

Medizinische Mikrobiologie
Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen
Krankheitserregern (außer Mykobakterien)
gegen Chemotherapeutika
Mikrodilution

DIN
58 940
Teil 8

Medical microbiology; methods for the determination of susceptibility of pathogens (except mycobacteria) to antimicrobial agents; microdilution

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm gilt für die Empfindlichkeitsprüfung aerober bakterieller Krankheitserreger (außer Mykobakterien) mit der Mikrodilution. Die Untersuchung ist in einem medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium durchzuführen, das mindestens Typ 2 nach DIN 58956 Teil 1 entsprechen muß.

Zweck dieser Festlegungen ist es, vergleichbare (d. h. wiederholbare und reproduzierbare) Ergebnisse bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) mit der Mikrodilution zu ermöglichen, [1], [2] und [3].

2 Begriffe

Nach DIN 58940 Teil 1.

3 Bezeichnung

Bezeichnung der Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika nach der Mikrodilution (Md):

Mikrodilution DIN 58940 — Md

4 Geräte

4.1 Behältnisse zur Durchführung des Tests

Zur Aufnahme des Kulturmediums dienen Glas- oder Kunststoffbehältnisse aus inertem Material mit einer geeigneten Anzahl (≥ 3) küvettenartiger Vertiefungen mit einem Fassungsvermögen von $\leq 500 \mu\text{l}$.

4.2 Geräte zum Beschicken der Testbehältnisse

Die Beschickung erfolgt mit Präzisionspipetten oder vergleichbaren Geräten, die reproduzierbare Volumina von $50 \mu\text{l}$ bis $100 \mu\text{l}$ ermöglichen.

5 Kulturmedium

Als Referenzkulturmedium dient Mueller-Hinton-Bouillon*) oder ein vergleichbares Medium, mit der die im Beiblatt 1 zu DIN 58940 Teil 8 angegebenen MHK-Werte für die Referenzstämme nach Abschnitt 6 erreicht werden können.

6 Referenzstämme

Referenzstamm (Kontrollstamm)	
Spezies	Stammsammlungsnummer ¹⁾
Staphylococcus aureus	ATCC 25 923 $\triangleq$ DSM 1104
Staphylococcus aureus	ATCC 29 213 $\triangleq$ DSM 2569
Enterococcus faecalis	ATCC 29 212 $\triangleq$ DSM 2570
Escherichia coli	ATCC 25 922 $\triangleq$ DSM 1103
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27 853 $\triangleq$ DSM 1117
¹⁾ Siehe Erläuterungen	

7 Chemotherapeutika

Die zu untersuchenden Chemotherapeutika mit den zur Untersuchung vorgeschlagenen Konzentrationsbereichen für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) sind in Beiblatt 1 zu DIN 58940 Teil 8 aufgeführt.

8 Durchführung

8.1 Herstellung der Wirkstoffverdünnung

Die Verdünnungen der antimikrobiellen Wirkstoffe werden so hergestellt, daß jeweils ausreichende Mengen der entsprechenden Konzentration vorhanden sind.

Für die geeigneten Dosiereinrichtungen wird bei der Verteilung von $0,1 \text{ ml}$ je Vertiefung der Mikrotitrationsplatte eine Grenzabweichung von $\pm 0,02 \text{ ml}$ gefordert. Die gefüllten Behältnisse werden gegen Verdunstung und Kontamination geschützt bis zur Beimpfung aufbewahrt.

Wird der Test nicht sofort durchgeführt, können die Behältnisse bei -20°C oder darunter, vorzugsweise bei -60°C , tiefgekühlt aufbewahrt werden. Vorgefertigte Systeme werden entsprechend Herstellerangaben gelagert. Selbst hergestellte Systeme sollen innerhalb von 6 Wochen verbraucht werden. Andernfalls gilt die auf der Verpackung anzugebene Haltbarkeitsdauer. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren ist nicht möglich, da besonders

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

Fortsetzung Seite 2

bei β -Lactam-Antibiotika die Aktivität vermindert wird. Diese Einschränkung trifft nur bei den in Lösung befindlichen Antibiotika bzw. tiefgekühlten Antibiotika zu.

