

Medizinische Mikrobiologie
**Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krank-
 heitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika**
 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration
 nach der Bouillon-Dilutionsmethode (Makrodilution)

DIN
58 940
 Teil 5

Medical microbiology; methods for the determination of susceptibility
 of pathogens (except mycobacteria) to antimicrobial agents;
 determination of MICs by broth dilution method (macrodilution)

Ersatz für Ausgabe 08.79

Die in dieser Norm beschriebene Methode wird von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) als Referenzmethode empfohlen und dient auch zur Ermittlung der Referenzwerte bei Ringversuchen.

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm gilt für die Empfindlichkeitsprüfung aerober bakterieller Krankheitserreger (außer Mykobakterien) mit der Bouillon-Dilutionsmethode im Röhrchen. Die Bouillon-Dilutionsmethode im Röhrchen wird nach DIN 58 940 Teil 1 als Makrodilution bezeichnet. Sie gilt als Referenzmethode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK). Die Untersuchung ist in einem medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium durchzuführen, das mindestens Typ 2 nach DIN 58 956 Teil 1 entsprechen muß.

Durch Anwendung der in dieser Norm enthaltenen Festlegungen soll sichergestellt werden, daß die Ergebnisse der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration als Referenzmethodenwerte richtig und damit von Laboratorium zu Laboratorium vergleichbar, d. h. wiederholbar und reproduzierbar sind, [1].

Die Krankheitserreger werden nachfolgend Erreger genannt.

2 Begriffe

Nach DIN 58 940 Teil 1

Referenzmethode nach DIN 58 936 Teil 1

3 Bezeichnung

Bezeichnung der Empfindlichkeitsprüfung von aeroben bakteriellen Erregern gegen Chemotherapeutika nach der Bouillon-Dilutionsmethode im Röhrchen (BD):

Bouillon-Methode DIN 58 940 – BD

4 Geräte

- Reagenzglas, etwa 16 mm × 100 mm, mit glattem Rand (z. B. Versandgefäß nach DIN 55 515 Teil 2 und Zentrifugenröhrchen nach DIN 58 970 Teil 2, sterilisiert),
- Watte für medizinische Zwecke nach DIN 61 640 oder Kappen bzw. Steristopfen (zum Verschließen der Reagenzgläser)
- Auslaufpipette nach DIN 12 696 oder DIN 12 697, sterilisiert, oder Mikroliterpipette
- Bürette nach DIN 12 700 Teil 1, Meßkolben, sterilisiert, oder andere geeignete Dosiereinrichtungen

5 Kulturmedien oder Verdünnungsmittel

- Mueller-Hinton-Bouillon¹⁾
- Sterilisierte Verdünnungsflüssigkeiten¹⁾ (z. B. deionisiertes, entmineralisiertes Wasser, destilliertes Wasser, Phosphat-Pufferlösung, 0,9 % NaCl-Lösung)

6 Kontrollstämme

Bei jedem Testansatz sollen als Kontrollstämme die nach der Tabelle 1 angegebenen Stämme mitgeführt werden:

Tabelle 1.

Kontrollstamm	
Spezies	Stammsammlungsnummer ¹⁾
Staphylococcus aureus	ATCC 25923 ≙ DSM 1104
Staphylococcus aureus	ATCC 29213 ≙ DSM 2569
Enterococcus faecalis	ATCC 29212 ≙ DSM 2570
Escherichia coli	ATCC 25922 ≙ DSM 1103
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853 ≙ DSM 1117
1) Siehe Erläuterungen	

Die minimalen Hemmkonzentrationen der verschiedenen Testsubstanzen bei den Kontrollstämmen sind im Beiblatt 1 zu DIN 58 940 Teil 5 angegeben.

Anmerkung: Eine Norm über das Mitführen von Kontrollstämmen bei der Empfindlichkeitsprüfung von Krankheitserregern ist in Vorbereitung.

¹⁾ Über die Bezugsquelle gibt Auskunft:
 Normenausschuß Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Burggrafenstraße 6,
 1000 Berlin 30

Fortsetzung Seite 2 bis 4

7 Wirkstoff für die Stammlösung

Der Wirkstoff für die Stammlösung muß als Reinsubstanz oder Standardsubstanz direkt vom Hersteller bezogen werden. Fertigarzneimittel dürfen nicht verwendet werden. Die Aktivität des Wirkstoffes ist in μg (oder in Einheiten) je ml^2 anzugeben.

Die Stammlösung wird entsprechend der vom Hersteller angegebenen Aktivität stets frisch hergestellt, im Lösungsmittel gelöst, zu mehreren gleichen Teilen nach Bedarf aufgeteilt und bei der vorgegebenen Temperatur in verschlossenen Behältnissen aufbewahrt, sofern die Stabilität dies zuläßt.

Beispiel: Aktivität $818 \mu\text{g}/\text{mg} \rightarrow 1,22 \text{ mg}$ um einen Gehalt von $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Wirksubstanz zu erreichen.

8 Durchführung

8.1 Pipettierung

Beim Pipettieren von der höheren zur niedrigeren Konzentration ist jeweils eine neue Pipettenspitze zu verwenden. Beim Pipettieren von der niedrigeren zur höheren Konzentration darf dieselbe Pipettenspitze verwendet werden. Die Flüssigkeit ist so in die Mitte des Röhrchens zu pipettieren, daß sie nicht an der Innenwand des Röhrchens hinablaufen kann.

