

Medizinische Mikrobiologie
**Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern
 gegen Chemotherapeutika**
 Teil 82: Mikrodilution
 Spezielle Anforderungen an die Testung von anspruchsvollen Bakterien

DIN
58940-82

ICS 07.100.10

Medical microbiology — Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents — Part 82: Microdilution — Special requirements for testing of fastidious bacteria

Microbiologie médicale — Contrôle de la sensibilité des agents pathogènes microbiens aux agents chimiothérapeutiques — Partie 82: Microdilution — Conditions spécifiques pour l'antibiogramme des bactéries exigeantes

In case of doubt, the German-language version should be consulted as the authoritative text.

Vorwort

Diese Norm wurde vom Unterausschuss UA 2 „Empfindlichkeitsprüfung von anspruchsvollen Bakterien“ des Arbeitsausschusses E 10 „Chemotherapeutische Untersuchungsmethoden“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. erarbeitet.

Die Anforderungen an die Empfindlichkeitsprüfung von anspruchsvollen Bakterien gegen Chemotherapeutika mit der Mikrodilution bauen auf den allgemeinen methodenspezifischen Anforderungen nach DIN 58940-8 auf; Teil 8 und Teil 82 der Normen der Reihe DIN 58940 stehen somit in unmittelbarer Beziehung hinsichtlich ihrer Anwendung.

DIN 58940 besteht aus den folgenden Teilen (Beiblätter sind nicht aufgeführt):

- Teil 1: Begriffe
- Teil 2: Wirkstoffträger für den Agar-Diffusionstest (zz. Entwurf)
- Teil 3: Agar-Diffusionstest
- Teil 4: Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration
- Teil 5: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nach der Bouillon-Dilutionsmethode (Makrodilution)
- Teil 6: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nach der Agar-Dilutionsmethode
- Teil 7: Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK)
- Teil 8: Mikrodilution — Allgemeine methodenspezifische Anforderungen
- Teil 9: Regressionsanalyse zur Korrelation von Hemmhofdurchmesser (HHD) und minimaler Hemmkonzentration (MHK) (zz. Entwurf)
- Teil 10: Kriterien für die Bewertung der In-vitro-Wirksamkeit neuer Chemotherapeutika (zz. Entwurf)
- Teil 20: Codierung von antimikrobiellen Wirkstoffen
- Teil 81: Mikrodilution — Spezielle Anforderungen an die Testung von nicht anspruchsvollen Bakterien

Foreword

This standard was elaborated by the subcommittee UA 2 “Susceptibility testing of fastidious bacteria” of the technical committee E 10 “Chemotherapeutic testing methods” of the Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (Medical Standards Committee at the German Institute for Standardization).

The requirements for the susceptibility testing of fastidious bacteria to antimicrobial agents by means of microdilution are based on the general method-specific requirements according to DIN 58940-8; part 8 and part 82 of the standards of the series DIN 58940 are thus closely connected with regard to their use.

DIN 58940 consists of (supplements are not listed):

- Part 1: Terminology
- Part 2: Active substance carriers for the agar diffusion test (presently draft)
- Part 3: Agar diffusion test
- Part 4: Evaluation classes of the minimum inhibitory concentration
- Part 5: Determination of MICs by broth dilution method (macrodilution)
- Part 6: Determination of MICs by agar dilution method
- Part 7: Determination of the minimum bactericidal concentration (MBC) with the aid of microdilution
- Part 8: Microdilution — General method-specific requirements
- Part 9: Regression line analysis for the correlation of zone diameters and MICs (presently draft)
- Part 10: Criteria for the evaluation of the in vitro efficacy and the admission of new antimicrobial agents (presently draft)
- Part 20: Codes for antimicrobial agents
- Part 81: Microdilution — Special requirements for testing of non-fastidious bacteria

Fortsetzung Seite 2 bis 11

Continued on pages 2 to 11

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

- 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

Einleitung

Durch die Entwicklung von Resistenzeigenschaften bei anspruchsvollen Bakterien, wie z. B. Penicillin-/Ampicillin-resistenz bei *Streptococcus pneumoniae* oder *Haemophilus influenzae*, die Makrolidresistenz bei *Streptococcus pyogenes* ist es notwendig, auch derartige Krankheitserreger gegenüber Chemotherapeutika zu testen, um die epidemiologische Situation zu verfolgen und eine gezielte bzw. kalkulierte Antibiotikatherapie zu ermöglichen.

