale resistenza a penicillina plasmide-mediata.
- rr I test di sensibilità a penicillina di *S. pyogenes* sono raramente necessari poiché questo microorganismo continua a essere universalmente penicillino-sensibile. Alcuni ceppi di *S. agalactiae* possono tuttavia dare risultati penicillino-intermedi.⁷
- ss La rifampina non deve essere usata da sola per la chemioterapia.⁷
- tt Il disco di sulfisoxazolo può essere utilizzato per rappresentare qualsiasi sulfonamide attualmente in commercio. I terreni contenenti sangue (a eccezione di sangue di cavallo lisato) non sono in genere adatti per testare sulfonamidi o trimetoprim. L'agar Mueller Hinton deve contenere la minore quantità possibile di timidina per testare sulfonamidi e/o trimetoprim. Per determinare se l'agar Mueller Hinton ha livelli sufficientemente bassi di timidina e timidina, si possono testare i ceppi di *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o ATCC 33186 con il disco di trimetoprim-sulfametoxazolo (vedere nota bibliografica 12). Una zona di inibizione di ≥20 mm, essenzialmente priva di colonie minute, indica un livello sufficientemente basso di timidina e di timidina.⁶
- uu I gonococchi con diametri di zona ≤19 mm attorno al disco di tetraciclina da 30 µg indicano di solito un isolato di *N. gonorrhoeae* tetraciclino-resistente (TRNG) plasmide-mediato. Questi ceppi devono essere confermati dal test di diluizione (MIC ≥16 µg/mL) e/o inviati a un laboratorio di igiene per l'indagine epidemiologica.
- vv Tutti gli isolati di stafilococco con diametri di zona pari ad almeno 14 mm devono essere testati con un metodo MIC. Tutti gli stafilococchi determinati vancomicina-resistenti devono essere inviati a un laboratorio di riferimento.⁷ La procedura di disco-diffusione non distingue tra ceppi con sensibilità ridotta alla vancomicina (MIC da 4 a 8 µg/mL) e ceppi sensibili (MIC da 0,5 a 2 µg/mL) anche in caso di incubazione per 24 h. Per riconoscere i ceppi con MIC di vancomicina da 4 a 8 µg/mL, eseguire un test MIC. Il test di screening in agar per vancomicina descritto per gli enterococchi può essere usato con successo per rilevare tali isolati, incubando le piastre per almeno 24 h a 35 °C, ma deve essere confermato dal test MIC. L'uso di un ceppo sensibile come *S. aureus* ATCC 29213, per il controllo di qualità, è essenziale per garantire la specificità. Fintantoché non saranno disponibili ulteriori dati sulla prevalenza o la rilevanza clinica di questi isolati, i laboratori possono decidere di sottoporre i ceppi MRSA a esami più accurati ai fini di rilevare MIC elevate di vancomicina.⁶
- ww In caso di test di vancomicina contro enterococchi, le piastre devono essere conservate per almeno 24 h ed esaminate usando luce trasmessa; la presenza di un alone o l'eventuale crescita all'interno della zona d'inibizione indica resistenza. I microorganismi con zone intermedie devono essere testati con un metodo MIC come descritto nel documento NCCLS M7. Vedere anche il test di screening in agar per vancomicina descritto nella tabella 2D delle MIC (M100-S13).⁹
- xx Non è stato osservato alcun ceppo di *S. pneumoniae* o altro streptococco con un diametro di zona per la vancomicina <17 mm; inviare tali ceppi a un laboratorio di riferimento.⁷
- yy A causa delle limitate alternative, cloramfenicolo, eritromicina, tetraciclina (o doxiciclina o minociclina) e rifampicina possono essere utilizzati nel trattamento di enterococchi vancomicina-resistenti (EVR); si raccomanda di consultare anche uno specialista in malattie infettive.⁷
- aaa Non sono stati osservati ceppi di streptococchi β-emolitici con zone di ampicillina, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone o penicillina di diametro inferiore a 24 mm; tali ceppi devono essere inviati a un laboratorio di riferimento.
- bbb Il deterioramento del contenuto del disco di oxacillina viene valutato in modo ottimale mediante *S. aureus* ATCC 25293, con una zona di diametro accettabile pari a 18 – 24 mm.
- ccc Per ampicillina, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone e penicillina, gli **streptococchi β-emolitici** comprendono solo i ceppi piogeni formanti grandi colonie di streptococchi con antigeni di gruppo A (*S. pyogenes*), C o G e ceppi con antigeni di gruppo B (*S. agalactiae*). Per cefepime, cefotaxime e ceftriaxone, gli **streptococchi Viridans** comprendono ceppi β-emolitici formanti piccole colonie con antigeni di gruppo A, C, F o G (*S. anginosus*, in precedenza definito *S. milleri*) nonché *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. mutans* ed *S. bovis*.
- ddd I ceppi di *Salmonella* fluorochinolone-sensibili risultati resistenti all'acido nalidissico possono essere associati a insuccesso clinico o risposta ritardata nei pazienti con salmonellosi extraintestinale trattati con fluorochinolone. Può essere opportuno considerare il test di isolati extraintestinali di *Salmonella* per la resistenza all'acido nalidissico.

RIFERIMENTI - Vedere "References" nel testo inglese.

BD Discos BBL Sensi-Disc para el análisis de sensibilidad antimicrobiana Español

USO PREVISTO: Estos discos se utilizan para pruebas semicuantitativas de sensibilidad *in vitro* de patógenos bacterianos comunes de crecimiento rápido y de ciertos patógenos bacterianos exigentes, por medio del procedimiento de prueba de difusión de disco en agar. Entre ellos se incluyen *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Vibrio cholerae* y, mediante procedimientos modificados, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y otros estreptococos. NOTA: Se requieren procedimientos especiales para analizar neumococos, enterococos e estafilococos resistentes a la meticilina/oxacilina, para realizar las pruebas de β-lactamasa y para realizar análisis de detección selectiva y confirmación de β-lactamasas de amplio espectro (BLEA); véase la sección "RESULTADOS".

Para conocer los criterios adoptados en Francia para la interpretación del diámetro de las zonas, consulte las instrucciones en la sección en francés de este folleto.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN: En la década de 1940 se desarrollaron métodos de difusión en agar utilizando discos de papel de filtro seco impregnados de concentraciones específicas de agentes antimicrobianos. Con el fin de eliminar o minimizar la variabilidad de este análisis, Bauer y cols. desarrollaron un procedimiento normalizado para el cual se eligió el agar de Mueller Hinton como medio para el análisis^{1,2}.