8.2 Beimpfen (Inokulation)

Die Beimpfung erfolgt mit einem standardisierten Inokulum, das durch Einstellen einer Trübung nach McFarland-Standard No. 0.5 [1] und [4] erhältlich ist. Hierzu werden 4 bis 5 Kolonien einer Reinkultur in 2 bis 5 ml Mueller-Hinton- oder vergleichbarer Bouillon*) überimpft, sorgfältig geschüttelt und gegebenenfalls noch bebrütet. Die nach McFarland-Standard No. 0.5 eingestellten Kulturen sollten eine Bakterienmenge von 10^8 KBE/ml enthalten. Diese Keimsuspension wird entsprechend der weiteren Arbeitstechnik so verdünnt, daß je Vertiefung/Mikrotitrationsplatte eine Keimzahl von 5×10^5 KBE/ml resultiert. Zwischen der Herstellung des Inokulums und der Beimpfung der Behältnisse sollten nicht mehr als 15 Minuten vergehen.

8.3 Bebrütung (Inkubation)

Die inokulierten Behältnisse für die MHK-Bestimmung werden, gegen Verdunstung zuverlässig geschützt, in einem Brutschrank (siehe DIN 58945 Teil 1) bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ für (18 ± 2) h bebrütet.

Zitierte Normen und andere Unterlagen

- | | |
|-----------------------------------|---|
| DIN 58940 Teil 1 | Medizinische Mikrobiologie; Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika; Begriffe |
| DIN 58945 Teil 1 | Brutschränke für mikrobiologische Zwecke; Begriffe, Anforderungen, Anwendung |
| DIN 58956 Teil 1 | Medizinische Mikrobiologie; Medizinisch-mikrobiologische Laboratorien; Begriffe, Risikobereiche, Räumlichkeiten, sicherheitstechnische Anforderungen und Prüfung |
| Beiblatt 1 zu
DIN 58940 Teil 4 | Medizinische Mikrobiologie; Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika; Liste der Grenzwerte und Tagesdosierungen von Chemotherapeutika sowie Bewertung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) |
| Beiblatt 1 zu
DIN 58940 Teil 8 | Medizinische Mikrobiologie; Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika; MHK der Testsubstanzen bei Kontrollstämmen für die Mikrodilution |
- [1] Hallmann, L. und Burkhardt, F.
Klinische Mikrobiologie, Ausgewählte Untersuchungsmethoden für das bakteriologische, serologische, virologische und parasitologische Laboratorium; 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)
Anmerkung: 5. Auflage 1990 in Vorbereitung
- [2] Thornsberry, C., J. Anhalt, A. L. Berry, E. Hugh-Gerlach, J. Hossom, R. N. Jones, J. M. Matsen, R. C. Moellering, R. Norton:
Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically
NCCLS, Vol. 3, No. 2 (1983)
- [3] Wilkinson, P. J.:
Das Mikrotitersystem für die Empfindlichkeitsprüfung.
Immunität und Infektion 6 (1978), S. 267
- [4] Sonnenwirth, A. C., Jarett, L.:
Bacteriological Methods, Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnostics;
8. Auflage, Vol. 2, S. 1363. The Mosby Co. ff. Louis 1980

Erläuterungen

Diese Norm wurde in Zusammenarbeit mit der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) vom Arbeitsausschuß E10 „Chemotherapeutische Untersuchungsmethoden“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. erarbeitet.

Zu Abschnitt 6

ATCC steht für
American Type Culture Collection
12301 Parklawn Drive
Rockville
Maryland 20852

DSM steht für
Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen
Mascheroder Weg 1 b
3300 Braunschweig

Internationale Patentklassifikation

C 12 N 1/20 C 12 R 1/445 C 12 R 1/19 C 12 R 1/385 G 01 N 33/50

*) Siehe Seite 1

9 Qualitätsprüfung

Die Behältnisse für die MHK-Bestimmung in der Mikrodilution müssen bei Selbstherstellung auf Sterilität geprüft werden. Hierfür müssen Kontroll-/Mikrotitrationsplatten bereitstehen. Bei Wachstum von Mikroorganismen in den nicht inokulierten Kontroll-Vertiefungen der Mikrotitrationsplatten ist die gesamte Charge zu verwerfen. Jede Testserie wird durch das Beimpfen je eines Behältnisses mit den Kontrollstämmen wie sie in Abschnitt 6 beschrieben sind, kontrolliert.

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

10 Auswertung

Die niedrigste Konzentration, bei der kein sichtbares Wachstum auftritt, wird als minimale Hemmkonzentration (MHK) angegeben. Dabei wird das Wachstum in den Vertiefungen, die Chemotherapeutika enthalten, mit dem Wachstum in der Wachstumskontrolle (kein Chemotherapeutikum) verglichen.

Für die Bewertungsstufe der MHK gelten die Angaben in Beiblatt 1 zu DIN 58940 Teil 4.