

Anleitung Cloxacillin-Combined disk test

zum unspezifischen Nachweis von Carbapenemasen bei *Pseudomonas aeruginosa* (nach Fournier *et al.*, J Clin Microbiol. 2013 Nov;51(11):3846-8.)

Der Test dient zur phänotypischen Detektion einer Carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa*, genauer: dem Ausschluss der chromosomal kodierten AmpC-Betalaktamase als Ursache für die Carbapenemresistenz. Den Daten des NRZ zufolge produzieren nur etwa 25-30 % der carbapenemresistenten *P. aeruginosa* eine Carbapenemase, die Durchführung eines solchen Tests wird also dringend empfohlen. Das Prinzip des Tests ist hierbei die Inhibition der AmpC-Betalaktamase durch eine sehr große Menge Cloxacillin und einer damit verbundenen Hemmhofvergrößerung im Agardiffusionstest, wenn das Isolat *keine* Carbapenemase produziert.

Material

- MuellerHinton-Agarplatte
- Cloxacillin-Stammlösung (400 mg/ml)
- 2x Imipenem-Agardiffusionsplättchen (Beschickung 10 mg)
- 1x Blank-Plättchen

Durchführung

- Anlegen eines Agardiffusionstests auf MH-Agar nach EUCAST
- Auflegen von zwei gegenüberliegenden Imipenem-Plättchen und einem Blank-Plättchen
- auf eines der Imipenem-Plättchen und auf das Blank-Plättchen werden 10 µl einer 400 mg/ml Cloxacillin-Stammlösung pipettiert (= 4 mg Cloxacillin)
- Inkubation für 18 h bei 35 ± 2 °C

Auswertung

- Wird am nächsten Tag eine Hemmhofvergrößerung von < 6 mm gemessen, ist dies ein sehr zuverlässiger Hinweis auf das Vorliegen einer Carbapenemase.
- Eine Hemmhofvergrößerung von ≥ 6 mm deutet darauf hin, dass eine überexprimierte AmpC-Betalaktamase maßgeblich für die Carbapenemresistenz des Isolats ist und eine Carbapenemase sehr unwahrscheinlich ist.

Hinweise und Limitationen

- Eine entsprechend konzentrierte Cloxacillin-Stammlösung ist gegenwärtig nicht kommerziell erhältlich und muss im Labor selbst angesetzt werden.
- Es empfiehlt sich, eine Cloxacillin-Stammlösung anzusetzen und diese in Aliquots bei -20 °C zu lagern. Das NRZ konnte bislang keinen negativen Einfluss der Langzeitlagerung auf die Ergebnisse des Tests feststellen.
- Das Blank-Plättchen mit Cloxacillin dient im Rahmen der Qualitätskontrolle des Ausschlusses eines unspezifischen Effekts von Cloxacillin auf das Isolat.
- Als Kontrollstämme eignen sich prinzipiell alle Stämme, bei denen eine Carbapenemase verlässlich bestätigt oder ausgeschlossen wurde.
- Basierend auf den NRZ-Daten mit über 14.700 untersuchten carbapenemresistenten *P. aeruginosa*-Isolaten (Stand: Januar 2025) beträgt die Sensitivität des Tests 96,6 % und die Spezifität 95,6 %.
- Ein Grund für die etwas geringere Spezifität ist, dass der Test nicht so gut funktioniert, wenn IPM bereits ohne Cloxacillin größere Hemmhofdurchmesser zeigt (ab etwa 12-14 mm). Die Hemmhofvergrößerung durch Cloxacillin erreicht dann nicht immer ≥ 6 mm.



Beispiel für ein negatives Testergebnis



Beispiel für ein positives Testergebnis