

Medizinische Mikrobiologie
Tuberkulosedagnostik

Empfindlichkeitsprüfungen von Tuberkulosebakterien
 gegen Chemotherapeutika

DIN
58 943
 Teil 8

Medical microbiology; diagnosis of tuberculosis; methods for the determination of susceptibility of tubercle bacilli to chemotherapeutic agents

Inhalt

	Seite		Seite
1 Anwendungsbereich und Zweck	2	7 Durchführung	4
2 Begriffe	2	7.1 Qualitätsprüfung	4
2.1 Grundbegriffe	2	7.2 Keimeinsaat	5
2.2 Untersuchungsgut	2	7.2.1 Teststamm	5
2.3 Resistenz	2	7.2.2 Bakteriensuspension	5
2.4 Kritische Konzentration	2	7.2.2.1 Zusammensetzung und Herstellung	5
2.5 Kritische Proportion	2	7.2.2.2 Verdünnungsstufen	5
2.6 Wachstumskontrolle	2	7.2.3 Referenzsuspension	5
3 Grundlage der Methode	2	7.2.3.1 Bariumsulfatsuspension	5
4 Bezeichnung	2	7.2.3.2 Latexsuspension	5
5 Untersuchungslaboratorium	2	7.2.4 Beimpfung	5
6 Kulturmedium	2	7.2.4.1 Beimpfung der Testmedien	5
6.1 Zusammensetzung des Basiskulturmediums	2	7.2.4.2 Beimpfung der chemotherapeutikafreien Kulturmedien (Wachstumskontrollen)	5
6.1.1 Salzlösung	2	7.2.5 Bebrütung	5
6.1.2 Malachitgrünlösung	3	7.3 Ablesung	6
6.1.3 Kartoffelmehlemulsion	3	8 Beurteilung	6
6.1.4 Eimasse	3	8.1 Beurteilung bei Ablesung nach 4 Wochen Bebrütung	6
6.2 Herstellung des Basiskulturmediums	3	8.2 Beurteilung bei Ablesung nach Bebrütung von mehr als 4 Wochen	6
6.3 Chemotherapeutikallösungen	3	9 Befundmitteilung	6
6.3.1 Lösungsmittel	3	Zitierte Normen und andere Unterlagen	7
6.3.2 Chemotherapeutika-Konzentrationen	3	Weitere Normen	8
6.3.3 Herstellung der Chemotherapeutikallösungen	3	Erläuterungen	8
6.4 Herstellung der chemotherapeutikahaltigen Kulturmedien (Testmedien)	4		
6.5 Lagerung des fertigen Kulturmediums	4		

Fortsetzung Seite 2 bis 8

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm gilt für die Empfindlichkeitsprüfung von Tuberkulosebakterien der Arten *Mycobacterium tuberculosis* einschließlich geographischer Varianten, *Mycobacterium bovis* und BCG-Stämmen gegen Chemotherapeutika.

Diese Empfindlichkeitsprüfung ist nach DIN 58 957 Teil 1 eine mykobakteriologische Untersuchung der Risiko-Stufe C und im medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium mindestens Typ 3 nach DIN 58 956 Teil 1 mit Schleusensystem entsprechend DIN 58 957 Teil 1 durchzuführen.

Zweck dieser Festlegungen ist es, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Empfindlichkeitsprüfungen sicherzustellen.

Für andere Mykobakterien gilt diese Norm nicht, da nach den bisherigen Erfahrungen weder Reproduzierbarkeit noch klinische Relevanz ausreichend gesichert sind.

2 Begriffe

2.1 Grundbegriffe

Nach DIN 58 940 Teil 1, DIN 58 942 Teil 2, DIN 58 943 Teil 3, DIN 58 956 Teil 1 und DIN 58 957 Teil 1.

2.2 Untersuchungsgut

Das Untersuchungsgut nach dieser Norm ist eine Rein- kultur von Tuberkulosebakterien (Teststamm) in der Phase des aktiven Wachstums.

