



## Kommentar zum Ringversuch B9 Mikrobiologie 2012-1

**Probe A:** Postoperative Wundinfektion

**Anforderung:** Anforderung: potentiell pathogene Bakterien

**(Genus und Spezies)**

**Resistenzbestimmung gegen 6 infektionsrelevante Antibiotika**

Es handelte sich um einen Methicillin (Oxacillin-) sensiblen Stamm von *Staphylococcus aureus* (MSSA). Die Spezies-Diagnose dürfte nicht allzu schwierig gewesen sein (gelbes Pigment, positive Koagulasereaktion). Zu beachten ist, dass die selten vorkommenden Koagulase-positiven nicht *S. aureus*-Spezies kein Pigment bilden (Man Clin Microbiol (MCM)10th ed, S. 310-11).

Die MHK gegen Oxacillin betrug auf MHA 1.0 mg/L, auf MHA mit 2 % NaCl 0.75 mg/L (keine Differenz!); der Hemmzonen-Durchmesser um das 1 µg Oxacillin-Blättchen betrug 15 mm (CLSI), um das 30 µg Cefoxitin-Blättchen (Surrogat für Oxacillin) 29 mm, d.h. es lag Empfindlichkeit gegen Oxacillin/Methicillin sowohl nach EUCAST- wie auch nach CLSI - Kriterien vor. Molekularbiologisch waren die Nachweise für *mecA* und für das Pantone-Valentine-Leukozidin (PVL) negativ. Die Latex-Agglutination mit anti-PBP2a monoklonalen Antikörpern (Denka Seiken), die auf das Genprodukt von *mecA* fokussieren, war erwartungsgemäss negativ. Der Stamm produzierte Beta-Laktamase (*blaZ*), die in resistenten Hemmzonen mit scharfem Rand (!) für Penicillin und Ampicillin resultierte und im Nitrocefin-Test angezeigt werden konnte; nach Induktion war der Flüssig-Nitrocefin-Test innert 5 Minuten stark positiv, was immerhin auch die nicht ganz niedrige Oxacillin MHK erklärt. Es ist zu beachten, dass die Richtlinien – EUCAST 2012 und CLSI 2012 – die Durchführung der Beta-Laktamase für Staphylokokken nicht mehr empfehlen; wenn der Hemmhofrand für Ampicillin oder Penicillin scharf ist (steht jetzt auch bei CLSI 2012 so), aber die entsprechenden Hemmhofdurchmesser über den Grenzwerten liegen, dann muss Penicillin und Ampicillin resistent gesetzt werden. Der Grund dafür ist die ungenügende Sensitivität der Nitrocefin-Beta-Laktamase-Tests (insbesondere der Blättchenteste).

Der Stamm war zudem resistent gegen Tetracyclin, aber empfindlich auf Amoxicillin-Clavulansäure (MHK 15 mg/l), Erythromycin, Clindamycin, Aminoglycoside, Fluorochinolone, und Rifampicin.

*Staphylococcus aureus*

Anzahl  
68

**Probe B:                    Konjunktival-Abstrich bei Conjunctivitis**  
**Anforderung:            Anforderung: potentiell pathogene Bakterien**  
**(Genus und Spezies)**  
**Resistenzbestimmung gegen 4 relevante Antibiotika**

Es handelte sich um einen Stamm von *Haemophilus influenzae*, dem häufigsten Erreger der bakteriellen Conjunctivitis im Kindesalter (Ped Infect Dis J 2005; 24:823-8). Diese Stämme sind zumeist nicht serotypisierbar. Häufig ist eine assoziierte Infektion des oberen Respirationstrakts.

Im direkten Grampräparat zeigten sich gramnegative Kokkobazillen, zwischen denen sich fadenförmige Stäbchen befanden (Abb. siehe Manual of Clinical Microbiology 10th ed, S. 592). Inokulation aller Konjunktivalproben auf Agar mit 5% Pferdeblut + 20 mg/l beta-NAD (s. EUCAST-Methodologie) oder auf traditionellem Schokoladenagar mit Hämin ist notwendig, da Haemophili nicht auf Schafblutagar wachsen. Die Speziesdiagnose kann durch Ammenplatte erfolgen, die allerdings auf BHIA- oder TSA-Basis hergestellt werden und Enterokokken als Amme verwenden sollte, da andere Basalmedien gelegentlich Spuren von Hämin enthalten (J Clin Microbiol 1984; 20:599-601) und die als Amme verwendeten Staphylokokken genügend Katalase als Häminersatz bilden können (J Med Microbiol 1972; 5:509-14). Verlässlicher ist der Prophyrintest, der Häminsynthese reflektiert (*H. influenzae* ist negativ, Technik s. MCM S. 596). Biotypisierung erfolgt mit Testen für Indol, Orinithindekarboxylase und Harnstoff, z.B. im API NH System. Unser Stamm war vom Biotyp 1 (alle 3 Teste positiv), der allerdings bei Conjunctivitis nur selten vorkommt (J Infect Dis 1983; 147:800-6).

