

DIN 58940-6

ICS 07.100.10

Ersatz für
DIN 58940-6:1989-06

**Medizinische Mikrobiologie –
Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen
Chemotherapeutika –
Teil 6: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach der
Agar-Dilutionsmethode;
Text Deutsch und Englisch**

Medical microbiology –
Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents –
Part 6: Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) with the agar dilution
method;
Text in German and English

Microbiologie médicale –
Contrôle de la sensibilité des agents pathogènes microbiens aux agents
chimiothérapeutiques –
Partie 6: Détermination de la concentration inhibitive minimale (CIM) par la méthode de
dilution du milieu gélosé;
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 24 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Inhalt

Seite

Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen.....	4
3 Begriffe	5
4 Bezeichnung.....	5
5 Untersuchungslaboratorium und Ausrüstung	6
5.1 Untersuchungslaboratorium	6
5.2 Ausrüstung.....	6
6 Kulturmedien und Verdünnungsmittel	6
7 Referenz-Kontrollstämmen	6
8 Wirkstoff-Stammlösung	7
9 Agar-Platten.....	8
9.1 Allgemeines.....	8
9.2 Füllmenge und Füllhöhe	8
9.3 Aufbewahrung.....	8
10 Herstellung der wirkstoffhaltigen Kulturmedien	8
11 Inokulum	8
11.1 Beschaffenheit	8
11.2 Trübungsstandard	9
11.3 Herstellung des Inokulums	9
11.3.1 Allgemeines	9
11.3.2 Direkt-Kolonie-Methode	9
11.3.3 Inokulum-Wachstum-Methode	9
11.4 Hinweise zur Herstellung des Inokulums (Inokulation)	10
12 Inkubation.....	10
13 Ablesung (MHK-Bestimmung).....	10
14 Auswertung und Beurteilung	11
15 Qualitätsprüfung	11
15.1 Allgemeines.....	11
15.2 Häufigkeit der Qualitätsprüfungen.....	11
16 Befundmitteilung	11
Literaturhinweise	12

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 (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 58940-6:1989-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Ausdehnung des Anwendungsbereiches auf Anaerobier, bestimmte anspruchsvolle Bakterienspezies und Sprosspilzarten;
- b) Anpassung der Festlegungen an den Stand der Wissenschaft;
- c) zweisprachige Veröffentlichung (deutsch/englisch);
- d) redaktionelle Überarbeitung.

Frühere Ausgaben

DIN 58940-6: 1979-08, 1989-06

Einleitung

Der Agar-Dilutionstest empfiehlt sich insbesondere zur gleichzeitigen (Referenz-)Testung einer großen Zahl an Isolaten, ist jedoch aufgrund des relativ hohen Aufwandes nur bedingt für den Routineeinsatz zur Empfindlichkeitsprüfung geeignet.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für die Empfindlichkeitsprüfung von Mikroorganismen gegenüber Chemotherapeutika mittels der Agar-Dilutionsmethode für:

- aerobe schnell wachsende Bakterienspezies;
- (in Bezug auf Wachstum) bestimmte anspruchsvolle Bakterienspezies ;
- obligat anaerob wachsende Bakterienspezies;
- Sprosspilzarten.

Da die Durchführung dieser Methode für alle genannten Anwendungsbereiche im Prinzip gleich ist, legt diese Norm die grundlegenden Anforderungen an eine effektive Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) mit der Agar-Dilution fest mit dem Ziel, vergleichbare (d. h. wiederholbare und reproduzierbare) Ergebnisse zu sichern.

Alle weiterführenden Standardmethoden zur Empfindlichkeitsprüfung spezieller Mikroorganismen mit der Agar-Dilution bauen auf den Elementen dieser Norm auf.

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 12339, *Laborgeräte aus Glas — Petrischalen*

DIN 12696, *Laborgeräte aus Glas — Messpipetten für völligen Ablauf, Klasse A und Klasse B*

DIN 12697, *Laborgeräte aus Glas — Messpipetten, schnell ablaufend, Wartezeit 15 Sekunden, Klasse AS*

DIN 58936-1, *Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin — Teil 1: Grundbegriffe*

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

DIN 58940-3, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 3: Agar-Diffusionstest*

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

DIN 58940-81, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 81: Mikrodilution; Spezielle Anforderungen an die Testung von nicht anspruchsvollen Bakterien*