Die Datenlage zeigt, dass keine standardisierten Testmethoden vorhanden sind und eine Testung und Beurteilung der Empfindlichkeitsprüfung aufgrund fehlender Aussagen zur Korrelation zwischen Test- und dem Therapieergebnis schwierig ist.

Diese Norm soll die Grundlagen für eine standardisierte Testung von klinisch relevanten anspruchsvollen Bakterien mit der Mikrodilution schaffen. Die Methode wird unter diesen Bedingungen als Referenzmethode für anspruchsvolle Bakterien angesehen. Zu einem späteren Zeitpunkt, wenn die Korrelation zwischen MHK-Werten und Hemmhofdurchmesser erarbeitet wurde, ist die Erarbeitung einer Norm für den Agar-Diffusionstest vorgesehen.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt zusammen mit der methodenspezifischen Basisnorm nach DIN 58940-8 als Grundlage für die In-vitro-Empfindlichkeitsprüfung von anspruchsvollen Bakterien gegen Antibiotika mit der Bouillon-Dilutionsmethode in Behältnissen für die Mikrodilution.

Sie legt die Anforderungen an die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) der anspruchsvollen Bakterien, wie *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Moraxella catarrhalis*, mittels der Mikrodilution fest mit dem Ziel, reproduzierbare sowie inter- und intralabor-vergleichbare Ergebnisse sicherzustellen.

Diese Methode gilt als eine Referenzmethode und ist als Routinemethode einsetzbar.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

DIN 58940-1

Medizinische Mikrobiologie – Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika – Teil 1: Begriffe

DIN 58940-4

Medizinische Mikrobiologie – Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika – Teil 4: Bewertungsstufen der minimalen Hemmkonzentration

- Part 82: Microdilution — Special requirements for testing of fastidious bacteria
- Part 83: Microdilution — Special requirements for testing of obligat anaerobic bacteria
- Part 84: Microdilution — Special requirements for testing of fungi against antifungal agents

Introduction

Due to the development of resistance patterns among fastidious bacteria, e.g. *Streptococcus pneumoniae* or *Haemophilus influenzae* resistance to penicillin and ampicillin, and macrolide resistance in the case of *Streptococcus pyogenes*, it is necessary to include these pathogens into the susceptibility testing against antimicrobial agents in order to monitor the epidemiological situation and to enable a well-directed and predictable form of chemotherapy.

Due to a lack of correlation between a test result received under standardized conditions and a therapeutic result, the data presently available neither allow for a meaningful mode of testing nor a clear evaluation of test results.

The purpose of this standard is to provide the principles for a standardized testing of clinically relevant fastidious bacteria by means of microdilution. This method with its required test conditions being considered the reference method for fastidious bacteria. At a later date, after elaboration of the correlation between MIC values and inhibition zone diameters, it is intended to draft a standard on agar diffusion test.

1 Scope

This standard, together with the method-specific basic standard according to DIN 58940-8, serves as basis for the in vitro susceptibility testing of fastidious bacteria to antibiotics by means of the broth dilution method in containers for microdilution.

This standard covers the requirements for the evaluation of the minimum inhibition concentration (MIC) of fastidious bacteria, such as *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Moraxella catarrhalis*, by means of microdilution in order to ensure reproducible as well as comparable (inter- and intra-laboratory) results.