Varias agencias reguladoras y organizaciones normativas publicaron más tarde procedimientos de referencia normalizados basados en el método de Bauer-Kirby. Entre los primeros procedimientos normalizados con mayor aceptación se incluyen los publicados por la Food and Drug Administration (FDA)³ y la Organización Mundial de la Salud (WHO)^{4,5}. Los procedimientos fueron adoptados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) como norma de aceptación general y se actualizan periódicamente^{6,7}. Consulte en los documentos del NCCLS más recientes las recomendaciones vigentes.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO: Los discos, que contienen una gran variedad de agentes antimicrobianos, se colocan en la superficie de las placas de agar de Mueller Hinton (o de agar de medio de prueba *Haemophilus* para *H. influenzae*, agar GC II con enriquecimiento IsoVital[®] para *N. gonorrhoeae* o agar de Mueller Hinton con 5% de sangre de carnero para *S. pneumoniae* y para los estreptococos β-hemolíticos y del grupo viridans) que han sido inoculadas con cultivos puros de aislados clínicos. Después de la incubación, se examinan las placas y se miden y comparan las zonas de inhibición que rodean los discos con los límites de tamaños de zona establecidos para agentes antimicrobianos individuales a fin de determinar el agente o agentes más convenientes en la terapia antimicrobiana.

REACTIVOS: Los discos Sensi-Disc miden 6 mm y se preparan impregnando papel absorbente de alta calidad con cantidades exactas de antibióticos o de otros agentes quimioterapéuticos. Los discos están marcados claramente en ambos lados con letras y números que indican el agente y el contenido del fármaco. (Véase el gráfico que muestra las concentraciones de los componentes reactivos.) El contenido del fármaco en los discos se determina mediante los métodos establecidos por la FDA o por métodos similares o comparables a los publicados en el *Federal Register* de Estados Unidos.

Los agentes Sensi-Disc se suministran en cartuchos que contienen 50 discos cada uno. El último disco de cada cartucho está marcado con una "X" y contiene el fármaco según su código. Los cartuchos deben ser utilizados en los dispensadores BBL Sensi-Disc, que incluyen un dispensador de un solo disco, un dispensador de 8 posiciones para placas de Petri de 100 mm, dispensadores de autoapisonamiento de 6 y 8 posiciones para placas de 100 mm y un dispensador de autoapisonamiento de 12 posiciones para placas de 150 mm.

Precauciones: Para diagnóstico *in vitro*.

Siga las instrucciones de uso; el rendimiento del disco no sólo depende de su eficacia, sino también del uso de inóculos y cultivos de control adecuados, de placas funcionales previamente analizadas y de una temperatura de almacenamiento apropiada, así como de otros factores.

Emplee una técnica aséptica y siga las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todo el proceso. Esterilice los cultivos, recipientes y otros materiales contaminados después de su uso.

Instrucciones para el almacenamiento:

- Al recibir los discos, almacénelos a una temperatura entre -20 °C y +8 °C. Si el refrigerador del laboratorio se abre y cierra con frecuencia y no se mantiene una temperatura adecuada, guarde sólo la cantidad que se va a utilizar en una semana. Algunos discos (por ejemplo, β-lactámicos) deben mantenerse preferiblemente congelados a -20 °C.
- Permita que los envases lleguen a temperatura ambiente antes de abrirlos. Devuelva al refrigerador los discos que no hayan sido utilizados cuando se haya terminado la aplicación de los mismos.
- Utilice primero los discos cuya fecha de caducidad sea más próxima.
- Deseche los discos que ya han caducado. También se deben desechar los cartuchos de los que se han sacado discos con frecuencia durante una semana y los discos que se hayan dejado en el laboratorio fuera del refrigerador toda la noche; de no ser así, se debe averiguar su rendimiento aceptable antes de volver a usarlos.
- Si los discos forman zonas incorrectas con los organismos de control recomendados, todo el procedimiento debe ser evaluado; el tamaño defectuoso de la zona puede deberse al disco, la inoculación, la preparación o profundidad del medio (alrededor de 4 mm) o a otros factores.

La fecha de caducidad sólo se aplica a los discos almacenados en el envase intacto en la forma indicada.

MUESTRAS: Las muestras normalmente no se deben utilizar en esta prueba. Consulte las instrucciones, donde se incluye la preparación del inóculo. De ser posible, los cultivos deben provenir de las muestras obtenidas de pacientes antes de que se inicie una terapia antimicrobiana.

PROCEDIMIENTO

Material suministrado: Discos Sensi-Disc para el análisis de las sensibilidades indicadas en las etiquetas.

Materiales necesarios pero no suministrados: Medios de cultivo auxiliares, reactivos, organismos de control de calidad y equipos de laboratorio necesarios para realizar la prueba de sensibilidad de difusión en disco según el procedimiento normalizado. Prepare una norma de turbidez McFarland de 0,5, añadiendo 0,5 mL de 0,048 M BaCl₂ [1,175% (peso/vol) BaCl₂•2H₂O] a 99,5 mL de 0,18 M [0,36 N] H₂SO₄ [1% (vol/vol)]. Verifique utilizando un espectrofotómetro con un haz luminoso de 1 cm y la cubeta correspondiente; la absorción a 625 nm debe ser de 0,08 – 0,10.

Instrucciones y controles por parte del usuario:⁶

- Preparación del inóculo con cultivos de control y de prueba.
 - Realice una tinción de Gram. Utilice únicamente cultivos puros.
 - Selección de tres a cinco colonias parecidas y trasládelas con una aguja o asa de inoculación a 4 – 5 mL de caldo adecuado, como caldo de soja *Trypticase* (o caldo de Mueller Hinton para microorganismos de crecimiento exigente).
 - Incuba los cultivos de caldo a 35 °C durante 2 – 6 h, si es necesario, para desarrollar una turbidez equivalente al patrón de turbidez 0,5 de McFarland (aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL). También puede preparar una suspensión directa en caldo o solución salina de colonias seleccionadas de una placa de agar que haya sido incubada una noche (se debe utilizar un medio no selectivo para *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae*, tal como el agar sangre o el agar chocolate). **Se prefiere el método de la suspensión directa de colonias para el análisis de *Staphylococcus* spp., *S. pneumoniae* y otros estreptococos, *Haemophilus* spp. y *N. gonorrhoeae*⁶.**
 - Diluya, si es preciso, para obtener una turbidez equivalente a la referencia de turbidez 0,5 de McFarland. Utilice caldo o solución salina estéril como diluyente. Otra opción es normalizar el inóculo fotométricamente; para facilitar el ajuste del inóculo de organismos de crecimiento rápido, puede utilizarse el sistema de inoculación Prompt (dispositivo volumétrico para la preparación del inóculo)⁸.

