

Medizinische Mikrobiologie
**Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern
 gegen Chemotherapeutika**
 Teil 84: Mikrodilution
 Spezielle Anforderungen an die Testung von Pilzen gegen Antimykotika

DIN
58940-84

ICS 07.100.10

Medical microbiology — Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents — Part 84: Microdilution — Special requirements for testing of fungi against antifungal agents

Microbiologie médicale — Contrôle de la sensibilité des agents pathogènes microbiens aux agents chimiothérapeutiques — Partie 84: Microdilution — Conditions spécifiques pour l'antibiogramme des champignons vis-à-vis les fongicides

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

Vorwort

Diese Norm wurde vom Unterausschuss UA 4 „Empfindlichkeitsprüfung von Pilzen“ des Arbeitsausschusses E 10 „Chemotherapeutische Untersuchungsmethoden“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. in Zusammenarbeit mit der Deutschsprachigen Gesellschaft für Mykologie (DMyKG) erarbeitet.

Die Anforderungen an die Empfindlichkeitsprüfung von Pilzen gegen Antimykotika mit der Mikrodilution bauen auf den allgemeinen methodenspezifischen Anforderungen nach DIN 58940-8 auf; Teil 8 und Teil 84 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)

Fortsetzung Seite 2 bis 13

Foreword

This standard was elaborated in cooperation with the Deutschsprachige Gesellschaft für Mykologie (DMyKG) of the subcommittee UA 4 “Susceptibility testing of fungi” 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 fungi against antifungal agents by means of microdilution are based on the general method-specific requirements according to DIN 58940-8; part 8 and part 84 of the standard 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)

Continued on pages 2 to 13

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

- Teil 20: Codierung von antimikrobiellen Wirkstoffen
- 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

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt zusammen mit der methodenspezifischen Basisnorm nach DIN 58940-8 als Grundlage für die In-vitro-Empfindlichkeitsprüfung von Pilzen gegenüber Antimykotika mit der Bouillon-Dilutionsmethode in Behältnissen für die Mikrodilution.

Diese Norm legt die grundlegenden Anforderungen an eine effektive Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Pilzen mittels der Mikrodilution fest mit dem Ziel, reproduzierbare sowie inter- und intralabor-vergleichbare Ergebnisse sicherzustellen.

Diese Methode ist zurzeit nur als Referenzmethode für die Testung von Sprosspilzen festgelegt, ist jedoch mit entsprechenden Modifikationen auch für die Testung anderer Pilze geeignet.

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 nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

DIN 58940-1

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

DIN 58940-8

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

DIN 58940-20

Medizinische Mikrobiologie — Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika — Teil 20: Codierung von antimikrobiellen Wirkstoffen

DIN 58959-19

Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 19: Anforderungen an den Einsatz von Kontrollstämmen bei der Untersuchung von Pilzen

Beiblatt 1 zu DIN 58959-19

Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 19: Anforderungen an den Einsatz von Kontrollstämmen bei der Untersuchung von Pilzen; Kontrollstämme für häufig verwendete Kulturmedien und Reagenzien

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die Begriffe nach DIN 58940-1.

- Part 20: Codes for antimicrobial agents
- Part 81: Microdilution — Special requirements for testing of non-fastidious bacteria
- 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

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 fungi against antifungal agents by means of the broth dilution method in containers for microdilution.

This standard covers the basic requirements for an effective determination of the minimum inhibition concentration (MIC) of fungi by means of microdilution in order to ensure reproducible as well as comparable (inter- and intra-laboratory) results.

This method actually only serves as reference method for the testing of yeasts, but applies, however, when being modified adequately for the testing of other fungi too.

2 Normative references

This standard incorporates by dated or undated reference, 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 58940-8

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

DIN 58940-20

Medical microbiology — Susceptibility testing of microbial agents to antimicrobial agents — Part 20: Codes for antimicrobial agents

DIN 58959-19

Quality management in medical microbiology — Part 19: Requirements for the use of control strains for the testing of fungi

Supplement 1 to DIN 58959-19

Quality management in medical microbiology — Part 19: Requirements for the use of control strains for the testing of fungi; control strains for often used culture media and reagents

3 Definitions

For the purposes of this standard the definitions according to DIN 58940-1 apply.

4 Grundlage der Methode

Bouillon-Dilutionsmethode, durchgeführt als Mikrodilution auf der Basis der allgemeinen methoden-spezifischen Anforderungen nach DIN 58940-8 im Reihenverdünnungstest der zu prüfenden Wirkstoffe (Antimykotika) nach Abschnitt 9 mit den für die Empfindlichkeitsprüfung von Pilzen geeigneten Kulturmedien nach Abschnitt 7

5 Bezeichnung

Bezeichnung der methodenspezifischen Anforderungen an die Empfindlichkeitsprüfung von Pilzen gegen Antimykotika mit der Mikrodilution (84):

Mikrodilution DIN 58940-84

6 Untersuchungslaboratorium und spezielle Ausrüstung

Nach DIN 58940-8.