This method applies as reference method and can be used as routine method.

2 Normative references

This standard incorporates by dated and undated references, provisions from other publications. These normative references are cited at the appropriate places in the text and the publications are listed hereafter. For dated references, subsequent amendments to or revisions of any of these publications apply to this standard only when incorporated in it by amendment or revision. For undated references the latest edition of the publication referred to applies.

DIN 58940-1

Medical microbiology – Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents – Part 1: Terminology

DIN 58940-4

Medical microbiology – Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents – Part 4: Evaluation categories of minimum inhibition concentrations

Beiblatt 1 zu DIN 58940-4

Medizinische Mikrobiologie – Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika – Teil 4: Bewertungsstufen der minimalen Hemmkonzentration; Beiblatt 1: MHK-Grenzwerte von antibakteriellen Wirkstoffen

DIN 58940-8

Medizinische Mikrobiologie – Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika – Teil 8: Mikrodilution – Allgemeine methodenspezifische Anforderungen

DIN 58959-3

Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie – Teil 3: Anforderungen an Untersuchungsauftrag und Befundbericht

DIN 58959-16

Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie – Teil 16: Anforderungen an den Einsatz von Kontrollstämmen bei der Empfindlichkeitsprüfung von speziellen Bakterien

Supplement 1 to DIN 58940-4

Medical microbiology – Methods for the susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents – Part 4: Evaluation categories of minimum inhibition concentrations; Supplement 1: MIC limit values of antibacterial agents

DIN 58940-8

Medical microbiology – Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents – Part 8: Microdilution – General method-specific requirements

DIN 58959-3

Quality management in medical microbiology – Part 3: Requirements for examination request and report

DIN 58959-16

Quality management in medical microbiology – Part 16: Requirements for the use of control strains for the susceptibility testing of special bacteria

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die Begriffe nach DIN 58940-1 sowie folgende:

Anspruchsvolle Bakterien

Bakterielle Krankheitserreger, die zur Anzucht in Kulturmedien wachstumsfördernde Zusätze benötigen, da sie in Standardkulturmedien ohne Zusätze kein ausreichendes oder stark verzögertes Wachstum zeigen.

4 Grundlage der Methode

Bouillon-Dilutionsmethode, durchgeführt als Mikrodilution auf der Basis der allgemeinen methodenspezifischen Anforderungen nach DIN 58940-8 im Reihenverdünnungstest der zu prüfenden Wirkstoffe nach Abschnitt 9 mit den für die Empfindlichkeitsprüfung von anspruchsvollen Bakterien geeigneten Kulturmedien nach Abschnitt 7.

5 Bezeichnung

Bezeichnung der methodenspezifischen Anforderungen an die Empfindlichkeitsprüfung von anspruchsvollen Bakterien gegen Antibiotika mit der Mikrodilution (82):

Mikrodilution DIN 58940-82

6 Untersuchungslaboratorium und spezielle Ausrüstung

Es gelten die Anforderungen nach DIN 58940-8 und folgende:

Ist für die Bebrütung eine CO₂-angereicherte Atmosphäre erforderlich, sind Behältnisse zu verwenden, die eine CO₂-Konzentration von 4 % bis 7 % sicherstellen.

7 Kulturmedien

Nach DIN 58940-8.

7.1 Kulturmedium für die Vorkultur

Für die Anzucht der isolierten Erreger (anspruchsvollen Bakterien) sind als Vorkulturmedien die für die jeweiligen Spezies geeigneten Kulturmedien zu verwenden.

3 Definitions

For the purposes of this standard the definitions according to DIN 58940-1 apply as well as the following:

Fastidious bacteria

Bacterial pathogens which need for their growth culture media with growth-promoting supplements, as they do not show sufficient growth in standard culture media without supplement or whose growth is considerably delayed.