Los caldos de cultivo preparados el día anterior no se deben utilizar como inóculo.
- Inoculación.
 - En el plazo de 15 min, sumerja una torunda de algodón estéril en el inóculo ajustado correctamente y gírela varias veces contra la porción superior de la pared interna del tubo para exprimir el exceso de líquido.
 - Siembre tres veces toda la superficie de una placa de agar de Mueller Hinton (u otro agar apropiado) girando la placa a 60° después de cada siembra para obtener una inoculación uniforme.
 - La tapa puede dejarse entreabierta entre 3 – 5 min., pero no más de 15 min., para permitir que se absorba toda la humedad de la superficie antes de que se apliquen los discos impregnados con el fármaco.
- Selección de los discos apropiados (tales como los recomendados en la referencia bibliográfica 7, Tablas 1 y 1A de M100-S13 [M2]).
- Aplique los discos mediante un dispensador BBL, empleando precauciones asépticas. Deposite los discos de modo que los centros queden a no menos de 24 mm de distancia. Es preferible depositar los discos de penicilina y cefalosporinas de manera que no queden a menos de 10 mm de la borde de la placa de Petri y sus centros estén a no menos de 30 mm de distancia. Evite colocar tales discos adyacentes. Para *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* y *S. pneumoniae* no utilice más de nueve discos por placa de 150 mm o cuatro discos por placa de 100 mm. Si los discos se han colocado en el agar con dispensadores que no sean de autoapisonamiento, presiónelos contra la superficie con una aguja o una pinza estériles.
- En un plazo de 15 min., coloque las placas, con el agar hacia arriba, en una incubadora a 35 °C. Se deben incubar las *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* y otros estreptococos en una atmósfera enriquecida con CO₂ al 5%.
- Examine las placas después de un período de incubación de 16 – 18 h (20 – 24 h para *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* y otros estreptococos). Se recomienda enterar durante 24 h *Staphylococcus* spp. para detectar los estafilococos resistentes a la meticilina/nafcilina/oxacilina y *Enterococcus* spp. para detectar resistencias a la vancomicina. Mida el diámetro de las zonas que muestren inhibición total, como puede observarse con la inspección visual macroscópica. Mida las zonas hasta el milímetro más cercano. Para más detalles sobre cómo medir las zonas de inhibición, consulte la referencia bibliográfica⁶. Si sólo crecen colonias aisladas, el inóculo es muy ligero y se debe repetir la prueba. Las zonas que rodean los discos que contienen diferentes fármacos no son comparables para cotejar la actividad de los fármacos. Consulte el gráfico de interpretación del diámetro de la zona, el cual da valores previstos del análisis de microorganismos aerobios comunes. La medición de la zona puede facilitarse usando un equipo de interpretación de zona **BBL Sensi-Disc**.
- Se deben incluir pruebas de control que utilicen cultivos ordenados todos los días que se realicen las pruebas de sensibilidad o bien semanalmente, si se puede documentar un rendimiento satisfactorio conforme al criterio del NCCLS⁶. Las dimensiones típicas de las zonas para *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766, *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. coli* ATCC 35218 (cepa productora de β-lactamasas) y *E. faecalis* ATCC 29212 (para pruebas de control de calidad con discos de antimicina de 120 µg y de estreptomidina de 300 µg) y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (para pruebas de evaluación y confirmación de BLEA) se presentan en el gráfico (o en las

notas de pie de página) e indican el rendimiento adecuado de todo el procedimiento. También se recomienda *E. faecalis* ATCC 29212 (ó 33186) para evaluar lotes nuevos de agar Mueller Hinton para detectar bajo contenido de timina y timidina (vea la nota de pie de página tt). *H. influenzae* ATCC 10211 se recomienda como una cepa de control de calidad adicional útil para verificar las propiedades de incentivo de crecimiento en el agar del medio de prueba Haemophilus⁷.

RESULTADOS^{6,7} – NOTA: Los criterios de interpretación recomendados se basan en las pautas posológicas y vías de administración habituales en EE.UU.

Compare los diámetros de las zonas registradas con los del gráfico; el resultado obtenido con cada organismo específico puede anunciarse como resistente, intermedio o sensible. Para algunas combinaciones de organismos/antimicrobianos, la ausencia de cepas resistentes excluye la posibilidad de definir otra categoría de resultados que no sea "Sensible". Para cepas cuyos resultados sugieran una categoría de "no sensible", deben confirmarse los resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana y la identificación del microorganismo. Si se confirma, la cepa aislada debe guardarse y remitirse a un laboratorio de referencia, que confirmará los resultados mediante un método de dilución de referencia de NCCLS.

La exclusión de los organismos del gráfico para la interpretación del diámetro de las zonas (por ejemplo, *Campylobacter*, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp.) indica que los estudios todavía no son adecuados para desarrollar normas definitivas y reproducibles para la interpretación de los resultados. Si es necesario, un método de dilución generalmente será el método de análisis más apropiado, que puede precisar remitir el organismo a un laboratorio de referencia⁷.

Para los aislados fecales de *Salmonella* y de *Shigella* spp., sólo deben ser analizados y notificados sistemáticamente una ampicilina, una quinolona y la trimetoprima/sulfametoxazol. Por otro lado, el cloranfenicol y una cefalosporina de tercera generación deben ser analizados y notificados para los aislados extraintestinales de *Salmonella* spp. Para *Salmonella* y *Shigella* spp., los aminoglicósidos y las cefalosporinas de primera y segunda generación pueden parecer activos *in vitro*, pero no son eficaces en la práctica clínica y no deben declararse como sensibles⁷.

Enterobacter, *Citrobacter* y *Serratia* pueden presentar resistencia durante la terapia prolongada con las cefalosporinas de tercera generación. Por tanto, los aislados que son inicialmente sensibles pueden volverse resistentes 3 ó 4 días después de iniciar la terapia. El análisis de aislados repetidos puede ser justificado.

Los organismos que no son *Enterobacteriaceae*, salvo *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp., deben ser analizados con el método de dilución (véase M7-A6⁹).

P. aeruginosa puede desarrollar resistencia durante la terapia prolongada con todos los antibióticos. Los aislados inicialmente sensibles pueden volverse resistentes a los 3 ó 4 días de iniciar la terapia y puede estar justificado el análisis de aislados repetidos.

La sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de pacientes con fibrosis quística puede determinarse de forma fiable mediante el método del disco, pero puede requerir una incubación prolongada de hasta 24 h antes de declararse como sensible.

Los enterococos pueden ser resistentes a la penicilina y a la ampicilina debido a la producción de proteínas de unión a penicilinas (PBP, penicillin-binding proteins) de baja afinidad o a la producción de β-lactamasa. La prueba de difusión en disco puede detectar con exactitud las colonias aisladas con PBP alteradas, pero no detecta de forma fiable las cepas productoras de β-lactamasa. Estas últimas cepas se identifican mejor utilizando una prueba directa de β-lactamasa⁶; p. ej., con discos de nitrocefina Cefinase o discos de cefalosporina cromógena.

Para *Enterococcus* spp., las cefalosporinas, los aminoglicósidos (excepto para la detección de resistencia de alto nivel), la clindamicina y la trimetoprima/sulfametoxazol pueden parecer activos *in vitro*, pero no tienen eficacia clínica, por lo que los aislados no deben declararse como sensibles a estos agentes.

Sólo los resultados de las pruebas con ampicilina, una cefalosporina de tercera generación, cloramfenicol y meropenem se deben declarar en forma rutinaria con todos los aislados de *H. influenzae* de líquido cefalorraquídeo.

Amoxicilina/ácido clavulánico, azitromicina, claritromicina, cefaclor, cefprozil, loracarbef, cefdinir, cefixima, cefepodoxima y axetil cefuroxima son agentes orales que pueden utilizarse como terapia empírica para las infecciones del tracto respiratorio debidas a especies de *Haemophilus*. Los resultados de las pruebas de sensibilidad con estos agentes antimicrobianos a menudo carecen de utilidad para el tratamiento de determinados pacientes. Sin embargo, la prueba de sensibilidad de *Haemophilus* spp. con estos compuestos puede ser apropiada para estudios epidemiológicos o de vigilancia.

Las β-lactamasas de amplio espectro (BLEA) son enzimas producidas por bacilos gram-negativos, que se originan por mutación de los genes de β-lactamasas mediados por plásmidos convencionales. Las cepas de *Klebsiella* spp. y *E. coli* que producen β-lactamasas de amplio espectro (BLEA) pueden ser clínicamente resistentes a la terapia con penicilinas, cefalosporinas o aztreonam, a pesar de aparentar tener sensibilidad *in vitro* a algunos de estos agentes. Algunas de estas cepas mostrarán zonas de inhibición por debajo de la población normal de sensibilidad pero, por encima de los puntos límite normales para determinadas cefalosporinas de amplio espectro o aztreonam; dichas cepas pueden ser analizadas para detectar la posible producción de BLEA por medio de los puntos límite de los análisis de detección de BLEA antes de declarar resultados de penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro o aztreonam. Otras cepas pueden producir resultados intermedios o ser resistentes mediante los puntos límites normales a uno o más de estos agentes. En todas las cepas con BLEA, los diámetros de zona para una o más de las cefalosporinas de amplio espectro o aztreonam deben incrementarse en la presencia de ácido clavulánico, como se determina en las pruebas de confirmación fenotípicas. Los resultados del análisis deben ser interpretados como resistentes para todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam en todas las cepas productoras de BLEA. Consulte la nota a pie t para las pruebas de detección y confirmación para las BLEA. Tomando en consideración los temas de prevalencia, tratamiento y control de infecciones, el establecimiento debe tomar la decisión de realizar pruebas de detección de BLEA en todos los aislados de orina⁷.

Para reconocer los estafilococos resistentes a la metilicina, se deben utilizar discos de oxacilina que son más adecuados para detectar resistencia que los discos de nafcilina o metilicina. Por lo tanto, se debe utilizar un disco de 1 µg de oxacilina para probar la resistencia a metilicina u oxacilina. Cualquier zona alrededor del disco de oxacilina debe inspeccionarse minuciosamente utilizando luz transmitida, en busca de colonias pequeñas o de una ligera "película" de crecimiento dentro de la zona de inhibición, después de incubar durante 24 h. La mayoría de los estafilococos resistentes a la metilicina normalmente también son resistentes a múltiples agentes antimicrobianos, que incluyen aminoglicósidos, macrólidos, clindamicina, fenicolos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclina. La observación de resistencia múltiple debe considerarse un indicio de la posibilidad de resistencia a la metilicina. Sin embargo, cepas de *S. aureus* resistentes a la metilicina, que no presentan resistencia a otras clases de agentes antimicrobianos, se han aislado en poblaciones de pacientes tanto hospitalizados como externos. Si los resultados con la prueba de difusión en disco arrojan dudas sobre la presencia de *Staphylococcus* spp. resistentes a la metilicina, realice pruebas adicionales de confirmación, como se indica en el documento M7 del NCCLS⁹. Los *S. aureus* resistentes a metilicina u oxacilina (MRSA) y los estafilococos coagulasa negativos resistentes a la metilicina (MRS) deben declararse como resistentes (o no declararse en absoluto) a todas las penicilinas, antibióticos cefémicos, carbapenems y otros β-lactámicos, tales como amoxicilina/ácido clavulánico; ampicilina/sulbactam; ticarcilina/ácido clavulánico; piperacilina/tazobactam e imipenem, sin importar los resultados de la prueba *in vitro* con esos agentes, porque la mayoría de los casos de infecciones documentadas debidas a estafilococos resistentes a la metilicina han respondido mal a la terapia con β-lactámicos y todavía faltan datos clínicos convincentes que documenten la eficacia clínica de estos agentes⁶. Los aislados de estafilococos que se han demostrado como portadores del gen *mecA*, o que producen PBP 2a, el producto del gen *mecA*, deben señalarse como resistentes a la oxacilina.

Los criterios de interpretación de los estafilococos coagulasa negativos presentan una correlación con la presencia o ausencia de resistencia a la metilicina, codificada por el gen (*mecA*) para *S. epidermidis*. Dichos criterios pueden exagerar la resistencia para otros estafilococos coagulasa negativos, p.ej., *S. lugdunensis* o *S. saprophyticus*. En el caso de infecciones graves con estafilococos coagulasa negativos diferentes de *S. epidermidis*, puede considerarse adecuado el análisis para *mecA* o la proteína expresada por *mecA*, la proteína de unión a penicilinas 2a (PBP 2a, también conocida como PBP 2') para las cepas cuyos diámetros de zona se encuentren en el intervalo intermedio o resistente. Los aislados que no se demuestran como portadores del gen *mecA* o no producen PBP 2a no deben declararse como sensibles a oxacilina.

Se ha señalado que el análisis de sensibilidad con discos no es un método exacto para la determinación de la sensibilidad a la metilicina (oxacilina) para los estafilococos coagulasa negativos (es decir, *S. saprophyticus*)¹⁰. No se aconseja realizar pruebas de rutina de *S. saprophyticus* en aislados de orina, porque las infecciones responden a las concentraciones conseguidas en orina con los agentes antimicrobianos usados normalmente para tratar infecciones agudas no complicadas del tracto urinario (ej., nitrofurantoina, trimetoprima/sulfametoxazol o una fluoroquinolona).

Una prueba rápida de β-lactamasa (por ejemplo, utilizando discos de Cefinase) puede ofrecer información clínicamente relevante antes que una prueba de difusión en disco para *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *Moraxella catarrhalis*; es la única prueba fiable para detectar *Enterococcus* spp. productoras de β-lactamasa. Una prueba de β-lactamasa positiva predice la resistencia a la penicilina, ampicilina y amoxicilina entre *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *M. catarrhalis* y resistencia a la penicilina, incluidas la penicilina acilaminica, carboxilica y ureidica entre estafilococos y enterococos. Una prueba de β-lactamasa negativa no descarta la resistencia debido a otros mecanismos. No analice los miembros de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. ni otros bacilos aerobios gramnegativos, ya que los resultados pueden no predecir la sensibilidad a los β-lactámicos más usados para la terapia. La detección exacta de β-lactamasa en estafilococos puede requerir la inducción de la enzima y la incubación de una prueba basada en nitrocefina durante hasta 1 h. La inducción se puede lograr con facilidad anulando el crecimiento desde el margen de la zona que rodea al disco de oxacilina de la prueba. Se debe tener mucho cuidado para asegurarse de que los resultados sean exactos, incluido el análisis de cepas de control positivas y negativas en el momento en que se examinan los aislados clínicos⁶.

No es necesario efectuar pruebas de sensibilidad con fines clínicos de las penicilinas y otros β-lactámicos aprobados por la U.S. Food and Drug Administration para el tratamiento de estreptococos grupo A y B; además, estas pruebas no deben realizarse en forma rutinaria, puesto que, al igual que con la vancomicina, las cepas resistentes no han sido determinadas. Sin embargo, algunas cepas de *S. agalactiae* pueden dar resultados intermedios para penicilina. Los criterios para la interpretación se proporcionan para el desarrollo farmacéutico, epidemiología o control de posibles resistencias. Toda cepa que resulte ser intermedia o resistente debe ser enviada a un laboratorio de referencia para su confirmación.

Las pruebas de difusión en disco con ampicilina, penicilina y rifampicina para *Neisseria meningitidis* no son fiables. Se deben utilizar pruebas de concentración inhibitoria mínima (CIM) para estos organismos⁷.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO









- La prueba aquí descrita se aplica principalmente a patógenos aerobios de crecimiento rápido. Las bacterias de crecimiento exigente distintas de *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* y otros estreptococos deben ser analizadas utilizando un método de dilución⁹. El análisis de anaerobios requiere procedimientos especiales¹¹.
- Las clasificaciones de resistente, intermedio y sensible varían sólo por un milímetro, lo cual está dentro del error normal de laboratorio. Algunos cultivos pueden producir una zona límite que varía de un día para otro o de laboratorio en laboratorio; estos cultivos son relativamente poco comunes.
- Para detectar la resistencia neumocócica y enterocócica, siga estrictamente los métodos recomendados por el NCCLS⁶.
- Pueden estar en uso otros agentes antimicrobianos no incluidos en el gráfico. Las pruebas de sensibilidad que emplean estos agentes deben interpretarse basándose en la presencia o ausencia de una zona de inhibición evidente y sólo deben ser consideradas cualitativas, hasta el momento en que se establezcan zonas interpretativas. Deben registrarse todos los diámetros de zona.
- El análisis de confirmación de BLEA es válido solamente cuando se utilizan simultáneamente los cuatro discos (cefotaxima, cefotaxima / ácido clavulánico, ceftazidima, ceftazidima / ácido clavulánico). El uso individual de estos discos no es recomendado por el NCCLS^{6,7}.


† Adaptado en parte del Documento M100-513 (M2) del NCCLS: Disk Diffusion Supplemental Tables, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, con permiso. El estándar completo puede obtenerse del National Committee for Clinical Laboratory Standards, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 EE.UU. Los valores que no estén en M100-513 se explican en otras notas a pie de página. Para relaciones apropiadas de CMI, consulte el M100-513^{6,7,9}.


- La categoría "intermedia" incluye los aislados cuya CMI para los agentes antimicrobianos se acerca a los niveles que generalmente pueden lograrse en sangre y tejidos y para los cuales las tasas de respuesta pueden ser más bajas que para los aislados sensibles. La categoría "intermedia" implica que el fármaco puede aplicarse clínicamente en sitios del cuerpo donde los antibióticos se encuentran concentrados fisiológicamente (p. ej., quinolonas y β-lactámicos en orina), o cuando puede usarse una dosis más alta de lo habitual de un antibiótico (p. ej., β-lactámicos). La categoría "intermedia" también incluye una "zona de seguridad" que debe prevenir la producción de grandes discrepancias en la interpretación por pequeños factores técnicos incontrolados, especialmente para antibióticos que tienen márgenes estrechos de farmacotoxicidad.
- La reglamentación acerca de la generación de antibiogramas acumulativos debe establecerse en colaboración con el servicio de enfermedades infecciosas, el personal para el control de infecciones y el comité de farmacia y terapia. Por lo general, los porcentajes de los resultados sensibles e intermedios no deben combinarse en el mismo análisis estadístico.
- Estos estándares para el diámetro de las zonas y los límites de control de calidad sólo se aplican a aquellas pruebas con *Haemophilus* spp. que utilicen el medio de prueba Haemophilus (HTM) incubado en CO₂ al 5% (16 – 18 h). Se recomienda el *H. influenzae* ATCC 10211 como una cepa de control de calidad adicional, para verificar las propiedades que tiene el agar del medio de prueba Haemophilus para favorecer el crecimiento. El margen de la zona debe considerarse como el área que muestra que no existe crecimiento obvio a simple vista. El crecimiento escaso de diminutas colonias que parecen rodear en forma difusa la zona más obvia, deben ignorarse en la medición.
- Estos estándares para el diámetro de las zonas y los límites de control de calidad son aplicables únicamente a las pruebas realizadas utilizando la base de agar GC con un suplemento de crecimiento definido al 1% (p. ej., agar GC II BBL con enriquecimiento IsoVitalEx) incubadas en CO₂ al 5% (20 – 24 h).
- Estos estándares para el diámetro de las zonas y los límites de control de calidad son aplicables únicamente a las pruebas realizadas utilizando agar de Mueller Hinton suplementado con sangre de carnero defibrinada al 5% incubada en CO₂ al 5% (20 – 24 h). Las normas de interpretación se aplican a *S. pneumoniae* y a otros estreptococos según las indicaciones. Los resultados pueden ser inexactos si los criterios especificados se aplican a otros organismos que no sean los enumerados. Los criterios de interpretación para estreptococos distintos de *S. pneumoniae* se proponen en base a las distribuciones en la población de diversas especies, la farmacocinética de los agentes antimicrobianos, la literatura previamente publicada y la experiencia clínica de ciertos miembros del subcomité del NCCLS. No estuvieron disponibles datos clínicos recogidos sistemáticamente para la revisión para muchos de los compuestos en el grupo⁷. A pesar de la falta de criterios de interpretación fiables de difusión en disco para *S. pneumoniae* con determinados β-lactámicos, *S. pneumoniae* ATCC 49619 es la cepa designada para el control de calidad de todas las pruebas de difusión en disco con la totalidad de *Streptococcus* spp.
- Los tamaños de la zona de inhibición recomendados por los laboratorios farmacéuticos y aprobados por la FDA no están incluidos en el M100-513 (M2-A8) del NCCLS⁷.
- Se ha designado otra cepa de *E. coli* (ATCC 35218) para el control de calidad de los discos que contienen combinaciones de β-lactámicos e inhibidores de β-lactamasas. Esta cepa produce una β-lactamasa que debe ser inactivada por el inhibidor. Cuando se usa junto con la cepa ATCC 25922, se pueden estudiar ambos componentes de los discos combinados. Los límites de control de esta cepa para amoxicilina/ácido clavulánico son de 17 – 22 mm, para ampicilina/sulbactam son de 13 – 19 mm, para piperacilina son de 12 – 18 mm, para piperacilina/tazobactam son de 24 – 30 mm y para ticarcilina/ácido clavulánico son de 21 – 25 mm.
- Los neumococos aislados que presentan zonas de ≥20 mm con oxacilina son sensibles (CMI ≤0,06 µg/mL) a la penicilina y pueden considerarse sensibles a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefaclor, cefdinir, cefepima, cefetamet, cefixima, cefotaxima, cefprozil, ceftributen, ceftriaxona, cefuroxima, cefazolin, cefepodoxima, ceftiozoxima, ertapenem, imipenem, loracarbef y meropenem para las indicaciones aprobadas, sin necesidad de analizar estos agentes. Se debe determinar la CIM para penicilina, meropenem y cefotaxima o ceftriaxona en los aislados con zonas de ≤19 mm para oxacilina, ya que se producen zonas de ≤19 mm con cepas resistentes a la penicilina, cepas intermedias o con determinadas cepas sensibles. Los aislados no deben comunicarse como resistentes o intermedios a la penicilina basándose sólo en una zona de ≤19 mm para oxacilina. Se pueden utilizar amoxicilina, ampicilina, cefepima, cefotaxima, ceftriaxona, cefuroxima, ertapenem, imipenem, y meropenem para tratar las infecciones neumocócicas; sin embargo, no existen todavía pruebas de sensibilidad fiables de difusión en disco con estos agentes. Su actividad *in vitro* se determina mejor utilizando un método de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria). Penicilina, cefotaxima o ceftriaxona y meropenem deben analizarse por un método de CMI fiable (tal como se describe en el documento M7 del NCCLS) y declararse rutinariamente con los aislados de *S. pneumoniae* obtenidos de LCR. Esos microorganismos aislados también deben analizarse para vancomicina, utilizando el método de CMI o de disco. Con aislados de otras zonas del organismo, se puede utilizar la prueba de detección con disco de oxacilina. Si la zona de oxacilina es ≤19 mm, se debe determinar las CIM para penicilina, cefotaxima o ceftriaxona. Para determinar la sensibilidad al cefdinir de estreptococos distintos de *S. pneumoniae*, utilice el disco de penicilina de 10 unidades; los aislados con zonas ≥28 mm para penicilina son sensibles a la penicilina y pueden considerarse sensibles al cefdinir.
- Un aislado estreptocócico que es sensible a la penicilina puede considerarse sensible a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefaclor, cefazolin, cefdinir, cefepima, cefprozil, cefotaxima, ceftributen (únicamente estreptococos del grupo A), ceftriaxona, cefuroxima, cefepodoxima, ceftiozoxima, cefalotina, cefapirina, cefradina, ertapenem (sólo β-hemolítico), imipenem, loracarbef y meropenem para las indicaciones aprobadas, y no necesita analizarse para estos agentes. La sensibilidad a la penicilina o ampicilina de los estreptococos del grupo *viridans* aislados en sangre y zonas del organismo normalmente estériles (p. ej., líquido cefalorraquídeo, sangre, hueso, etc.) se debe analizar utilizando un método de CIM.
- Los estafilococos sensibles a la penicilina también son sensibles a otras penicilinas, combinaciones de inhibidores de β-lactámicos y de β-lactamasas, cefemas y carbapenems aprobadas por la FDA para el uso en las infecciones estafilocócicas. Las cepas resistentes a penicilina y sensibles a oxacilina son resistentes a las penicilinas lábiles de penicilinas, pero sensibles a otras penicilinas estables a la penicilinas, las combinaciones de inhibidores de β-lactámicos y de β-lactamasas, cefemas relevantes y carbapenems. Los estafilococos resistentes a la oxacilina son resistentes a todos los antibióticos β-lactámicos actualmente disponibles. Por tanto, la sensibilidad o la resistencia a una gran variedad de antibióticos β-lactámicos pueden deducirse del análisis exclusivo de penicilina y oxacilina. Las pruebas de rutina de las otras penicilinas, combinaciones de inhibidores de β-lactámicos y de β-lactamasa, cefemas y carbapenems no son recomendadas⁷. En el caso de los estafilococos resistentes a la oxacilina, declarar como resistentes o no informar.

- k Algunas cepas raras de *Haemophilus influenzae*, β -lactamasa negativas, resistentes a la ampicilina (BLNRA), también deben ser consideradas resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefaclor, cefetamet, cefonicida, cefprozilo, cefuroxima y loracarbef, a pesar de que algunas cepas BLNRA muestran una aparente sensibilidad a estos agentes *in vitro*.
- l Representante de la clase de ampicilina y amoxicilina.
- m Para *V. cholerae*, los resultados de las pruebas de difusión en disco para ampicilina, tetraciclina, trimetoprima/sulfametoxazol y sulfonamidas (es decir, los porcentajes correspondientes a sensible, intermedia y resistente) se correlacionan bien con los resultados determinados por la microdilución en caldo. Los resultados de la tetraciclina pueden utilizarse para predecir la probable sensibilidad a la doxiciclina de los aislados; no utilice el análisis en disco para la doxiciclina o eritromicina porque su correlación con los resultados de CMI es mala.
- n La Ampicilina es la clase representativa para la ampicilina y la amoxicilina. Los resultados para ampicilina se pueden utilizar para determinar la sensibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, piperacilina y piperacilina/tazobactam entre los enterococos no productores de β -lactamasa. La sensibilidad a la penicilina puede utilizarse para predecir la sensibilidad a ampicilina, amoxicilina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina y piperacilina/tazobactam para los enterococos no productores de β -lactamasa. La categoría "sensible" para penicilina o ampicilina implica la necesidad de una terapia con altas dosis para las infecciones enterocócicas graves. La endocarditis enterocócica requiere una terapia combinada con altas dosis de penicilina o de ampicilina, o vancomicina o teicoplanina más gentamicina o estreptomina para acción bactericida. Puesto que la resistencia a penicilina o ampicilina entre los enterococos debida a la producción de β -lactamasa no se detecta de manera fiable utilizando los métodos sistemáticos de dilución o de disco, se recomiendan las pruebas directas de β -lactamasa que utilizan nitrocefin para los microorganismos aislados en sangre y líquido cefalorraquídeo. Una prueba positiva para β -lactamasa predice resistencia a penicilina, así como también a acilaminopenicilina, carboxipenicilina y ureidopenicilina. Determinados enterococos resistentes a penicilina o ampicilina pueden tener un alto nivel de resistencia (ej., CMI para penicilina ≥ 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o CMI para ampicilina ≥ 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La prueba en disco no diferencia los que tienen resistencia normal de los que tienen este alto nivel de resistencia. Para los enterococos obtenidos de muestras de sangre y de líquido cefalorraquídeo (LCR), el laboratorio debe considerar la determinación de la CMI actual para penicilina o ampicilina, ya que las cepas de *E. faecium* con un nivel de resistencia más bajo de lo normal (CMI para penicilina ≤ 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y ampicilina ≤ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) deben considerarse potencialmente sensibles a la sinergia con un aminoglucósido (en ausencia de un alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos), mientras que las cepas con un nivel de resistencia más alto del normal, pueden ser resistentes a tal sinergia⁶.
- o La sinergia entre la ampicilina, la penicilina o la vancomicina y un aminoglucósido puede predecirse en los enterococos por medio de una prueba de detección con un aminoglucósido de alto nivel (gentamicina y estreptomina). No es necesario analizar otros aminoglucósidos, porque sus actividades contra los enterococos no superan la de la gentamicina y la estreptomina.
- p Los resultados de las pruebas de sensibilidad a la ampicilina deben utilizarse para predecir la actividad de la amoxicilina. La mayoría de los aislados de *H. influenzae* resistentes a la ampicilina y la amoxicilina producen una β -lactamasa de tipo TEM. En la mayor parte de los casos, una prueba directa de β -lactamasa puede ser un método rápido para detectar la resistencia a ampicilina y amoxicilina.
- q Puede informarse para *Acinetobacter* spp. resistentes a otros agentes.
- r No se detecta sistemáticamente para los aislados de las vías urinarias.
- s La sensibilidad y la resistencia a la azitromicina, la claritromicina y la diritromicina pueden predecirse utilizando la eritromicina.
- t Véase la discusión de los BLEA en "RESULTADOS". Para realizar análisis de detección y confirmación de BLEA en *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. coli*, véase la sección de "RESULTADOS" y referencias⁷. Los puntos límites de análisis (agar Mueller Hinton, procedimiento normal de difusión en disco, 35 °C, temperatura ambiente, 16 – 18 h) son: aztreonam (≤ 27 mm), ceftazidima (≤ 22 mm), cefotaxima (≤ 27 mm), cefpodoxima (≤ 17 mm) y ceftriaxona (≤ 25 mm). Las recomendaciones para el control de calidad son: *E. coli* ATCC 25922 (como se indica en el diagrama); *K. pneumoniae* ATCC 700603 (aztreonam 9 – 17 mm), ceftazidima (10 – 18 mm), cefotaxima (17 – 25 mm), cefpodoxima (9 – 16 mm) y ceftriaxona (16 – 24 mm)⁷. El uso de más de un agente antimicrobiano para la detección mejora la sensibilidad del proceso. Las pruebas de confirmación fenotípicas requieren el uso conjunto de cefotaxima y ceftazidima, solas y en combinación con ácido clavulánico. Un diámetro de la zona ≥ 5 mm con cualquiera de los agentes antimicrobianos analizados en combinación con el ácido clavulánico vs. la dimensión de la zona al ser analizados por sí solos = BLEA. Las recomendaciones para Control de Calidad son: cepa negativa *E. coli* ATCC 25922 que produce un aumento de ≤ 2 mm del diámetro de la zona para el agente antimicrobiano analizado por sí solo vs. el diámetro de la zona al ser analizado en combinación con ácido clavulánico; cepa positiva *K. pneumoniae* ATCC 700603 que produce un aumento de ≥ 3 mm en el diámetro de la zona de cefotaxima y un aumento de ≥ 5 mm en el diámetro de la zona de ceftazidima. Véase "Limitaciones del procedimiento". Véa referencia 7 para detalles del procedimiento.
- u La cefalotina puede utilizarse para predecir la actividad de la cefalotina, cefapirina, cefradina, cefalexina, cefaclor y cefadroxilo. La cefazolina, cefuroxima, cefpodoxima, cefprozilo y loracarbef (sólo para aislados urinarios) pueden analizarse individualmente porque algunos aislados pueden ser sensibles a estos agentes cuando son resistentes a cefalotina.
- v No se usa para analizar *Morganella* spp.
- w Para *N. gonorrhoeae*, un resultado intermedio para un agente antimicrobiano indica la existencia de un problema técnico, que debería resolverse mediante repetición de la prueba, o la falta de experiencia clínica en el tratamiento de organismos que producen estas zonas. El último caso parece ser lo que ocurre con el cefmetazol, cefotetan, cefoxitina y espectinomicina. Las cepas que tienen zonas intermedias con los otros agentes tienen una tasa de curación clínica documentada inferior (85 – 95%), en comparación con >95% de las cepas sensibles.
- x Para aislados procedentes de líquido cefalorraquídeo, deben analizarse y comunicarse los resultados de cefotaxima, ceftizoxima y ceftriaxona en lugar de los de cefalotina y cefazolina.
- y Puesto que se ha declarado que algunas cepas de *Providencia* spp. dan resultados de sensibilidad falsos con discos de cefprozilo, las cepas de este género no deben analizarse ni declararse con este disco.
- z Indicado exclusivamente para los aislados de orina. Además de analizar aislados de orina, el ácido nalidixico puede utilizarse para detectar una menor sensibilidad a la fluoroquinolona en aislados de pacientes con infecciones extraintestinales de *Salmonella*. Véase la nota de pie ddd.
- aa *Staphylococcus* spp. pueden desarrollar resistencia durante la terapia prolongada con quinolonas. Por tanto, los aislados que son inicialmente sensibles pueden volverse resistentes 3 ó 4 días después de iniciar la terapia. El análisis de aislados repetidos puede ser justificado.
- bb Para *V. cholerae*, utilícelo con cautela, porque la prueba de difusión en disco puede clasificar muchos organismos erróneamente (siendo elevada la tasa de errores menores).
- cc No se han establecido criterios para apoyar el análisis de este fármaco con *Streptococcus pneumoniae*. El rango de control se presenta sólo para propósitos de control de calidad.
- dd La colistina y la polimixina B se difunden escasamente en agar, por lo que la precisión del método de difusión es menor que para otros antibióticos. La resistencia es siempre significativa, pero cuando se considera el tratamiento de enfermedades sistémicas causadas por cepas sensibles, se recomienda confirmar los resultados de la prueba de difusión con un método de dilución.
- ee Los microorganismos sensibles a la tetraciclina también se consideran sensibles a la doxiciclina y minociclina. Sin embargo, algunos microorganismos intermedios o resistentes a la tetraciclina pueden ser sensibles a la doxiciclina, a la minociclina o ambas.
- ff Aprobado por la FDA para *S. saprophyticus* y *S. epidermidis* (no *S. aureus*).
- gg Para los límites de control de los discos de 120 μg de gentamicina y 300 μg de estreptomina, utilice *E. faecalis* ATCC 2912 (gentamicina: 16 – 23ⁱⁱ mm; estreptomina: 14 – 20ⁱⁱ mm).
- hh Si la zona es de 7 – 9 mm, la prueba no es concluyente y debe realizarse una prueba de dilución en agar o de microdilución en caldo para confirmar la resistencia.
- ii Tamaños de las zonas recomendados por el NCCLS que difieren del tamaño de las recomendaciones sobre tamaños de zonas aprobados por la FDA.
- kk Puesto que se ha comunicado que algunas cepas de *Citrobacter*, *Providencia* y *Enterobacter* spp. dan resultados de sensibilidad falsos con los discos de cefdinir y de loracarbef, las cepas de estos géneros no deben ser analizadas ni declaradas con estos discos.
- ll Debido a la falta de disponibilidad de metilicina en polvo, no están disponibles los discos de metilicina.
- mm No se han establecido criterios para apoyar el análisis de este fármaco con *Pseudomonas aeruginosa*. El rango de control se presenta sólo para propósitos de control de calidad.
- nn Entre las penicilinas estables a la penicilinasas, puede analizarse la oxacilina y los resultados se pueden aplicar a las demás penicilinas estables a la penicilinasas, la cloxacilina y la dicloxacilina. Se prefiere la oxacilina porque es más resistente a la degradación durante el almacenamiento y porque tiene mayor probabilidad de detectar cepas estafilocócicas heteroresistentes. Los discos de cloxacilina no deben utilizarse porque pueden no detectar *S. aureus* resistente a la oxacilina. Si se obtienen resultados intermedios para *S. aureus*, realice una prueba de detección en agar con sal de oxacilina. (Véase M7-A6⁹.)
- oo Después de un periodo de incubación de 24 h, examine si hay un crecimiento leve dentro de la zona de inhibición del disco de oxacilina, utilizando luz transmitida (sujetando la placa contra un foco de luz). La mayoría de los estafilococos resistentes a la metilicina normalmente son también resistentes a múltiples agentes antimicrobianos, que incluyen aminoglucósidos, macrólidos, clindamicina, fenicoles, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclina. La observación de resistencia múltiple debe considerarse un indicio de la posibilidad de resistencia a la metilicina. Sin embargo, cepas de *S. aureus* resistentes a la metilicina, que no presentan resistencia a otras clases de agentes antimicrobianos, se han aislado de poblaciones de pacientes tanto hospitalizados como externos.
- pp Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina y sensibles a oxacilina producen β -lactamasa, por lo que se prefiere el análisis del disco de 10 unidades de penicilina en lugar del disco de ampicilina. Se debe utilizar la penicilina para analizar la sensibilidad de todas las penicilinas lábiles a β -lactamasas, como ampicilina, amoxicilina, azlocilina, carbenicilina, mezlocilina, piperacilina y ticarcilina. Asimismo, una prueba positiva de la β -lactamasa predice la resistencia a estos agentes⁶. En el caso de los estafilococos resistentes a la oxacilina, declarar como resistentes o no declarar.
- qq Una prueba positiva de la β -lactamasa predice la resistencia a penicilina, ampicilina y amoxicilina. La prueba de la β -lactamasa detectará una forma de resistencia a la penicilina en *N. gonorrhoeae*, y también puede utilizarse para obtener información epidemiológica. Las cepas con resistencia mediada por cromosomas pueden detectarse únicamente por pruebas adicionales de la sensibilidad, tales como el método de difusión en disco o el método de determinación de la CIM por dilución en agar. Los gonococos analizados con discos de 10 unidades de penicilina que muestren diámetros ≤ 19 mm probablemente son cepas productoras de β -lactamasa. Sin embargo, la prueba de β -lactamasa se prefiere a otros métodos de sensibilidad para la determinación rápida y segura de esta resistencia a la penicilina mediada por plásmidos.
- rr Las pruebas de sensibilidad a la penicilina de *S. pyogenes* rara vez son necesarias, porque este microorganismo sigue siendo universalmente sensible a la penicilina. Sin embargo, algunas cepas de *S. agalactiae* pueden dar resultados intermedios a la penicilina⁷.
- ss No se debe utilizar la rifampicina sola en la quimioterapia⁷.
- tt El disco de sulfisoxazol puede ser usado para representar cualquiera de las sulfonamidas normalmente disponibles. Los medios que contienen sangre (excepto la sangre lisada de caballo) generalmente no son adecuados para analizar las sulfonamidas o la trimetoprima. El agar de Mueller Hinton debe estar lo más libre posible de timidina para las pruebas de sulfonamida y/o trimetoprima. Para determinar si el agar de Mueller Hinton tiene niveles de timina y timidina lo suficientemente bajos, se debe analizar *Enterococcus faecalis* ATCC 2912 o ATCC 33186 con el disco de trimetoprima-sulfametoxazol (véase ref. 12). Una zona de inhibición ≥ 20 mm básicamente libre de colonias diminutas indica la presencia de niveles suficientemente bajos de timina y timidina⁶.
- uu Los gonococos que producen zonas de ≤ 19 mm de diámetro con el disco de 30 μg de tetraciclina suelen indicar un aislado de *N. gonorrhoeae* cuya resistencia a la tetraciclina es mediada por plásmido (TRNG). Estas cepas deben ser confirmadas por una prueba de dilución (CIM ≥ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y/o remitidas a un laboratorio de salud pública para su investigación epidemiológica.
- vv Todos los aislados de estafilococos con un diámetro de la zona de 14 mm o menos deben analizarse por un método de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria). Envíe los estafilococos determinados como resistentes a la vancomicina a un laboratorio de referencia⁷. El procedimiento de difusión en disco no diferencia las cepas con una sensibilidad reducida a la vancomicina (CMI 4 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de las cepas sensibles (rango de CMI de 0,5 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incluso si se incuba 24 h. Para reconocer las cepas con CMI de 4 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para vancomicina, deben realizarse análisis de CMI. La prueba de detección en agar para vancomicina descrita para enterococos puede tener éxito para detectar estos aislados, si se incuban las placas durante 24 h a 35 °C, pero debe confirmarse mediante una prueba de CMI. La utilización de una cepa sensible para control de calidad, tal como *S. aureus* ATCC 29213 es crítica para asegurar la especificidad. Mientras no se conozcan más datos sobre la prevalencia o significado clínico de estos aislados, los laboratorios pueden elegir examinar con más cuidado las cepas MRSA para las CMI elevadas a la vancomicina⁶.
- ww Cuando se analiza la vancomicina frente a los enterococos, las placas deben mantenerse durante 24 h y se deben examinar utilizando luz transmitida; la presencia de una sombra o cualquier crecimiento en la zona de inhibición indica resistencia. Los organismos con zonas intermedias deben analizarse por un método de CMI tal como lo describe el documento M7 del NCCLS. Véase también la prueba de detección en agar para vancomicina descrita en la Tabla de CMI 2D (M100-S13)⁹.
- xx No se ha observado ninguna cepa de *S. pneumoniae* con una zona de inhibición por vancomicina < 17 mm; tales cepas deben remitirse a un laboratorio de referencia⁷.
- yy Debido a las limitadas alternativas, se puede utilizar cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina (o doxiciclina o minociclina) y rifampicina para enterococos resistentes a vancomicina (VRE) además de consultar con un especialista en enfermedades infecciosas⁷.
- aaa No se han observado cepas de estreptococos β -hemolíticos con diámetros de zona de ampicilina, cefepima, cefotaxima, ceftriaxona o penicilina inferiores a 24 mm; las cepas de estas características deben remitirse a un laboratorio de referencia.
- bbb El deterioro del contenido del disco de oxacilina se valora mejor con *S. aureus* ATCC 25293, con un diámetro de zona aceptable de 18 – 24 mm.
- ccc Para ampicilina, cefepima, cefotaxima, ceftriaxona y penicilina, los **estreptococos sólo β -hemolíticos** incluyen las cepas piogénicas formadoras de grandes colonias de estreptococos con antígenos del grupo A (*S. pyogenes*), C o G, y cepas con antígeno del grupo B (*S. agalactiae*). Para cefepima, cefotaxima y ceftriaxona, **S. viridans** incluye las cepas β -hemolíticas formadoras de pequeñas colonias con antígenos del grupo A, C, F o G (*S. anginosus*, anteriormente denominado *S. milleri*) además de *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. mutans* y *S. bovis*.
- ddd Las cepas de *Salmonella* sensibles a la fluoroquinolona y resistentes al ácido nalidixico pueden asociarse con una falla clínica o demora en la respuesta de pacientes con salmonellosis extraintestinal tratados con fluoroquinolona. Se puede considerar la realización de la prueba de resistencia al ácido nalidixico en aislados extraintestinales de *Salmonella*.

REFERENCIAS: Ver "Referencias" en el texto en inglés.

-  In Vitro Diagnostic Medical Device
-  Temperature limitation
-  Catalog number
-  Consult Instructions for Use
-  Authorized Representative in the European Community
-  Batch Code (Lot)
-  Manufacturer
-  Use by
YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month)

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

 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, Sensi-Disc and Trypicase are trademarks of Becton, Dickinson and Company © 2004 BD.