

DIN 58940-7**DIN**

ICS 07.100.10

Ersatz für
DIN 58940-7:1994-09

**Medizinische Mikrobiologie –
Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen
Chemotherapeutika –
Teil 7: Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) mit
der Mikrobouillondilutionsmethode;
Text Deutsch und Englisch**

Medical microbiology –
Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents –
Determination of the minimum bactericidal concentration (MBC) with the method of
microbouillondilution;
Text in German and English

Microbiologie médicale –
Contrôle de la sensibilité des agents pathogènes microbiens aux agents
chimiothérapeutiques –
Partie 7: Détermination de la concentration bactericide minimale (CBM) par la méthode
microbouillondilution;
Texte en allemand et anglaise

Gesamtumfang 21 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Bezeichnung.....	4
5 Untersuchungslaboratorium und Ausrüstung	4
5.1 Untersuchungslaboratorium	4
5.2 Ausrüstung	5
5.2.1 Behältnisse zur Durchführung des Tests	5
5.2.2 Geräte zum Beschicken der Testbehältnisse und zum Übertragen der Keimsuspension aus der antibiotikumhaltigen Bouillon auf feste Kulturmedien	5
6 Kulturmedium.....	5
7 Referenzstämme	5
8 Chemotherapeutika	6
9 Durchführung	6
9.1 Beschickung der Testbehältnisse.....	6
9.2 Inokulum	6
9.2.1 Allgemeines	6
9.2.2 Flüssigkulturmethode	6
9.2.3 Koloniesuspensionsmethode.....	7
9.3 Inokulation der Mikrotiterplatten.....	7
9.4 Ermitteln der CFU im Inokulum	7
9.5 Feststellen der Bakterizidie	8
9.6 Bewertung des Ergebnisses.....	8
Anhang A (normativ) Vorgaben für Mueller-Hinton-Bouillon	9
Literaturhinweise	11

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 58940-7:1994-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Norm wurde redaktionell überarbeitet;
- b) die Festlegungen wurden insgesamt dem neuesten wissenschaftlichen Stand angepasst;
- c) das Inokulum wurde aus der DIN EN ISO 20776-1 übernommen;

Anhang A ergänzt.

Frühere Ausgaben

DIN 58940-7: 1994-09

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für die Empfindlichkeitsprüfung schnellwachsender aerober bakterieller Krankheitserreger (außer Mykobakterien) zur Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) mit der Bouillon-Dilutionsmethode in Mikrotitrationsplatten (Mikrodilution), siehe DIN 58940-8.

Zweck dieser Festlegungen ist es, vergleichbare (d. h. wiederholbare und reproduzierbare) Ergebnisse bei der Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration mit der Mikrodilution zu ermöglichen.

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

DIN 58940-4 Beiblatt 1, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 4: Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration — MHK-Grenzwerte von antibakteriellen Wirkstoffen*

DIN 58940-8, *Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 8: Mikrodilution — Allgemeine methodenspezifische Anforderungen*

DIN 58956-1, *Medizinische Mikrobiologie — Medizinisch-mikrobiologische Laboratorien — Klassifizierung, Abgrenzung der Arbeitsstätten, Räumlichkeiten — Sicherheitstechnische Anforderungen und Prüfung*

DIN EN ISO 20776-1:2007-02, *Labormedizinische Untersuchungen und In-vitro-Diagnostika-Systeme — Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Evaluation von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung — Teil 1: Referenzmethode zur Testung der In-vitro-Aktivität von antimikrobiellen Substanzen gegen schnell wachsende aerobe Bakterien, die Infektionskrankheiten verursachen (ISO 20776-1:2006); Deutsche Fassung EN ISO 20776-1:2006*

3 Begriffe

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

4 Bezeichnung

Bezeichnung der Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) mit der Mikrodilution (MD):

MBK-Bestimmung DIN 58940-7 — MD

5 Untersuchungslaboratorium und Ausrüstung

5.1 Untersuchungslaboratorium

Die Untersuchung ist in einem medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium durchzuführen, das mindestens der Sicherheitsstufe 2 (S 2) nach DIN 58956-1 entsprechen muss.

5.2 Ausrüstung

5.2.1 Behältnisse zur Durchführung des Tests

Zur Aufnahme des Kulturmediums dienen Glas- oder Kunststoffbehältnisse aus inertem Material mit einer geeigneten Anzahl (≥ 6) Vertiefungen mit einem Fassungsvermögen von $\leq 500 \mu\text{l}$ (z. B. Mikrotitrationsplatte). Eine Behandlung der Kunststoffoberfläche, wie für die Systeme zur Zellkultur üblich, ist nicht erforderlich.

Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten je ml (CFU/ml) des Inokulums und nach Inkubation der Suspension in antibiotikahaltigem Medium dienen Petrischalen aus klarem Kunststoff mit planem Boden und einem Durchmesser von 90 mm bzw. 140 mm.

5.2.2 Geräte zum Beschicken der Testbehältnisse und zum Übertragen der Keimsuspension aus der antibiotikumhaltigen Bouillon auf feste Kulturmedien

Verwendung finden Präzisionspipetten oder vergleichbare Geräte, die reproduzierbare Volumina von $10 \mu\text{l}$ bis $100 \mu\text{l}$ abgeben.

6 Kulturmedium

Als Referenzkulturmedium dient ein wie im Anhang beschriebenes Müller-Hinton-Medium oder ein vergleichbares Medium, in welchem die Referenzstämme nach Abschnitt 7 vergleichbare Wachstumskurven zeigen.

7 Referenzstämme

Tabelle 1 gibt die Referenzstämme an¹⁾

Tabelle 1

Referenzstamm (Kontrollstamm)	
Spezies	Stammsammlungsnummer
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC ^a 25923 oder DSM ^b 1104
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213 oder DSM 2569
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212 oder DSM 2570
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 oder DSM 1103
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853 oder DSM 1117
^a ATCC American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA ^b DSM Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig	

1) Über die Bezugsquelle gibt Auskunft:
Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., 10772 Berlin
(Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin)

8 Chemotherapeutika

Die zu untersuchenden Konzentrationsbereiche müssen im Serum oder Gewebe realisierbar sein. Die in Beiblatt 1 zu DIN 58940-4 aufgeführten MHK-Werte für die Bewertungssufe „sensibel“ sind ein geeigneter Richtwert für die **mittlere** zu prüfende Konzentration.

9 Durchführung

9.1 Beschickung der Testbehältnisse

Die Testbehältnisse werden mit jeweils 50 µl Testmedium mit dem zu testenden Chemotherapeutikum in geeigneten Konzentrationen beschickt. Jede Konzentration des Chemotherapeutikums wird dabei mindestens in zwei Vertiefungen des Testbehältnisses eingebracht (mindestens 2facher Parallelansatz). Eine antibiotika-freie Wachstumskontrolle muss für jeden Testansatz mitgeführt werden.

Die Konzentrationen des Chemotherapeutikums in dem Testmedium müssen doppelt so hoch sein wie die zu testende Endkonzentration, um den Verdünnungseffekt durch das Inokulum in ebenfalls 50 µl Testmedium auszugleichen.

Zum Zeitpunkt der Beimpfung muss die Temperatur der Bouillon in den Testbehältnissen > 20 °C bis maximal 37 °C betragen. Die Erwärmung der Testbehältnisse darf erst kurzfristig (max. 1 h) vor dem Zufügen des Inokulums geschehen, da vor allem β -Lactam-Antibiotika durch Wärme rasch degradiert werden können.

9.2 Inokulum

9.2.1 Allgemeines

Die Standardisierung des Inokulums ist von ausschlaggebender Bedeutung für die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Empfindlichkeitsprüfung mit Dilutionsmethoden. Für jedes Isolat, das mit dieser Referenzmethode getestet wird, muss daher sowohl die Reinheit und als auch die Zelldichte in koloniebildenden Einheiten bestimmt werden.

Das Inokulum darf entweder mittels Verdünnung einer Flüssigkultur gewonnen werden oder durch Suspension von über Nacht auf nichtselektiven Agarmedien gewachsenen Kolonien in Nährmedium oder physiologischer Kochsalzlösung. In beiden Fällen sind vier bis fünf Kolonien von einem nichtselektiven Agarmedium zu verwenden, um die zufällige Auswahl atypischer Varianten auszuschließen.

Die Zelldichte des Inokulums im Testansatz muss 5×10^5 CFU/ml betragen (Bereich: 2×10^5 CFU/ml bis 8×10^5 CFU/ml).

9.2.2 Flüssigkulturmethode

Drei bis fünf Kolonien, die auf einem nichtselektiven Agarmedium gewachsen sind, werden mit einer Impföse in ein Flüssigmedium wie Trypton-Sojabouillon oder Hirn-Herz-Bouillon überimpft. Das Nährmedium darf die Aktivität des getesteten Pharmakon nicht inhibieren. Die Flüssigkultur wird bei 34 °C bis 37 °C inkubiert, bis ihre Trübung dem McFarland-Standard 0,5 entspricht. Falls erforderlich, wird die Kultur durch Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung oder Medium auf diesen Trübungsgrad eingestellt. Dazu kann ein Photometer (Absorption 0,08 bis 0,13 bei 625 nm Wellenlänge in 1-cm-Küvetten) oder ein geeichtes Nephelometer verwendet werden. Alternativ können Inokulum und der McFarland-Standard 0,5 vor einem weißen Hintergrund mit schwarzen Linien visuell verglichen werden (Inokulum und Standard in gleichartigen Röhrchen). Auch jede andere Methode, mit der sich reproduzierbare Zelldichten (CFU/ml) einstellen lassen, kann verwendet werden.