4 Principle of method

Broth dilution method carried out as microdilution on the basis of the general method-specific requirements according to DIN 58940-8 as serial dilution test of the antimicrobial agents to be tested according to clause 9 by means of culture media according to clause 7 which are appropriate for the susceptibility testing of fastidious bacteria.

5 Designation

Designation of the method-specific requirements for the susceptibility testing of fastidious bacteria against antimicrobial agents with the aid of microdilution (82):

Microdilution DIN 58940-82

6 Test laboratory and special equipment

The requirements according to DIN 58940-8 apply and the following:

In case a CO₂-enriched atmosphere is necessary for incubation, containers shall be used that ensure a CO₂-concentration between 4 % and 7 %.

7 Culture media

According to DIN 58940-8.

7.1 Culture medium for the starting culture

For the growth of isolated pathogens (fastidious bacteria) appropriate culture media have to be used for the respective species as starting culture.

Tabelle 1 — Kontrollstämme zur Empfindlichkeitsprüfung von anspruchsvollen Bakterien mit der Mikrodilution
Table 1 — Control strains for the susceptibility testing of fastidious bacteria by means of microdilution

Anspruchsvolle Bakterien Fastidious bacteria	Kontrollstämme Control strains	
	Referenzstämme aus Stammsammlung Reference strain from culture collection	
	ATCC ¹⁾ Nr / No.	DSMZ ²⁾ Nr / No.
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247	DSM 9999
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49766	DSM 11970
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Pen ⁱ ³⁾	ATCC 49619	DSM 11967
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Pen ^r ⁴⁾	—	DSM 11865
<i>Moraxella catarrhalis</i>	ATCC 43617	DSM 11994
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 49226	DSM 9189
¹⁾ ATCC American Type Culture Collection, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA, www.atcc.org ²⁾ DSMZ Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1 b, 38124 Braunschweig, Germany, www.dsmz.de ³⁾ Pen ⁱ = intermediär gegenüber Penicillin Pen ⁱ = intermediate against penicillin ⁴⁾ Pen ^r = resistent gegenüber Penicillin Pen ^r = resistant against penicillin		

7.2 Kulturmedium für die Empfindlichkeitsprüfung

Als Kulturmedium für die Empfindlichkeitsprüfung dient Mueller-Hinton-Bouillon¹⁾, der 2 % lysiertes Pferdeblut und 15 µg/ml Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (NAD) sowie 5 mg/ml Hefeextrakt als Supplement hinzugefügt werden oder ein vergleichbares Kulturmedium, das mit den nach Abschnitt 8 festgelegten Kontrollstämmen übereinstimmende MHK-Werte liefert.

8 Kontrollstämme

Es gelten die Anforderungen nach DIN 58940-8 und folgende:

Zur Überprüfung der Methode sind Kontrollstämme aus Tabelle 1, entsprechend den Festlegungen nach 10.2, mitzuführen.

9 Wirkstoffe

Nach DIN 58940.

10 Durchführung der Empfindlichkeitsprüfung

10.1 Identifizierung der zu testenden Mikroorganismen

Nach DIN 58940-8.

7.2 Culture medium for the susceptibility testing

Mueller-Hinton broth¹⁾ supplemented with 2 % lytic horse blood and 15 µg/ml nicotinic acid-amide adenine-dinucleotide (NAD) as well as with 5 mg/ml yeast extract or a comparable culture medium, which achieves corresponding MIC values with the control strains as defined under clause 8, serves as culture medium for the susceptibility testing.

8 Control strains

The requirements according to DIN 58940-8 apply and the following:

According to the provisions of 10.2, parallel runs with control strains from table 1 have to be conducted for the review of the method.

9 Antimicrobial agents

According to DIN 58940-8.

10 Performance of susceptibility testing

10.1 Identification of the micro-organisms to be tested

According to DIN 58940-8.

¹⁾ Über Bezugsquellen gibt Auskunft: Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin.

¹⁾ Information on the suppliers by Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin.