

DIN 58940-3**DIN**

ICS 07.100.10

Ersatz für
DIN 58940-3:1989-06

**Medizinische Mikrobiologie –
Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen
Chemotherapeutika –
Teil 3: Agar-Diffusionstest;
Text Deutsch und Englisch**

Medical microbiology –
Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents –
Part 3: Agar diffusion test;
Text in German and English

Microbiologie médicale –
Contrôle de la sensibilité des agents pathogènes microbiens aux agents
chimiothérapeutiques –
Partie 3: Test par diffusion en milieu gélosé;
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 43 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Inhalt

Seite

Vorwort	4
Einleitung.....	5
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen.....	5
3 Begriffe	6
4 Labor	6
5 Geräte.....	6
6 Kulturmedien.....	6
6.1 Allgemeines.....	6
6.2 Herstellung der Kulturmedien	7
6.3 Standardmedium Standardmedium für schnellwachsende bakterielle Krankheitserreger	8
6.4 für mikroaerophile bakterielle Krankheitserreger	8
6.5 Kulturmedien für Sprosspilze.....	8
7 Wirkstoffträger (Testblättchen)	8
7.1 Allgemeines.....	8
7.2 Aufbewahrung.....	8
7.3 Anzahl der Wirkstoffträger pro Petrischale	8
7.4 Auswahl von zu testenden Wirkstoffen.....	9
8 Inokulum	9
8.1 Entnahme der Krankheitserreger.....	9
8.2 Herstellung des Inokulums.....	9
8.3 Auftragen des Inokulums.....	10
9 Auflegen der Wirkstoffträger	10
10 Bebrütung (Inkubation)	10
11 Ablesung.....	10
11.1 Hemmhofdurchmesser (HHD)	10
11.2 Sprosspilze.....	11
12 Bewertung (Interpretation) der gemessenen Hemmhofdurchmesser (HHD)	11
13 Qualitätsprüfung	11
13.1 Allgemeines.....	11
13.2 Referenzstämme für interne Qualitätskontrollen	11
13.3 Häufigkeit der Qualitätsprüfungen.....	11
13.4 Kalibrierung des Agar-Diffusionstests.....	11
13.5 Werte außerhalb der Grenzkontrollbereiche.....	12
13.5.1 Offensichtliche Ursachen für Fehler.....	12
13.5.2 Nicht offensichtliche Ursachen für Fehler	12
14 Befundbericht.....	13
14.1 Allgemeines.....	13
14.2 INN-Bezeichnungen	13
14.3 Befundberichte bei Ergebnissen außerhalb der Grenzkontrollbereiche	13
14.4 Fehlinterpretationen	13
Anhang A (informativ) Kulturmedien und Reagenzien.....	14
A.1 Gepufferte, physiologische Kochsalzlösung (PBS).....	14
A.2 Mueller-Hinton-Medium (unsupplementiert; MH)	14

	Seite
A.2.1 Zusammensetzung	14
A.2.2 Herstellung und Sterilisation	14
A.3 McFarland-Standard 0,5.....	14
A.4 Sprosspilz-Testmedien	15
A.4.1 YST (Yeast Susceptibility Test) Agar (Modifiziertes HR Medium).....	15
A.4.2 Supplementiertes Mueller-Hinton-Medium für Sprosspilze [12] (nur für Agar-Diffusionstest mit Azolen geeignet)	17
Anhang B (informativ) Kontrollstämme	18
Anhang C (informativ) Grenzkontrollbereiche	20
Literaturhinweise	21

Vorwort

Diese Norm wurde vom NA 063-05-10 AA „Chemotherapeutische Untersuchungsmethoden“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. in Zusammenarbeit mit der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. (PEG) und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) erarbeitet.