Am wichtigsten, weil relativ häufig, ist die Ampicillin-Resistenz bei *H. influenzae*, die entweder durch Beta-Laktamase oder durch veränderte PBPs (sog. BLNAR) bedingt sein kann. Der erstgenannte Mechanismus ist häufiger, betrifft – im Gegensatz zum zweiten – nicht die Cephalosporine, und kann mit einem Nitrocefin-Test oder einem Phenoxyethyl-Penicillin (Pen V!)-Blättchen nachgewiesen werden (s. EUCAST Break-point-Tabellen). Die neuen EUCAST-Richtlinien haben neu als Screening das Penicillin-Blättchen mit 1 unit vorgeschlagen, aber Penicillin soll nicht berichtet werden. Die Grenzwerte für Ampicillin gelten nur, wenn die Beta-Laktamase negativ ist; unser Stamm war Beta-Laktamase positiv, so dass Ampicillin als resistent berichtet werden muss. Die weitere Resistenztestung erfolgt auf dem oben angegebenen Pferdeblut-Agar. Der Stamm, resistent auf Penicillin, Ampicillin und Amoxicillin, war empfindlich auf Amoxicillin-Clavulansäure, Cephalosporine, Rifampicin, Fluorochinolone (Moxifloxacin-Tropfen!), Co-Trimoxazol, und resistent gegen Tetracyclin. Bei Conjunctivitis ist Lokaltherapie (Salbe oder Tropfen) die Regel.

	Anzahl
<i>Haemophilus influenzae</i>	65
<i>Haemophilus species</i>	1

**Probe C:            Sputum bei Pneumonie (CGD-Patient)**

**Anforderung:    Anforderung: potentiell pathogene Bakterien  
(Genus und Spezies)**

Es handelte sich um einen Stamm des *Burkholderia cepacia*-Komplexes, der heute insgesamt 17 nichtfermentative gramnegative Spezies umfasst (MCM 10, S. 699). Sie kommen v.a. bei Lungen- infektionen von Patienten mit Mukoviszidose (Clin Infect Dis 2003; 37:780-5) und chronischer Granulomatose (CGD) (J Clin Microbiol 1975; 1: 425-8) vor, sind Keime der feuchten Umgebung (Emerg Infect Dis 2007; 13:458-61) und können von Patient zu Patient (Lancet 1990; 336:1094-6) sowie von kontaminierten Gegenständen oder Infusaten (J Clin Microbiol 1996; 34:584-7) übertragen werden. Sie erhöhen das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko bei den genannten Patientengruppen und gehören zu den multiresistenten Spezies. In vitro sind am ehesten wirksam Fluorochinolone, Cotrimoxazol, Ceftazidim, Imipenem und Meropenem, sowie Minocyclin und Chloramphenicol (!) ( Chest 2005; 128:2336-46, Antimicrob Ag Chemother 2007; 51:1085-8).

Die Verwendung von Selektivmedien (PC-Agar, OFBPL-Agar, BCSA-Agar) führt zu signifikant höheren Isolationsraten (J Clin Microbiol 1997; 35:614-9; und 1999; 37:1004-7). Die Spezies-Identifikation (MCM 10th ed, S. 699) mit kommerziellen Systemen ist häufig unmöglich (J Clin Microbiol 2002; 40:1743-8), so dass Sequenzierung angeschlossen werden muss. Unser Stamm bildete auf SBA graue Kolonien und nach 2 Tagen ein leicht gelbliches Pigment, das sich auch auf TSI-Agar zeigte. Auf MacConkey Agar zeigten sich nach 3 Tagen dunkelrote (Laktose-Oxidation) und auf CEPA-Agar (*Burkholderia cepacia* Agar Base, Oxoid) rosa Kolonien. API 20NE (0067577) ergab «*B. cepacia*» (= *B. cepacia*-Komplex) mit 99.9% Wahrscheinlichkeit und einem T-Wert von 0.94; Vitek 2 (0663651413540310) diagnostizierte «*B. cepacia*-Gruppe». Die biochemischen Reaktionen der am häufigsten vorkommenden Spezies, *B. cenocepacia* (früher Genomovar III) und *B. multivorans* stimmten mit diesen Codes und der Pigmentbildung nicht überein. Wir haben deshalb die Diagnose «*B. cepacia*-Komplex» sowie alle in ihr eingeschlossenen Spezies als korrekt anerkannt.

*Burkholderia cepacia*

Anzahl  
68

**Probe D:                    Pleurapunktat bei Empyem**

**Anforderung:            Anforderung: potentiell pathogene Bakterien**

**(Genus und Spezies)**

Es handelte sich um einen Stamm von *Actinomyces odontolyticus*. Dieser Keim kommt im menschlichen Speichel und v.a. in pathologischen Proben aus dem Respirationstrakt vor (Emerg Infect Dis 2003; 9:1629-32). Die gelegentlich angetroffene Meinung, alle grampositiven, zum Genus *Actinomyces* gehörenden Spezies seien obligat anaerob, zeigten Verzweigungen im Grampräparat und bildeten im Gewebe Drusen (sulfur granules), trifft tatsächlich nur für einige von ihnen zu. Die Mehrzahl der über 20 heute bekannten Spezies ist aerotolerant und zeigt oft rein coryneforme (diphtheroide) Morphologien mit oder ohne Verzweigungen. Drusen kommen fast ausschliesslich bei primär anaeroben *A. israelii*- und *A. meyeri*-Infektionen vor (J Clin Microbiol 2002; 40:3442-8). Gemeinsam sind allen *Actinomyces* spp. bestimmte chemotaxonomische Charakteristika, von denen in einigen Laboratorien die Bestimmung der Endprodukte des Glukoseabbaus bestimmt werden können: *Actinomyces* spp. bilden v.a. Bernsteinsäure (succinic acid), Essigsäure (acetic acid) und Milchsäure (lactic acid); dies im Unterschied zu Lakto- und Bifidobakterien. Die biochemischen Eigenschaften (MCM 10, S. 824) können mittels kommerziellen Systemen bestimmt werden (API Coryne, APUI 20A, Rapid ANA II, Vitel 2 ANC card); allerdings sind nicht in allen Datenbasen sämtliche Spezies vertreten, so dass eine verlässliche Identifizierung manchmal nicht erfolgen kann (J Clin Microbiol 2004; 42:418-20 und 2011; 49:1745-9).

*A. odontolyticus* ist aerotolerant, bildet nach > 2 Tagen glatte, nicht adhärenzte Kolonien mit braunem bis purpurrotem Pigment und zeigt diphtheroide Stäbchen mit gelegentlichen Verzweigungen. Identifizierungsversuche unseres Stammes mittels API-Galerien und Vitek 2 ergaben keine klare Speziesdiagnosen ; das gleiche galt für die Sequenzierung und MALDI-TOF(!). Succinat war das vorwiegende Endprodukt des Glukoseabbaus. Hingegen wiesen bestimmte morphologische Eigenschaften (**Pigmentbildung**, glatte Kolonien, nur gelegentliche Verzweigungen) auf *A. odontolyticus* hin. Von den wenigen pigmentierten *Actinomyces* spp. (*A. radidentis*, *A. urogenitalis*, *A. graevenitzii*) kann *A. odontolyticus* durch Tests für Nitratreduktion, N-acetylglucosaminidase und Aeskulinhydrolyse abgetrennt werden. Von anderen Genera (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) ist die Trennung durch Kolonie- und mikroskopische Morphologie, biochemische Charakteristika (v.a. Nitratreduktion) und die Bestimmung metabolischer Fettsäuren durchführbar (s. MCM 10 S. 818 ff).

Wir möchten darauf hinweisen, dass Sie unter [www.swissmicrobiology.ch](http://www.swissmicrobiology.ch) → Medical Microbiology oder direkt von der ersten Seite ganz unten über «Swiss AntibioGram Committee» → access to documentation Einführungsdokumente der Antibiotika-Richtlinien nach EUCAST des Schweizerischen AntibioGramm-Komitees finden. Mitte April wird die Version 2012 aufgeschaltet, in welcher EUCAST 2012 und CLSI 2012 gegenüber gestellt werden.

	Anzahl		Anzahl
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	40	<i>Corynebacterium</i> species	1
<i>Actinomyces meyeri</i>	8	Gram positive Stäbchen	2
<i>Actinomyces pyogenes</i>	1	<i>Streptococcus mitis / oralis</i>	1
<i>Actinomyces israelii</i>	2	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	1
<i>Actinomyces</i> Species	11	keine Angabe	1
<i>Actinomyces viscus</i>	1		

Mit freundlichen Grüßen



Prof. A.v.Graevenitz



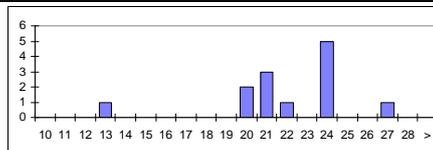
Prof. Dr.R.Zbinden



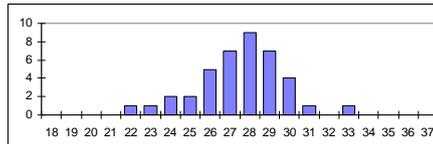
F.S. Hufschmid-Lim

### Resistenzprüfung der Probe A

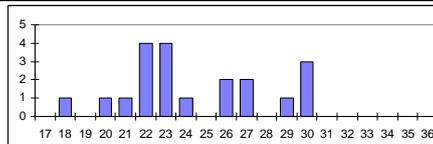
**Amoxicillin +  
Clavulansäure**



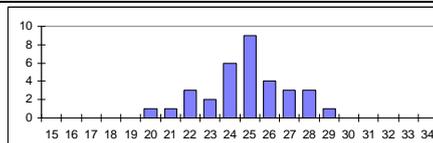
**Cefoxitin**



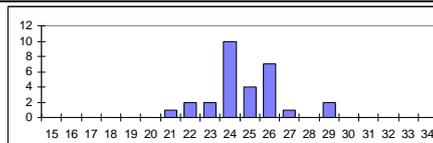
**Ciprofloxacin**



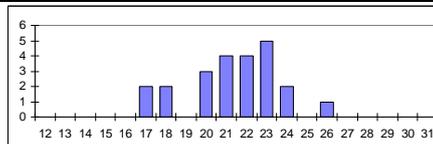
**Clindamycin**



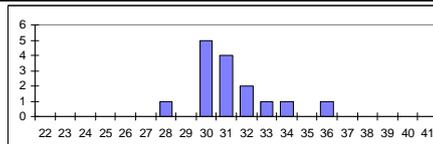
**Erythromycin**



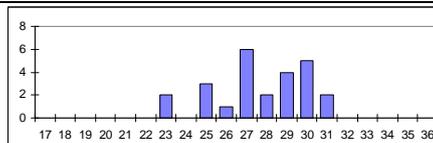
**Gentamicin**



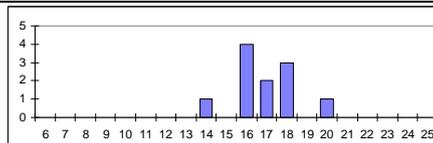
**Rifampicin**



**Sulfamethoxazol /  
Trimethoprim**

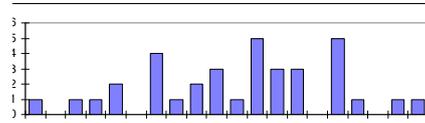


**Vancomycin**

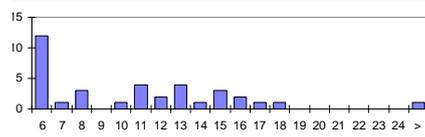


## Resistenzprüfung der Probe B

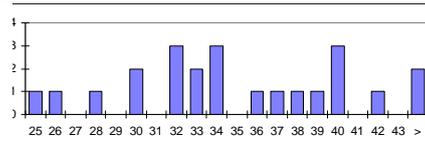
**Amoxicillin +  
Clavulansäure**



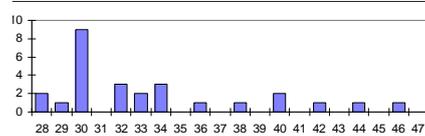
**Ampicillin**



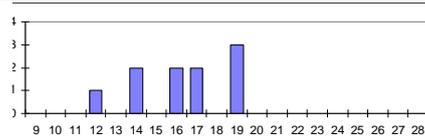
**Ceftriaxon**



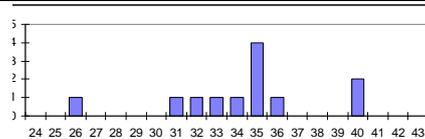
**Ciprofloxacin**



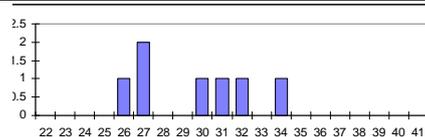
**Erythromycin**



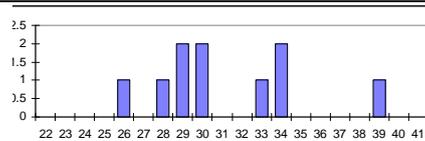
**Levofloxacin**



**Moxifloxacin**



**Ofloxacin**



**Sulfamethoxazol /  
Trimethoprim**