ANMERKUNG Herstellung eines McFarland-Standards 0,5: 0,5 ml einer 0,048-molaren BaCl_2 -Lösung (11,72 g/l $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) unter ständigem Rühren zu 99,5 ml H_2SO_4 0,18 mol/l pipettieren. Es entsteht eine Bariumsulfat-Suspension.

9.2.3 Koloniesuspensionsmethode

Drei bis fünf auf nichtselektivem Agar gewachsene Kolonien (Inkubation bei 34 °C bis 37 °C für 18 h bis 24 h; falls erforderlich, auch länger) werden mit einer Impföse aufgenommen und in steriles Medium oder physiologische Kochsalzlösung transferiert. Die Suspension wird auf eine Trübung von McFarland-Standard 0,5 eingestellt, wie in DIN EN ISO 20776-1:2007-02, 3.4.2, für Flüssigkulturen beschrieben.

Die Dichte lebensfähiger Zellen im gebrauchsfertigen Inokulum hängt bei allen Bakterien vom Zustand der Kultur ab. Der Effekt ist bei anspruchsvollen Keimen wie *Streptococcus pneumoniae* besonders ausgeprägt, hier kann die Verwendung älterer Kulturen zu einer signifikanten Reduktion der Dichte lebensfähiger Zellen im Inokulum führen.

Mit einer der beiden Methoden hergestellte bakterielle Suspensionen häufigerer klinisch relevanter Spezies enthalten bei korrekt eingestellter Dichte etwa 1×10^8 CFU/ml.

Das wie beschrieben hergestellte und dichteadjustierte Inokulum wird in Nährbouillon auf eine Arbeitszelldichte von 5×10^5 CFU/ml (Bereich 2×10^5 CFU/ml bis 8×10^5 CFU/ml) eingestellt. Die jeweils benötigte Verdünnung hängt von der Spezies des Mikroorganismus und dem Inokulationsmodus ab. Werden 0,1 ml einer standardisierten Bakteriensuspension in ein Röhrchen mit 9,9 ml Medium pipettiert (Verdünnung 1:100), entsteht eine Suspension mit einer Zelldichte von 1×10^6 CFU/ml. Werden davon 50 µl dem gleichen Volumen einer Antibiotikallösung zugesetzt, ergibt sich bei vielen Gram-negativen Bakterien (z. B. *Escherichia coli*) ein gebrauchsfertiges Inokulum von 5×10^5 CFU/ml. Enthalten die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatte 100 µl Nährlösung mit Antibiotikum/Antimykotikum, sollte die Zellsuspension so eingestellt werden, dass das benötigte Inokulum in 5 µl Volumen enthalten ist. Bei Gram-positiven Erregern und Pilzen kann eine geringere Verdünnung der auf McFarland-Standard 0,5 eingestellten Suspension erforderlich sein; die geeignete Verdünnung ist in Vorversuchen festzulegen.

9.3 Inokulation der Mikrotiterplatten

Die Inokulation der Mikrotitrationsplatten muss binnen 30 min nach Standardisierung der Inokulumsuspension erfolgen, um die Dichte lebender Zellen möglichst konstant zu halten. In jede Vertiefung, die 50 µl Nährmedium mit Antibiotika- bzw. Antimykotikaverdünnung (siehe DIN EN ISO 20776-1:2007-02, 3.3) enthält, werden 50 µl der Mikroorganismensuspension (siehe DIN EN ISO 20776-1:2007-02, 3.4) pipettiert. Werden 100 µl Antibiotika- bzw. Antimykotikaverdünnung vorgelegt, sollte das zugegebene Inokulum ein Volumen von maximal 5 µl haben.

Aus dem Inokulum wird ein geeignetes festes Kulturmedium fraktioniert beimpft, um die Reinheit der Bouillonkultur zu überprüfen.

9.4 Ermitteln der CFU im Inokulum

Zur Ermittlung der Bakterizidie muss die Anzahl der CFU je ml im Inokulum zu Versuchsbeginn bekannt sein. Dies kann z. B. dadurch erreicht werden, dass die hergestellte Keimsuspension in Bouillon oder physiologischer NaCl-Lösung 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} verdünnt wird. Jeweils 100 µl der Suspension werden mit der Präzisionspipette auf einem geeigneten Agarmedium gleichmäßig verteilt. Nach 18- bis 20-stündiger Inkubation bei 37 °C werden die Kolonien ausgezählt und die Anzahl der CFU je ml berechnet.