

Medical microbiology; Methods for the determination of susceptibility of pathogens (except mycobacteria) to antimicrobial agents; Determination of MICs by agar dilution method

Ersatz für Ausgabe 08.79

Die in dieser Norm beschriebene Methode wird von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) als ausgewählte Methode für die Routinediagnostik empfohlen. Sie wird auch bei Ringversuchen in Verbindung mit der Bouillon-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 5 in Korrelation zur Ermittlung der Referenzwerte herangezogen.

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm gilt für die Empfindlichkeitsprüfung aerober bakterieller Krankheitserreger (außer Mykobakterien) mit der Agar-Dilutionsmethode. Sie ist als ausgewählte Methode für die Routinediagnostik einsetzbar. 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 von Laboratorium zu Laboratorium vergleichbar, d. h. wiederholbar und reproduzierbar sind.

Die Krankheitserreger werden nachfolgend Erreger genannt.

2 Begriffe

Nach DIN 58 940 Teil 1

Ausgewählte Methode nach DIN 58 936 Teil 1

3 Bezeichnung

Bezeichnung der Empfindlichkeitsprüfung von aeroben bakteriellen Erregern gegen Chemotherapeutika nach der Agar-Dilutionsmethode (AD):

Agar-Methode DIN 58 940 – AD

4 Geräte

- Petrischale DIN 12 339 – AB2 – 100 × 15 oder Petrischale aus Kunststoff mit etwa 90 mm Durchmesser
- 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)
- Auslaupipette nach DIN 12 696 oder DIN 12 697, sterilisiert
- Bürette nach DIN 12 700 Teil 1, Meßkolben, sterilisiert, oder andere geeignete Dosiereinrichtungen
- Replikator oder Mikroliterpipette zur Beimpfung

5 Kulturmedien oder Verdünnungsmittel

- Als Agar-Medium wird Mueller-Hinton-Medium¹⁾ verwendet.
- 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⁾
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923 ≙ DSM 1104
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213 ≙ DSM 2569
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212 ≙ DSM 2570
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 ≙ DSM 1103
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	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 6 angegeben.

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

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 ml²⁾) 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 µg/mg → 1,22 mg um einen Gehalt von 1 mg/ml Wirksubstanz zu erreichen.

8 Agar-Platten

Die wirkstoffhaltigen Agar-Platten dürfen 48 h bei einer Temperatur von + 4 °C aufbewahrt werden.

Für Referenzuntersuchungen dürfen Agar-Platten nur 24 h bei + 4 °C aufbewahrt werden.

¹⁾ Über die Bezugsquelle gibt Auskunft:

Normenausschuß Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Burggrafenstraße 6, 1000 Berlin 30

²⁾ Siehe Erläuterungen

Fortsetzung Seite 2 und 3

9 Durchführung

9.1 Stammlösung

Der Wirkstoffgehalt der Stammlösung ist nach Tabelle 2 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 µm) zu filtrieren.

9.2 Herstellung der Kulturmedien

Für jede Testplatte sind etwa 20 ml Agar-Medium erforderlich. Dieses Agar-Medium wird bei $(48 \pm 2)^\circ\text{C}$ flüssig gehalten.

9.3 Verdünnungsreihe

Die Konzentrationen nach Zugabe von 9 Volumenteilen Agar-Medium der einzelnen Stufen entsprechen den Werten der Exponentialreihe mit ganzen Exponenten für die Grundzahl 2 (siehe DIN 58 940 Teil 5/06.89, Tabelle 2).

9.4 Herstellung der Agar-Platten

1 Teil Verdünnung jeder Verdünnungsstufe wird mit jeweils 9 Teilen Agar in ein Reagenzglas gegeben, gemischt, in Petrischalen gegossen und zum Erstarren gebracht. Bei jeder Untersuchung muß eine wirkstofffreie Platte, die das entsprechende Lösungsmittel enthält, als Kontrolle mitgeführt werden.

Ausgangskonzentrationen, Mischungsverhältnis und Konzentrationen nach Zugabe von 9 Volumenteilen Agar-Medium enthält Tabelle 2.

9.5 Inokulum

Von einer (18 ± 2) h alten Bouillonkultur der stationären Wachstumsphase wird eine Verdünnung hergestellt, die etwa 10^9 vermehrfähige Keime je ml enthält.

Das Inokulum wird mit einem Replikator oder einer Mikroliterpipette so aufgetragen, daß auf einer Fläche von etwa $0,5\text{ cm}^2$ etwa 5×10^4 Keime resultieren.

Auf jeder Agar-Platte können gleichzeitig mehrere Stämme untersucht werden; darunter muß mindestens ein Stamm mit bekannter Empfindlichkeit zur Kontrolle sein.

Die Inokulationsstelle wird von unten mit einem Stempel oder mit Indikatorfarben gekennzeichnet.

Danach werden die Agar-Platten (18 ± 2) h bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet.

9.6 Qualitätsprüfung

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

10 Auswertung

Es ist festzustellen, bei welcher minimalen Hemmkonzentration (MHK) ein makroskopisch sichtbares Wachstum des Inokulums verhindert wird.

Kaum sichtbares Minimal-Wachstum oder wenige (nicht mehr als 3 bis 4) Einzelkolonien sind zu vernachlässigen.

11 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 (resistent)“ zuzuordnen.

Zum Vergleich der ermittelten MHK-Werte können die im Beiblatt 1 zu DIN 58 940 Teil 6 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-Grenzbereiche.

12 Befundbericht

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

Tabelle 2.

1	2	3	4	5	6	7
Konzentration µg/ml	Anzahl der Volumenteile	destilliertes Wasser ¹⁾ Anzahl der Volumenteile	Summe der Volumenteile	Erreichte Konzentration µg/ml	Endkonzentration β_{Fin} nach Zugabe von 9 Volumenteilen Agar-Medium µg/ml	$\text{lb} \left(\frac{\beta_{\text{Fin}}}{\mu\text{g/ml}} \right)^*)$
2000	6,4	3,6	10	1280	128	7
1280	2	2	4	640	64	6
1280	1	3	4	320	32	5
1280	1	7	8	160	16	4
160	2	2	4	80	8	3
160	1	3	4	40	4	2
usw.						

*) lb ist nach DIN 1302 der binäre Logarithmus $\text{lb} x = \log_2 x$.

1) Nach dem jeweils gültigen Arzneibuch

2) Siehe Erläuterungen