8.2 Stammlösung

Der Wirkstoffgehalt der Stammlösung ist nach Tabelle 3 oder Tabelle 4 einzustellen. In destilliertem Wasser unlösliche Substanzen müssen mit Lösungsvermittler oder durch Einstellung auf einen geeigneten pH-Wert vorbereitet werden. Falls erforderlich, ist die Stammlösung durch Membranfilter (mit einer Porenweite von $0,2 \mu\text{m}$) zu filtrieren.

8.3 Verdünnungsreihe

Die Verdünnungsreihe besteht aus Verdünnungsschritten, wobei die Konzentration des Wirkstoffs bei der nachfolgenden Stufe jeweils auf die Hälfte reduziert wird. Die Endkonzentration der einzelnen Stufen entspricht den Werten der Exponentialreihe mit ganzen Exponenten für die Grundzahl, siehe Tabelle 2. Die Verdünnungen erfolgen mit Bouillon.

Tabelle 2.

Stufe	$\text{lb} \left(\frac{\beta_{\text{Fin}}}{\mu\text{g}/\text{ml}} \right)^*)$	Endkonzentration β_{Fin} $\mu\text{g}/\text{ml}$
1	8	256
2	7	128
3	6	64
4	5	32
5	4	16
6	3	8
7	2	4
8	1	2
9	0	1
10	- 1	0,5
11	- 2	0,25
12	- 3	0,125
*) lb ist nach DIN 1302 der binäre Logarithmus $\text{lb} x = \log_2 x$		

Zur Korrelation von MHK-Werten und Hemmhofdurchmessern (Regressionsanalysen siehe DIN 58 940 Teil 9*)

$$\text{ist} \left[\text{lb} \left(\frac{\beta_{\text{Fin}}}{\mu\text{g}/\text{ml}} \right) 2 \right] + 9 \text{ zu nehmen.}$$

8.4 Vorgehen bei geringer Anzahl zu untersuchender Stämme

Aus 2 ml einer Stammlösung mit einer Wirkstoffkonzentration von $2000 \mu\text{g}/\text{ml}$ wird durch Zugabe von $13,62 \text{ ml}$ Bouillon eine Ausgangsverdünnung erreicht, die bei einer Menge von $15,62 \text{ ml}$ eine Wirkstoffkonzentration von $256 \mu\text{g}/\text{ml}$ besitzt.

Bei Mischung von 1 ml Ausgangsverdünnung mit 1 ml Inokulum ergibt sich die Endkonzentration von $128 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Die weiteren Schritte der Verdünnungsreihe mit den zugehörigen Endkonzentrationen enthält die Tabelle 3.

8.5 Vorgehen bei großer Anzahl zu untersuchender Stämme

Bei großen Anzahlen gleichartiger Einzeluntersuchungen werden die Bouillon-Verdünnungen zweckmäßig mit Büretten oder Meßkolben abgefüllt. Die erforderlichen Volumenanteile dürfen auch mit automatischen Dosiereinrichtungen abgefüllt werden.

Tabelle 4 enthält als Beispiel die Werte für etwa 50 Untersuchungen und die zugehörigen Anteile.

8.6 Vorbereitung der Behältnisse

Nach Herstellung der benötigten Stufen wird je 1 ml der jeweiligen erreichten Konzentration (siehe Tabelle 3, Spalte 5, bzw. Tabelle 4, Spalte 6) in die Behältnisse der Versuchsreihe abgefüllt.

8.7 Inokulum

Von einer $(18 \pm 2) \text{ h}$ alten Bouillonkultur der stationären Wachstumsphase wird eine Verdünnung in Bouillon hergestellt, die einer Koloniezahl von 2×10^5 bis 2×10^6 vermehrungsfähiger Keime je ml entspricht. Jedem Behältnis der zu untersuchenden Reihe wird 1 ml des Inokulums beigegeben, so daß die endgültige Koloniezahl bei der Einsaat 10^5 bis 10^6 je ml des fertigen Testmediums enthält. Danach werden die Behältnisse $(18 \pm 2) \text{ h}$ bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet.

Ein beimpftes wirkstofffreies Behältnis wird gleichzeitig im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und dient als Vergleichsmuster für die vollständige Hemmung. Ein Kontrollstamm mit bekannter MHK ist bei jeder Versuchsserie mitzuführen.

8.8 Qualitätsprüfung

Sterilitäts- und Wachstumskontrollen sind bei jeder Charge mitzuführen, außerdem die Kontrollstämme nach Abschnitt 6 mit bekannter minimaler Hemmkonzentration (MHK) zur Titrationskontrolle.

9 Auswertung

Es ist festzustellen, bei welcher Konzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ein makroskopisch sichtbares Wachstum des Inokulums verhindert wird.

10 Beurteilung

Zur einheitlichen Beurteilung sind die in vitro ermittelten MHK-Werte den nach DIN 58 940 Teil 4 festgelegten Bewertungsstufen „empfindlich“, „mäßig empfindlich“ und „unempfindlich“ zuzuordnen.

Zum Vergleich der ermittelten MHK-Werte können die im Beiblatt 1 zu DIN 58 940 Teil 5 aufgeführten MHK-Sollwerte bei Kontrollstämmen herangezogen werden.

Hinweise auf die therapeutische Beurteilung der ermittelten MHK-Werte geben die im Beiblatt 1 zu DIN 58 940 Teil 4 aufgeführten MHK-Bereiche.

11 Befundbericht

Der Befundbericht muß den Anforderungen nach DIN 58 941 Teil 4 entsprechen.

*) Z. Z. Entwurf

2) Siehe Erläuterungen