2.3 Resistenz

Resistenz im Sinne dieser Norm ist nach klinisch kontrollierten Studien anzunehmen, wenn mehr als ein bestimmter Anteil des Inokulums (kritische Proportion) auf Kulturmedien mit einer bestimmten Konzentration (kritische Konzentration) des Chemotherapeutikums wächst.

2.4 Kritische Konzentration

Die kritische Konzentration (siehe Tabelle 4) ist die niedrigste Konzentration eines Chemotherapeutikums im Kulturmedium, bei der das Wachstum von Tuberkulosebakterien eine Resistenz von klinischer Bedeutung anzeigt.

2.5 Kritische Proportion

Die kritische Proportion ist der prozentuale Anteil der Bakterien in der Einsaat, deren Wachstum auf den Kulturmedien mit der kritischen Konzentration bei Tuberkulosebakterien klinische Resistenz bedeutet.

2.6 Wachstumskontrolle

Die Wachstumskontrolle auf Kulturmedien ohne Chemotherapeutikumzusatz zeigt das unbehinderte Wachstum der Bakterien.

3 Grundlage der Methode

Reihenverdünnungstest auf Löwenstein-Jensen-Kulturmedium nach Abschnitt 6, ausgewertet nach einer Modifikation der Proportionsmethode [1], [2] und [3].

4 Bezeichnung

Bezeichnung der Methode zur Empfindlichkeitsprüfung von Tuberkulosebakterien gegen Chemotherapeutika (E):

Methode DIN 58 943 – E

5 Untersuchungslaboratorium

Auf die strenge Einhaltung aller nachstehenden Schutz- und Sicherheitsmaßnahmen ist besonders zu achten, weil mit Suspensionen infektiöser Bakterien gearbeitet wird. Die Empfindlichkeitsprüfung ist in einem medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium mindestens Typ 3 nach DIN 58 956 Teil 1 mit Schleusensystem entsprechend DIN 58 957 Teil 1 durchzuführen, unter Einhaltung der sicherheitstechnischen Anforderungen an Untersuchungen der Risiko-Stufe C nach DIN 58 957 Teil 1.

Es muß sichergestellt werden, daß die nachstehenden Vorschriften und Regeln in der jeweils gültigen Fassung, beachtet werden:

- Unfallverhütungsvorschriften und Merkblätter des Hauptverbandes der gewerblichen Berufsgenossenschaften [5] bis [7]
- Richtlinien des Bundesgesundheitsamtes (BGA) über Desinfektionsmaßnahmen bei Tuberkulose [8]
- Empfehlungen des Deutschen Zentralkomitees zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK) [9] und [10]
- die Liste der vom Bundesgesundheitsamt (BGA) geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren [11].

6 Kulturmedium

Zur Prüfung der Empfindlichkeit von Tuberkulosebakterien gegen Chemotherapeutika wird ein modifiziertes Kulturmedium nach Löwenstein-Jensen verwendet, dem die zu prüfenden Chemotherapeutika zugesetzt werden.

6.1 Zusammensetzung des Basiskulturmediums

6.1.1 Salzlösung

Anmerkung: Das Endvolumen der Salzlösung ist geringer als in der Originalrezeptur, weil 9 Teile des Basiskulturmediums mit 1 Teil Chemotherapeutikumlösung vermischt werden, damit das Endvolumen der Originalrezeptur wieder erreicht wird.

Zusammensetzung:

Kaliumdihydrogenphosphat, wasserfrei (M = 136,09 g/mol) nach Ph. Eur. I ¹⁾	2,4 g
Magnesiumsulfat · 7-hydrat (M = 246,47 g/mol) nach Ph. Eur. I ¹⁾	0,24 g
tri-Magnesiumdicitrat · 14-hydrat (M = 703,33 g/mol)	0,6 g
L-Asparagin Monohydrat reinst (M = 150,14 g/mol)	3,6 g
Glyzerin 84 % bis 87 % G/G (M = 92,10 g/mol) nach Ph. Eur. I ¹⁾	12,0 ml
destilliertes Wasser	420,0 ml

¹⁾ Nach Ph. Eur. I: Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch) Band I

Herstellung:

Die festen Substanzen werden in 400 ml destilliertem Wasser gelöst.

Nach Zusatz des Glyzerins wird mit destilliertem Wasser auf 420 ml aufgefüllt.

6.1.2 Malachitgrünlösung²⁾**Zusammensetzung:**

Malachitgrün 2 g
destilliertes Wasser ad 100 ml

Herstellung:

Das Malachitgrün wird in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung kann lichtgeschützt bei Umgebungstemperatur 12 bis 28 °C vorrätig gehalten werden und muß vor Gebrauch filtriert werden, um ausgefallene Kristalle zu entfernen.

6.1.3 Kartoffelmehlemulsion**Zusammensetzung:**

Salzlösung nach Abschnitt 6.1.1 420,0 ml
Malachitgrünlösung nach Abschnitt 6.1.2 20,0 ml
Kartoffelmehl 30,0 g

Herstellung:

Zu 200 ml der Salzlösung werden 20 ml Malachitgrünlösung zugegeben, 30 g Kartoffelmehl zugesetzt und durch Rühren gleichmäßig verteilt. Der Rest der Salzlösung (220 ml) wird aufgekocht und der Kartoffelmehlemulsion hinzugefügt. Unter weiterer Erwärmung wird so lange gerührt, bis die Emulsion völlig homogen ist. Die fertige Emulsion wird 30 min bei 112 °C im Sterilisator sterilisiert.

6.1.4 Eimasse**Zusammensetzung:**

1000 ml Eimasse aus 20 bis 25 frischen Eiern (nicht älter als 1 Woche; das Gewicht der einzelnen Eier soll 40 g nicht unterschreiten, damit das richtige Verhältnis zwischen Eigelb und Eiweiß sichergestellt ist).

Herstellung:

Die Eier werden mechanisch gereinigt, in 70 % Ethanol (vergällt) getaucht und nach dem Herausnehmen abgeflammt. Danach werden sie aufgeschlagen, in ein steriles Gefäß entleert und homogenisiert.

6.2 Herstellung des Basiskulturmediums

1000 ml Eimasse nach Abschnitt 6.1.4 werden mit 440 ml Kartoffelmehlemulsion nach Abschnitt 6.1.3 gemischt. Auf Vermeidung von Schaumbildung ist zu achten.

²⁾ Über die Bezugsquellen gibt Auskunft: Normenausschuß Medizin im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Burggrafenstraße 4–10, 1000 Berlin 30.

6.3 Chemotherapeutikallösungen**6.3.1 Lösungsmittel****Tabelle 1. Chemotherapeutika und Lösungsmittel**

Chemotherapeutikum		Lösungs- mittel	weitere Ver- dünnung mit
Benennung	Kurz- zeichen		
Isoniazid	INH	dest. Wasser	dest. Wasser
Dihydrostreptomycin	SM		
Ethambutol	EMB		
Rifampicin 1)	RMP		
Protionamid	PTH	DMF 2)	
p-Aminosalicylsäure	PAS	dest. Wasser	
Capreomycin	CM		
Pyrazinamid 3)	PZA		
Cycloserin	CS		

1) Als Na-Salz wasserlöslich, sonst Dimethylformamid.

2) Dimethylformamid

3) Es ist zur Zeit nicht möglich, ein allgemein anerkanntes Verfahren zur Testung der Empfindlichkeit gegen Pyrazinamid zu empfehlen, siehe hierzu Erläuterungen.

6.3.2 Chemotherapeutika-Konzentrationen

Die Konzentrationen der Chemotherapeutika für die Empfindlichkeitsprüfung der Patientenstämme sind in Tabelle 2 ohne Klammern angegeben.

6.3.3 Herstellung der Chemotherapeutikallösungen

Die zu prüfenden Chemotherapeutika sind entsprechend den Angaben der Hersteller aufzubewahren. Berechnungsgrundlage für die Einwaage ist die von den Herstellern deklarierte Aktivität (Beispiel: Streptomycin-Aktivität in Dihydrostreptomycinsulfat „Charge Nr xy“ = 786 mg/g). Aus Gründen der Zuverlässigkeit sollten alle Volumina so gewählt werden, daß mit Vollpipetten und Meßkolben gearbeitet werden kann.