DIN 58940-82, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 82: Mikrodilution; Spezielle Anforderungen an die Testung von anspruchsvollen Bakterien*

DIN 58940-83, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 83: Mikrodilution; Spezielle Anforderungen an die Testung von obligat anaeroben Bakterien*

DIN 58940-84, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 84: Mikrodilution; Spezielle Anforderungen an die Testung von Pilzen gegen Antimykotika*

DIN 58959-3, *Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 3: Anforderungen an Untersuchungsauftrag und Befundbericht*

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

DIN 58959-15, *Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 15: Anforderungen an den Einsatz von Kontrollstämmen bei der Empfindlichkeitsprüfung von anaeroben Krankheitserregern*

DIN 58959-16, *Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 16: Anforderungen an den Einsatz von Kontrollstämmen bei der Empfindlichkeitsprüfung von speziellen Bakterien*

DIN 58959-19, *Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 19: Anforderungen an den Einsatz von Kontrollstämmen bei der Untersuchung von Pilzen*

DIN EN ISO 385, *Laborgeräte aus Glas — Büretten (ISO 385:2005)*

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 58936-1.

4 Bezeichnung

Bezeichnung der Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika nach der Agar-Dilutionsmethode (AD):

Agar-Methode DIN 58940-6 – AD

5 Untersuchungslaboratorium und Ausrüstung

5.1 Untersuchungslaboratorium

Die Untersuchung muss in einem medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium durchgeführt werden, das mindestens der Sicherheitsstufe 2 (S 2) nach DIN EN 12128 entspricht.

5.2 Ausrüstung

5.2.1 Petrischale DIN 12339 – AB2 – 100 × 15 oder Petrischale aus Kunststoff mit etwa 90 mm Durchmesser.

5.2.2 Reagenzglas, etwa 16 mm × 100 mm, mit glattem Rand (z. B. Zentrifugenröhrchen nach DIN 58970-2, sterilisiert).

5.2.3 Auslaufpipette nach DIN 12696 oder DIN 12697, sterilisiert, oder Mikroliterpipette.

5.2.4 Bürette nach DIN EN ISO 385, Messkolben, sterilisiert, oder andere manuelle geeignete oder automatische Dosiereinrichtungen.

5.2.5 Replikator, Dispenser oder Mikroliterpipette zur Beimpfung.

6 Kulturmedien und Verdünnungsmittel

Als geeignetes Referenzkulturmedium für die Empfindlichkeitsprüfung von

- aeroben, schnell wachsenden Bakterien nach DIN 58940-81;
- anspruchsvollen Bakterien nach DIN 58940-82;
- Anaerobiern nach DIN 58940-83 und
- Sprosspilzen nach DIN 58940-84

werden die Kulturmedien und sterilisierten Verdünnungsflüssigkeiten nach 58940-3 verwendet.

7 Referenz-Kontrollstämme

Bei der Anwendung der Agar-Dilutionsmethode sind mindestens zwei geeignete Kontrollstämme auszuwählen und bei jeder Testung zur Überprüfung der Methodik mitzuführen. Dies gilt für die Empfindlichkeitsprüfung von:

- aeroben, schnell wachsenden Bakterien;
- anspruchsvollen Bakterien;
- Anaerobiern;
- Sprosspilzen.

8 Wirkstoff-Stammlösung

Der Wirkstoff für die Herstellung einer Stammlösung muss als Reinsubstanz oder Standardsubstanz bezogen und verwendet werden. Fertigarzneimittel (Extrakte von Arzneimitteln) dürfen nicht verwendet werden. Die Aktivität des Wirkstoffes muss angegeben sein.

Die Stammlösung wird entsprechend der vom Hersteller angegebenen Aktivität unter Verwendung eines geeigneten Lösemittels hergestellt, nach Bedarf aufgeteilt und bei der vorgegebenen Temperatur bzw. bei 4 °C bis 8 °C in verschlossenen Behältnissen aufbewahrt. Sie darf auch portionsweise eingefroren werden, sofern die Stabilität der Chemotherapeutikalösung dies zulässt.

BEISPIEL Aktivität 0,818 bzw. 81,8 % → 1,22 mg, um einen Gehalt von 1 mg/ml Wirksubstanz zu erreichen.

Der Wirkstoffgehalt der Stammlösung sollte nach Tabelle 1 eingestellt werden. 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.

Tabelle 1 — Herstellung der Wirkstoffkonzentrationen aus den Stammlösungen

1	2	3	4	5	6	7
Mischung				Erreichte Konzentration	Wirkstoff-konzentration im Agar-Medium ^a β_{Fin}	$\lg \left(\frac{\beta_{Fin}}{\mu\text{g/ml}} \right)^b$
Wirkstoff-konzentration der Stammlösung µg/ml	Anzahl der Volumenteile: Stammlösung	Anzahl der Volumenteile: Dest. Wasser ^c	Summe der Volumenteile			
2 000	6,4	3,6	10	1 280	128	7
1 280	2	2	4	640	64	6
1 280	1	3	4	320	32	5
1 280	1	7	8	160	16	4
160	2	2	4	80	8	3
160	1	3	4	40	4	2
usw.						
^a Die Endkonzentration wird durch Zugabe von neun Volumenteilen Agar-Medium erzielt. ^b „lg“ steht für den binären Logarithmus; es gilt $\lg x = \log_2 x$ (siehe DIN 1302). ^c Nach dem jeweils gültigen Arzneibuch [1].						

Von jeder Stammlösung sind am Testtag die entsprechenden Verdünnungen (üblicherweise $\log_2$) frisch herzustellen.

9 Agar-Platten

9.1 Allgemeines

Die Petrischalen sind vor der Befüllung mit der vorgesehenen Wirkstoffverdünnung zu beschriften. Für Kontrollzwecke sind neben den wirkstoffhaltigen Kulturmedien mehrere (für jeden Wirkstoff mindestens zwei) wirkstofffreie Kulturmedien von der gleichen Kulturmediencharge herzustellen.

9.2 Füllmenge und Füllhöhe

Die Füllhöhe in den Petrischalen muss mindestens 4 mm betragen und sollte 4,5 mm nicht überschreiten.

ANMERKUNG 1 Für Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm werden 25,5 ml Kulturmedium benötigt, für Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm 31,4 ml, für Petrischalen mit einem Durchmesser von 15 cm 70,7 ml, für quadratische Platten mit einer Kantenlänge von 12 cm 70 ml.

ANMERKUNG 2 Unterdosierung bewirkt ein zu schnelles Austrocknen des agarhaltigen Mediums und ergibt keine ausreichend gleichmäßige Schichtdicke, da nahezu alle Petrischalen ein nicht vollständig planes Bodenteil besitzen. Um eine zusätzliche Wirkstoffgradientenbildung durch unterschiedliche Schichtdicken beim Gießen zu vermeiden, sollte die Befüllung mit Kulturmedium und das Erstarren des flüssigen Kulturmedium auf einem ausnivellierten Untergrund erfolgen.

9.3 Aufbewahrung

Die festen Kulturmedien dürfen nicht länger als 48 h bei einer Temperatur von 4 °C bis 8 °C aufbewahrt werden. Sie dürfen länger aufbewahrt werden, wenn entsprechende Haltbarkeitsdaten vorliegen.

Für Referenzuntersuchungen dürfen Agar-Platten nicht länger als 24 h nach Herstellung bei 4 °C bis 8 °C aufbewahrt werden.

10 Herstellung der wirkstoffhaltigen Kulturmedien

Für jede Wirkstoffverdünnung und die Kontrollen sind entsprechende Behältnisse mit der für eine oder mehrere Platten benötigten verflüssigten Kulturmedienmenge bereitzustellen und entsprechend (mit der Wirkstoffverdünnung) zu markieren. Dieses Agar-Medium kann bei (48 ± 2) °C flüssig gehalten werden.

Ein Teil Verdünnung jeder Verdünnungsstufe wird mit jeweils neun Teilen Agar in ein steriles Gefäß 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, Mischungsverhältnisse und Konzentrationen nach Zugabe von neun Volumenteilen Agar-Medium sind in Tabelle 1 angegeben.

11 Inokulum

11.1 Beschaffenheit

Das Inokulum muss so beschaffen sein, dass es nach dem Auftragen auf der Agaroberfläche und nach der Bebrütung zur Bildung eines kolonieförmigen Zellrasens kommt. Hierzu wird eine entsprechende Menge der Erregersuspension mittels eines Replikators aufgetragen oder mittels einer Mikroliterpipette so auf das Kulturmedium aufgetropft, dass auf einer Fläche von etwa 0,5 cm² bei Bakterien 1×10^4 bis 5×10^4 Zellen und bei Sprosspilzen 5×10^3 bis 1×10^4 Zellen resultieren.