7 Kulturmedien

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

7.1 Kulturmedium für die Vorkultur

Für die Anzucht der isolierten Erreger (Pilze) soll als Vorkulturmedium Sabouraud-2%-Glucose oder Kimmig-Medium (Agar) verwendet werden. Für Pilze, die auf diesen Kulturmedien nicht oder nur sehr verzögert wachsen, sind die entsprechenden pilzspezifischen Kulturmedien einzusetzen.

7.2 Kulturmedium für die Empfindlichkeitsprüfung

Als Kulturmedium für die Empfindlichkeitsprüfung von Pilzen dient supplementiertes HR-Medium [13] oder ein ähnliches, definiertes, peptonfreies Kulturmedium, das mit den vorgeschriebenen Kontrollstämmen übereinstimmende Ergebnisse für die einzelnen Testsubstanzen liefert.

Die Kulturmedien müssen einen pH-Wert im Bereich von 6,8 bis 7,2 aufweisen.

8 Kontrollstämmе

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

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

9 Wirkstoffe

Nach DIN 58940-8.

10 Durchführung der Empfindlichkeitsprüfung

10.1 Identifizierung der zu testenden Mikroorganismen

Nach DIN 58940-8.

4 Principles 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 selected antifungal agents according to clause 9 by means of the culture media according to clause 7 which are appropriate for the susceptibility testing of fungi.

5 Designation

Designation of the method-specific requirements for the susceptibility testing of fungi against antifungal agents by means of microdilution (84):

Microdilution DIN 58940-84

6 Test laboratory and special equipment

According to DIN 58940-8.

7 Culture media

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

7.1 Culture medium for the starting culture

For the growth of isolated pathogens (fungi) Sabouraud-2%-glucose or Kimmig medium (agar) should be used as starting culture. For fungi which do not show any or only a very delayed growth on these culture media, appropriate fungi-specific culture media should be used.

7.2 Culture media for susceptibility testing

Supplemented HR medium [13] or a similar defined peptone-free culture medium serves as culture medium for the susceptibility testing of fungi, achieving corresponding results for the individual test substances with the defined control strains.

The pH value of the culture media shall range between 6,8 and 7,2.

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 Antifungal agents

According to DIN 58940-8.

10 Susceptibility tests

10.1 Identification of the microorganisms to be tested

According to DIN 58940-8.

Tabelle 1 — Kontrollstämme zur Empfindlichkeitsprüfung von Pilzen gegen Antimykotika
Table 1 — Control strains for the susceptibility testing of fungi against antifungal agents

Pilze Fungi	Kontrollstämme Control strains	
	Referenzstämme aus Stammsammlung Reference strain from culture collection	
	ATCC ¹⁾ Nr / No.	DSMZ ²⁾ Nr / No.
<i>Candida albicans</i>	ATCC 76615	DSM 11943
<i>Candida albicans</i>		DSM 11949
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	DSM 11225
<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433	DSM 11948
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 90030	DSM 11226
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	DSM 5784
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 90018	DSM 11224
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 750	DSM 11953
<i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>Candida krusei</i>)	ATCC 6258	DSM 6128
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (<i>Candida kefyr</i>)	—	DSM 11954
<i>Cryptococcus neoformans</i> (<i>Filobasidiella</i>)	ATCC 90112	DSM 11959
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763	DSM 1333
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 GmbH, Mascheroder Weg 1 b, 38124 Braunschweig, www.dsmz.de		

10.2 Mitführen von Kontrollstämmen

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

Es sind die Anforderungen an das Mitführen von Kontrollstämmen bei der Untersuchung von Pilzen nach DIN 58959-19 zu erfüllen.

Hinweise über die zu erwartenden Reaktionen der Kontrollstämme für häufig verwendete Kulturmedien und Reagenzien sind im Beiblatt 1 zu DIN 58959-19 angegeben.

10.2 Parallel testing of control strains

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

The requirements for the parallel running of control strains for the susceptibility testing of fungi according to DIN 58959-19 have to be met.

Comments about expected reactions of control strains for often used culture media and reagents are given in Supplement 1 to DIN 58959-19.

10.3 Herstellung der Wirkstoffverdünnungen (Verdünnungsreihe) und Testvolumen

Nach DIN 58940-8.

10.3 Preparation of the antifungal agent dilution (serial dilution) and test volume

According to DIN 58940-8.

10.4 Inokulum

10.4.1 Herstellung des Inokulums

10.4.1.1 Inokulum mit Kolonien von festen Kulturen

Das Inokulum ist aus einer frischen Reinkultur (Vorkulturmedium nach 7.1):

10.4 Inoculum

10.4.1 Preparation of inoculum

10.4.1.1 Inoculum with colonies from solid cultures

The inoculum should be prepared from a fresh pure culture (starting culture according to 7.1):