DIN 58940 *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika* besteht aus (Beiblätter werden nicht aufgeführt):

- Teil 1: *Begriffe*
- Teil 2: *Wirkstoffträger für den Agar-Diffusionstest*
- Teil 3: *Agar-Diffusionstest*
- Teil 4: *Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration*
- Teil 6: *Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nach der Agar-Dilutionsmethode*
- Teil 7: *Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) mit der Mikrodilution*
- Teil 8: *Mikrodilution — Allgemeine methodenspezifische Anforderungen*
- Teil 9: *Regressionsanalyse zur Korrelation von Hemmhofdurchmesser (HHD) und minimaler Hemmkonzentration (MHK)*
- Teil 10: *Kriterien für die Bewertung der In-vitro-Wirksamkeit neuer Chemotherapeutika*
- Teil 20: *Codierung von antimikrobiellen Wirkstoffen*
- Teil 31: *Ergänzende Verfahren bei der Empfindlichkeitsprüfung*
- Teil 81: *Mikrodilution — Spezielle Anforderungen an die Testung von nicht anspruchsvollen Bakterien*
- Teil 82: *Mikrodilution — Spezielle Anforderungen an die Testung von anspruchsvollen Bakterien*
- Teil 83: *Mikrodilution — Spezielle Anforderungen an die Testung von obligat anaeroben Bakterien*
- Teil 84: *Mikrodilution — Spezielle Anforderungen an die Testung von Pilzen gegen Antimykotika*

Änderungen

Gegenüber DIN 58940-3:1989-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) redaktionelle Überarbeitung und Anpassung an den neuesten wissenschaftlichen Stand;
- b) Erweiterung des Anwendungsbereichs der Norm auf mikrobielle Krankheitserreger;
- c) Berücksichtigung von anspruchsvollen bakteriellen Krankheitserregern und Sprosspilzen.

Frühere Ausgaben

DIN 58940-3: 1981-05, 1989-06

Einleitung

Der Agar-Diffusionstest ist eine der Möglichkeiten, den Effekt eines antimikrobiellen Wirkstoffes (Therapeutikum) auf einen vorgegebenen Krankheitserreger im Voraus annähernd zu bestimmen. Der Test erlaubt nur eine qualitative Aussage, da die Reaktion eines Krankheitserregers in diesem Test, im Analogschluss zur minimalen Hemmkonzentration (MHK), als eine der drei Kategorien: sensibel, intermediär oder resistent bewertet wird.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für die Empfindlichkeitsprüfung mikrobieller Krankheitserreger mit dem Agar-Diffusionstest. Die Erstellung der Antibiotogramme ist anwendbar für *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. sowie sonstige schnellwachsende Gram-positive und Gram-negative Krankheitserreger.

Aufgrund fehlender Daten zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gilt diese Norm in der vorliegenden Form nicht für anspruchsvolle Krankheitserreger wie z. B. *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., Pneumokokken und andere Streptokokken sowie für anaerob wachsende Krankheitserreger.

Die Methodik und die Materialien für die Testung von Sprosspilzen entsprechen im Wesentlichen denen beim Test für bakterielle Krankheitserreger und sind daher für die Empfindlichkeitsprüfung von Azolen und Flucytosin sinngemäß anwendbar [1], [2], [3], [4], [5], [6], [10].

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

DIN 12880, *Elektrische Laborgeräte — Wärme- und Brutschränke*

DIN 58940-1, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 1: Begriffe*

DIN 58940-2, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 2: Wirkstoffträger für den Agar-Diffusionstest*

DIN 58940-4, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 4: Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration*

DIN 58940-9, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 9: Regressionsanalyse zur Korrelation von Hemmhofdurchmesser (HHD) und minimaler Hemmkonzentration (MHK)*

DIN 58940-20, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 20: Codierung von antibakteriellen Wirkstoffen*

E DIN 58959-1, *Medizinische Mikrobiologie — Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 1: Anforderungen an das QM-System*

DIN 58959-9, *Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 9: Anforderungen an den Einsatz von Kontrollstämmen zur Prüfung von Kulturmedien*

DIN 58959-14:1997-06, *Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 14: Anforderungen an den Einsatz von Kontrollstämmen bei der Empfindlichkeitsprüfung von aeroben Bakterien*

DIN EN 12128, *Biotechnik — Laboratorien für Forschung, Entwicklung und Analyse — Sicherheitsstufen mikrobiologischer Laboratorien, Gefahrenbereich, Räumlichkeiten und technische Sicherheitsanforderungen*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach DIN 58940-1.

4 Labor

Die Untersuchung ist in einem medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium durchzuführen, das mindestens DIN EN 12128, Typ S 2, entspricht.

5 Geräte

Die zur Aufnahme des Kulturmediums dienenden Petrischalen sollten

- belüftbar sein;
- einen planen Boden aufweisen;
- aus klarem Kunststoff oder aus Glas (siehe DIN 12339) bestehen.

Nennmaße für Kunststoffschalen:

- rund, Durchmesser 90 mm bis 100 mm oder 140 mm bis 150 mm
- viereckig, 120 mm × 120 mm oder 210 mm × 210 mm

Inkubator nach DIN 12880.

6 Kulturmedien

6.1 Allgemeines

Andere Kulturmedien als die in den folgenden Abschnitten bzw. im Anhang angegeben, insbesondere bei der Testung von Sprosspilzen, kommen für Routineuntersuchungen ebenfalls in Frage. Für alle eingesetzten Kulturmedien müssen jedoch die Beziehungen zwischen minimaler Hemmkonzentration (MHK) und Hemmhofdurchmesser (HHD) bekannt sein bzw., wenn diese nicht vorhanden sind, müssen diese individuell für das Labor festgelegt und entsprechende Tabellen zur Bewertung der Hemmhofdurchmesser (HHD) und für Grenzkontrollbereiche für Kontrollstämmen erstellt werden. Dies gilt auch für zu testende Chemotherapeutika, die nicht in dieser Norm aufgeführt oder berücksichtigt werden oder für die kein Referenzwirkstoff als stellvertretende Testsubstanz zu Verfügung steht. Hierzu sind die entsprechenden Bewertungen für die

Testsubstanzen und die Grenzkontrollbereiche für die Kontrollstämme zu ermitteln und schriftlich festzulegen (siehe auch DIN 58940-9, DIN 58959-16 und DIN 58959-17).

Isolate, die auf dem nicht-supplementierten Referenzmedium kein, ein nicht ausreichendes oder ein verzögertes Wachstum zeigen, dürfen auf diesen Medien nicht getestet, bzw. die entsprechenden Daten und Bewertungen müssen für diese Medien entsprechend ermittelt und festgelegt werden.

6.2 Herstellung der Kulturmedien

Da das Kulturmedium und dessen Präparation einen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis besitzen, ist bei der Herstellung und Kontrolle Folgendes zu beachten:

- a) Das Kulturmedium sollte, wenn immer möglich, aus kommerziell erhältlichen Trockenmedien oder Halbfertigmedien nach DIN EN 1659 entsprechend den Angaben des Lieferanten hergestellt werden. Fertigmedien für den sofortigen Gebrauch können ebenfalls verwendet werden, wenn entsprechende Qualitätszertifikate zur Verfügung stehen.
- b) Das Medium ist entsprechend dem Typ des Kulturmediums mittels geeigneter Methoden zu sterilisieren.
- c) Erfolgt die Sterilisation durch Autoklavieren, muss das Medium unmittelbar nach Entnahme aus dem Sterilisator auf 45 °C bis 50 °C abgekühlt und bis zur Abfüllung in Petrischalen auf dieser Temperatur gehalten werden.
- d) Die Abfüllung muss mit einer Pipette oder vorzugsweise mit einem Dispensiergerät vorgenommen werden, das eine einheitliche und reproduzierbare Volumenabgabe ($\pm 0,2\%$) ermöglicht.
- e) Die Schichtdicke des festen Kulturmediums im Testbehälter muss überall mindestens 3 mm und maximal 4 mm betragen. Bei längeren Inkubationszeiten (Sprossspilze mit einer Bebrütungsdauer von mehr als 24 h) wird eine Schichtdicke von 4 mm empfohlen.

ANMERKUNG 1 Bei Petrischalen mit einem Innendurchmesser (Nennmaß) von 90 mm und einem Volumen des Kulturmediums von 20 ml bzw. bei Petrischalen mit einem Innendurchmesser (Nennmaß) von 140 mm und einem Volumen des Kulturmediums von 48 ml wird eine Schichtdicke von etwa 3,1 mm erzielt; bei 25 ml bzw. 61 ml eine Schichtdicke von etwa 3,9 mm (für quadratische Platten mit 120 mm × 120 mm wird mit 45 ml Kulturmedium eine Schichtdicke von 3,1 mm und mit 57 ml eine Schichtdicke von 3,9 mm erreicht).

- Für alle Medien zur Testung von Bakterien muss der pH-Wert bei Raumtemperatur zwischen 7,2 und 7,4, für Medien zur Testung von Sprossspilzen zwischen 6,8 und 7,2 liegen.

ANMERKUNG 2 Ist der pH-Wert zu niedrig, können verschieden Chemotherapeutika an Aktivität verlieren (z. B. Aminoglykoside, Chinolone, Makrolide und Azole), während andere Wirkstoffe höhere Aktivitäten aufweisen können (z. B. Tetracycline). Ist der pH-Wert zu hoch, können gegenteilige Effekte die Folge sein.

- Neue Kulturmediumchargen müssen nach DIN 58959-14:1997-06, 5.3.4.4, auf den Kationengehalt geprüft werden.

ANMERKUNG 3 Variationen im Kationengehalt, hauptsächlich von Calcium und Magnesium, beeinflussen die Testung von *Pseudomonas aeruginosa* mit Aminoglykosiden und Tetracyclinen. Zu hoher Kationengehalt verkleinert die Hemmhöfe. Ein erhöhter Zinkionengehalt verkleinert die Hemmhöfe mit Carbapenemen. In der Regel sind die Mueller-Hinton Chargen mit einem ausgewogenen Gehalt an diesen Substanzen versehen.

- Neue Kulturmedienchargen müssen nach DIN 58959-14:1997-06, 5.3.4.3, auf den Thymin/Thymidin-Gehalt geprüft werden. Kulturmedien, die überschüssige Anteile an Thymin und Thymidin besitzen, können den inhibitorischen Effekt von Sulfonamiden und Trimethoprim beeinträchtigen, wobei sich verkleinerte oder gar keine Hemmhöfe und Wachstum von Kolonien innerhalb der Hemmhöfe ergeben. Es muss daher ein Mueller-Hinton-Medium verwendet werden, das einen möglichst geringen Thymin/Thymidingehalt ergibt.

- Das abgefüllte Medium muss auf einer waagerechten Fläche auskühlen, bis das Medium sich verfestigt hat.
- Auf den Medienbehältern sind Herstellungsdatum (oder Verfalldatum) und Art des Mediums eindeutig und dauerhaft anzugeben.
- Die Medien müssen vor Austrocknung geschützt und bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden.
- Vom Hersteller angegebene Verbrauchszeiten müssen eingehalten werden.
- Die Oberfläche der Kulturmedien muss feucht erscheinen; jedoch darf auf der Oberfläche der Kulturmedien keine überschüssige Feuchtigkeit erkennbar sein. Falls vor Gebrauch auf der Oberfläche der Kulturmedien Feuchtigkeitstropfen zu erkennen sind, müssen die Platten vorgetrocknet werden. Dies kann erreicht werden durch Trocknung der geöffneten Platten im unidirektionalen Luftstrom (LF, Laminar Flow) für 10 min bis 15 min oder im Inkubator für 10 min bis 30 min bei $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
- Eine repräsentative Anzahl, mindestens jedoch vier Platten jeder selbst hergestellten Charge, sollte auf Sterilität geprüft werden (Inkubation bei 36 °C für 48 h).

6.3 Standardmedium für schnellwachsende bakterielle Krankheitserreger

Als geeignetes Referenzmedium für bakterielle Krankheitserreger dient Mueller-Hinton Agar.

6.4 Standardmedium für mikroaerophile bakterielle Krankheitserreger

Als geeignetes Referenzmedium für mikroaerophile bakterielle Krankheitserreger der Gattungen *Helicobacter*, *Campylobacter* und *Arcobacter* wird Isosensitest Agar (mit 7 % defibriniertem Pferdeblut) empfohlen.

6.5 Kulturmedien für Sprosspilze

Als geeignetes Kulturmedium wird YST Agar [3], siehe Anhang A, empfohlen.

ANMERKUNG Modifizierter Mueller-Hinton Agar ist nur geeignet für die Testung von Azolen [4]. Modifizierter Yeast-Nitrogen Base Agar sowie YST Agar sind geeignet für die Empfindlichkeitsprüfung von Azolen und Flucytosin [9].

7 Wirkstoffträger (Testblättchen)

7.1 Allgemeines

Für den Agar-Diffusionstest sind Wirkstoffträger nach DIN 58940-2 zu verwenden, die nach DIN 58940-20 und DIN 58940-20 Beiblatt 1 codiert sind.

7.2 Aufbewahrung

Die Wirkstoffträger sind kühl (2 °C bis 8 °C) und trocken (unter Verwendung von Trockenmittel) oder nach Angaben des Herstellers aufzubewahren. Gleiches gilt für Dispenser mit mehreren Kartuschen. Die Wirkstoffträger dürfen erst aus den Behältnissen, die das Trocknungsmittel enthalten, entnommen werden, nachdem diese auf Raumtemperatur gebracht wurden (Minimierung der Kondensatbildung).

7.3 Anzahl der Wirkstoffträger pro Petrischale

Die Wirkstoffträger müssen so angeordnet werden, dass überschneidungsfreie Hemmhöfe entstehen. Je 90-mm- bis 100-mm-Petrischale dürfen maximal sechs, je 140-mm- bis 150-mm-Petrischale maximal 12 Wirkstoffträger aufgebracht werden. Bei Wirkstoffen, die große Hemmhöfe ergeben, dürfen auf eine

90-mm- bis 100-mm-Petrischale maximal vier und auf eine 120-mm- bis 150-mm-Petrischale maximal acht Testblättchen aufgebracht werden.

7.4 Auswahl von zu testenden Wirkstoffen

Die Auswahl der zu testenden Wirkstoffe sollte entsprechend der Herkunft des Untersuchungsgutes, der Art der Infektion, der zu erwartenden Krankheitserregerspezies und der geeigneten Wirkstoffe aus der jeweiligen Wirkstoffgruppe mit bekannter Effektivität und In-vitro-Wirkung für jede Krankheitserregergruppe getroffen werden.

Die Anzahl der getesteten Wirkstoffe kann unter Berücksichtigung der Fragestellung und der Wirtschaftlichkeit begrenzt werden (Testsubstanzen siehe DIN 58940-2 Beiblatt 2).

ANMERKUNG Die Festlegung einer Testsubstanz als Repräsentant einer Wirkstoffgruppe ist bei den Antimykotika gegenwärtig nicht sinnvoll.

8 Inokulum

8.1 Entnahme der Krankheitserreger

Zur Testung dürfen keine Mischkulturen verwendet werden.

8.2 Herstellung des Inokulums

Das Inokulum muss aus einer frischen Reinkultur (Vorkultur) hergestellt werden und kann einer festen oder flüssigen Vorkultur entstammen.

Bei fester Vorkultur wird das Inokulum:

- a) durch Abnahme und Suspendieren einer geeigneten Anzahl von Kolonien in 2 ml bis 5 ml gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung (PBS; siehe A.1) oder Kulturmedium oder

ANMERKUNG 1 Zur Sicherung einer repräsentativen Auswahl sollten Krankheitserreger von möglichst vier bis fünf morphologisch gleichartigen Kolonien der Reinkultur zur Herstellung des Inokulums von der Agaroberfläche abgenommen werden.

- b) durch Abschwemmen und Suspendieren der Kolonien hergestellt.

Das aufzubringende Inokulum muss eine Keimdichte von 1×10^6 KBE/ml bis 5×10^6 KBE/ml aufweisen.

Bei Sprosspilzen ist das Inokulum aus einer frischen Vorkultur auf Sabouraud-2%-Glucose-Medium herzustellen. Fünf bis zehn Kolonien einer frischen Kultur sind in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung zu suspendieren. Die Suspension ist (mit Kulturmedium) so einzustellen, dass eine Zellzahl von 1×10^5 bis 4×10^5 Sprosspilzzellen je 1 ml erreicht wird.

Das Inokulum muss so beschaffen sein, dass es nach der Aussaat und der Bebrütung des Kulturmediums zu dicht stehenden Kolonien, jedoch noch nicht zu konfluierendem Wachstum kommt.

Das Inokulum wird visuell (bei entsprechender Beleuchtung vor einem weißen Hintergrund mit schwarzen Kontrastlinien) oder mittels Foto- bzw. Nephelometer mit dem 0,5-McFarland-Standard verglichen. Wegen der raschen Sedimentation der Bariumsulfat-Partikel ist hierbei darauf zu achten, dass der Standard vorher gut durchmischt und anschließend sofort gemessen wird.

ANMERKUNG 2 Diese Mikroorganismensuspension entspricht $\approx 10^8$ Bakterien/ml bzw. 5×10^6 bis 5×10^7 Sprosspilzzellen/ml. Das heißt, das eingestellte Inokulum ist bei Gram-positiven Krankheitserregern und Sprosspilzen 1:100 und bei *Enterobacteriaceae* 1:1 000 zu verdünnen.

Zwischen der Herstellung des Inokulums und der Beimpfung der Behältnisse dürfen nicht mehr als 30 min, bei anspruchsvollen Erregern nicht mehr als 15 min vergehen.

Für die Evaluierung neuer Wirkstoffe sowie in bestimmten Fällen (z. B. Kontrolle des Inokulums) ist es notwendig, die genaue Koloniezahl des Inokulums mittels Oberflächenkultur zu bestimmen.

8.3 Auftragen des Inokulums

Das Inokulum wird mit einem sterilen Baumwolltupfer oder einem Drigalski-Spatel gleichmäßig auf der Mediumoberfläche verteilt, indem in mindestens drei verschiedenen Richtungen überkreuzend ausgestrichen wird. Alternativ kann eine automatische Aufbringung des Inokulums erfolgen, die eine homogene Verteilung auf der Plattenoberfläche gewährleistet (z. B. Spiralplattentechnik, homogener Modus).

Es ist sicherzustellen, dass vor Aufbringen der Testblättchen das Inokulum 5 min bis 15 min in das Kulturmedium einziehen kann. Die Zeitspanne darf aber nicht 30 min überschreiten.

9 Auflegen der Wirkstoffträger

Nach Aufbringen und Antrocknung des Inokulums auf die Kulturmedien werden die Wirkstoffträger mit sterilen Pinzetten oder mit Auftragegeräten (z. B. Dispensern) auf die beimpfte Agaroberfläche aufgebracht und leicht angedrückt, ohne das Testblättchen in die Agaroberfläche einzudrücken.

Grundsätzlich muss (auch bei Verwendung von Dispensern) der Abstand der Wirkstoffträger untereinander und vom Rand der Petrischale so bemessen sein, dass kreisförmige Hemmhöfe ohne Überschneidung entstehen können.

10 Bebrütung (Inkubation)

Innerhalb von 30 min nach Auflegen der Wirkstoffträger müssen die Petrischalen in einen Inkubator gestellt werden. Es müssen gleichmäßige Inkubationsbedingungen für alle Platten sichergestellt sein.

Wenn unten nicht anders angegeben, erfolgt die Bebrütung für (18 ± 2) h bei (36 ± 1) °C.

Die Bebrütung von Sprosspilzen erfolgt für (22 ± 2) h bei (36 ± 1) °C. Bei langsam wachsenden Sprosspilzen wie z. B. *Candida glabrata* und *Cryptococcus neoformans* erfolgt die Bebrütung bis ausreichendes Koloniewachstum beziehungsweise Ausbildung von Hemmhöfen erfolgt ist, in der Regel für 44 h bis 72 h bei (36 ± 1) °C.

11 Ablesung

11.1 Hemmhofdurchmesser (HHD)

Die Durchmesser der entstandenen Hemmhöfe werden jeweils nach den in Abschnitt 10 angegebenen Inkubationszeiten gemessen und auf 1 mm angegeben. Als Grenzen dienen die Ränder des deutlich in der Koloniegroße reduzierten Wachstums.

Bei mehr als drei Einzelkolonien innerhalb eines Hemmhofes muss die Reinheit der Ausgangskultur geprüft werden. Wenn es sich nicht um eine Verunreinigung handelt, besteht Verdacht auf resistente Varianten, und der getestete Krankheitserreger muss als resistent bezeichnet werden.

Schwärmende Proteus-Arten können einen Bakterienfilm im Hemmhof bilden. Dieses Überwachsen des Hemmhofs ist zu ignorieren, und der entstandene Hemmhof ist zur Interpretation der Empfindlichkeit des Stammes heranzuziehen.

War die Einsaatdichte zu hoch, ergibt sich konfluierendes Wachstum (zusammenhängender Zellrasen durch ineinander fließende Kolonien) auf der Agaroberfläche. Falls das Ergebnis intermediär oder resistent lautet, muss der Test mit einem geringeren Inokulum wiederholt werden.

11.2 Sprosspilze

Die Ablesung muss nach 18 h bis 24 h erfolgen. Eine Ablesung nach 48 h oder in speziellen Fällen (z. B. *Cryptococcus* spp.) nach 72 h sollte nur dann erfolgen, wenn innerhalb von 24 h kein ausreichendes Koloniewachstum zu verzeichnen ist.

ANMERKUNG Bei manchen Sprosspilzen kann trotz gegebener Empfindlichkeit gegen ein Antimykotikum geringfügiges Wachstum z. B. in Form von Mikrokolonien oder von Hauchbildung zu verzeichnen sein.

12 Bewertung (Interpretation) der gemessenen Hemmhofdurchmesser (HHD)

Die gemessenen Hemmhofdurchmesser (HHD) werden mit Hilfe der Grenzwerte nach DIN 58940-3 Beiblatt 1 den Bewertungsstufen „sensibel (S)“, „intermediär (I)“ und „resistent (R)“ nach DIN 58940-4 zugeordnet. Die Festlegung der Bewertungsstufen erfolgt nach DIN 58940-9.

13 Qualitätsprüfung

13.1 Allgemeines

Die Qualitätsprüfung von Kulturmedien erfolgt nach DIN 58959-9 bzw. E DIN 58959-1. Außerdem gelten die Anforderungen nach 13.2. Zusätzlich gelten DIN 58959-14, DIN 58959-14 Beiblatt 1, DIN 58959-16 und DIN EN 12322.

13.2 Referenzstämme für interne Qualitätskontrollen

Bei jedem Testansatz bzw. jeder Testserie müssen bei der Testung von bakteriellen Krankheitserregern mindestens zwei, bei Erregern von Mykosen mindestens drei Kontrollstämme aus den in Anhang B aufgeführten Kontrollstämmen mitgeführt werden.

13.3 Häufigkeit der Qualitätsprüfungen

Die Qualitätsprüfung mit Kontrollstämmen erfolgt an jedem Tag, an dem Empfindlichkeitsprüfungen durchgeführt werden. Bei täglicher Durchführung von Empfindlichkeitsprüfungen kann auf eine wöchentliche Qualitätsprüfung mit Kontrollstämmen übergegangen werden, wenn mindestens 30 konsekutive Testungen der Kontrollstämme Ergebnisse innerhalb der Grenzkontrollbereiche nach Tabelle C.1 oder Tabelle C.2 aufweisen.

13.4 Kalibrierung des Agar-Diffusionstests

Aufgrund der Dynamik und Fortentwicklung der Mikroorganismenpopulationen sind die vorgegebenen Grenzwerte keine statischen Werte. Sie sollten daher in regelmäßigen Abständen geprüft und angepasst werden. Dies gilt insbesondere für Laboratorien, die spezielle Mikroorganismenarten bevorzugt untersuchen. Eine Kalibrierung des Agar-Diffusionstests sollte daher regelmäßig durchgeführt werden. Als eine geeignete Methode hat sich die Spezies-bezogene Regressionsanalyse (SRA = Single Species Regression Analysis) erwiesen. Hierbei werden für jede Spezies die MHK-Grenzwerte, unter Verwendung der berechneten SRA-Konstanten aus der Regressionsgleichung in Hemmhofwerte transferiert und die Ergebnisse gegenübergestellt. Bei Abweichungen müssen die Hemmhof-Grenzwerte angepasst oder, wenn nicht möglich, für verschiedene Spezies unterschiedliche Grenzwerte erstellt werden.

13.5 Werte außerhalb der Grenzkontrollbereiche

13.5.1 Offensichtliche Ursachen für Fehler

- Verwechslung von Testblättchen;
- Verwendung von Testblättchen nach deren Verfalldatum;
- Verwendung nicht geeigneter Kontrollstämme;
- Testung von Mischkulturen;
- Verwendung von Kulturmedien mit pH-Werten außerhalb des zulässigen Bereichs;
- falsches Inokulum;
- Inkubation bei falscher Inkubationstemperatur oder unter ungeeigneten Wachstumsbedingungen.

Der festgestellte Fehler ist zu dokumentieren und der Test an dem Tag, an dem der Fehler festgestellt wurde, zu wiederholen. Liegt das Ergebnis der Testwiederholung im Kontrollbereich, sind keine weiteren Maßnahmen erforderlich.

13.5.2 Nicht offensichtliche Ursachen für Fehler

Wurde kein offensichtlicher Grund für die fehlerhaften Ergebnisse gefunden, muss eine Fehleranalyse durchgeführt werden, der sich sofortige Korrekturmaßnahmen anschließen. Es muss auf eine konsekutive (tägliche) Mitführung der Kontrollstämme übergegangen werden. Liegen die Ergebnisse von fünf konsekutiven Testungen innerhalb der festgelegten Grenzkontrollbereiche, sind keine weiteren Korrekturmaßnahmen erforderlich.

Liegt einer der Hemmhofdurchmesser der fünf Testungen außerhalb des Kontrollbereichs, muss das konsekutive (tägliche) Mitführen der Kontrollstämme so lange beibehalten werden, bis die Fehlerquelle gefunden wird. Hierbei sollte insbesondere überprüft werden:

- akkurate Messung der Hemmhöfe und Übertragung/Bewertung;
- Kalibrierung automatischer Ablesesysteme;
- Trübungsstandard nicht über dem Verfalldatum und ordnungsgemäß gelagert;
- Trübungsstandard jeweils vor Gebrauch ausreichend homogenisiert;
- alle verwendeten Materialien und Kulturmedien innerhalb des Verfalldatums und ordnungsgemäß gelagert;
- Inkubationstemperatur und Wachstumsbedingungen;
- Pipettiersysteme auf Funktionstüchtigkeit geprüft und kalibriert;
- Testblättchen entsprechend Vorschrift und unter Trockenmittel gelagert;
- Inokulum nach Vorschrift hergestellt und verdünnt;
- Verdünnung richtig;
- Kontrollstamm nicht verändert oder kontaminiert;
- neuer Kontrollstamm von der Referenzkultur.

Wurde der/die ermittelten Fehler beseitigt, kann nach 30 konsekutiven Tests mit Werten innerhalb des Grenzkontrollbereiches wieder auf ein wöchentliches Mitführen der Kontrollstämmen (bei täglicher Testung) übergegangen werden.

14 Befundbericht

14.1 Allgemeines

Der Befundbericht sollte DIN 58959-3 entsprechen.

14.2 INN-Bezeichnungen

Um Konfusionen bei der Namensgebung und Verwechslung von Chemotherapeutika mit verschiedenen Handelsnamen zu vermeiden, sollten nur die Freinamen (INN: International Nonproprietary Name) im Labor und in den Befundberichten verwendet werden.

14.3 Befundberichte bei Ergebnissen außerhalb der Grenzkontrollbereiche

Bewertungen von Hemmhöfen, bei denen die Ergebnisse der Kontrollstämmen außerhalb der zulässigen Grenzkontrollwerte liegen, dürfen nicht durchgeführt und berichtet werden.

14.4 Fehlinterpretationen

Aufgrund der Grenzen des Agar-Diffusionstestes kann es zu Fehlinterpretationen kommen. Dies schließt die nachfolgend aufgeführten Chemotherapeutika-Mikroorganismen-Kombinationen ein, beschränkt sich jedoch nicht auf die aufgeführten Kombinationen:

- 3-Lactam-Antibiotika bei Methicillin/Oxacillin-resistenten Staphylokokken
- Cephalosporine, Aminoglykoside (außer bei der Testung auf hochgradige Resistenz), Clindamycin und Trimethoprim + Sulfamethoxazol bei Enterokokken
- Cephalosporine bei ESBL-bildenden Stämmen
- Erst- und Zweit-Generations-Cephalosporine und Aminoglykoside bei *Salmonella* spp. und *Shigella* spp.

Auf ergänzende Tests in DIN 58940-31 wird hingewiesen.