

DIN 58943-8**DIN**

ICS 07.100.10

Ersatz für
DIN 58943-8:1996-10

**Medizinische Mikrobiologie –
Tuberkulosedagnostik –
Teil 8: Empfindlichkeitsprüfung von Tuberkulosebakterien gegen
Chemotherapeutika;
Text Deutsch und Englisch**

Medical microbiology –
Diagnosis of tuberculosis –
Part 8: Methods for the determination of susceptibility of tubercle bacilli to
chemotherapeutic agents;
Text in German and English

Microbiologie médicale –
Diagnose de tuberculose –
Partie 8: Méthodes pour le contrôle de la sensibilité de mycobactéries aux
agents chimiothérapeutiques;
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 35 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
Einleitung.....	8
1 Anwendungsbereich	10
2 Normative Verweisungen.....	10
3 Begriffe	10
4 Anforderungen an die biologische Sicherheit.....	12
5 Grundlage der Methode	14
5.1 Allgemeines.....	14
5.2 Auswahl der zu prüfenden Chemotherapeutika.....	14
6 Kulturmedium.....	14
6.1 Allgemeines.....	14
6.2 Prüfsubstanzlösungen.....	14
6.2.1 Prüfsubstanzen und Lösungsmittel.....	14
6.2.2 Herstellung der Prüfsubstanzlösungen.....	14
6.3 Herstellung der prüfsubstanzhaltigen Kulturmedien.....	16
6.4 Lagerung der Kulturmedien.....	16
7 Durchführung.....	18
7.1 Teststamm	18
7.2 Herstellung der Testsuspensionen.....	18
7.2.1 Ausgangssuspension	18
7.2.2 Testsuspensionen	18
7.2.3 Referenzsuspension.....	18
7.3 Beimpfung der Kulturmedien	20
7.3.1 Allgemeines.....	20
7.3.2 Beimpfung der prüfsubstanzhaltigen Kulturmedien.....	20
7.3.3 Beimpfung der prüfsubstanzfreien Kulturmedien (Wachstumskontrollen)	20
7.4 Bebrütung.....	20
7.5 Ablesung.....	20
8 Beurteilung	20
9 Befundmitteilung	22
10 Qualitätsprüfung der Kulturmedien	22
Anhang A (informativ) Empfindlichkeitsprüfung von Fluorchinolen.....	24
Anhang B (informativ) Orientierende Beurteilung bei Nichterfüllung von Qualitätsanforderungen	26
Literaturhinweise	34

Contents

	Page
Foreword	5
Introduction.....	9
1 Scope.....	11
2 Normative references.....	11
3 Terms and definitions	11
4 Biological safety requirements	13
5 Basis of the method	15
5.1 General	15
5.2 Selection of the chemotherapeutic agents to be tested.....	15
6 Culture medium	15
6.1 General	15
6.2 Test substance solutions	15
6.2.1 Test substances and solvents	15
6.2.2 Preparation of the test substance solutions	15
6.3 Preparation of the test substance-containing culture media	17
6.4 Storage of the culture media.....	17
7 Procedure	19
7.1 Test strain	19
7.2 Preparation of the test suspensions	19
7.2.1 Initial suspension	19
7.2.2 Test suspensions	19
7.2.3 Reference suspension	19
7.3 Inoculation of the culture media	21
7.3.1 General	21
7.3.2 Inoculation of the test substance-containing culture media	21
7.3.3 Inoculation of the test substance-free culture media (growth controls).....	21
7.4 Incubation	21
7.5 Reading.....	21
8 Assessment	21
9 Reporting of results	23
10 Quality testing of culture media.....	23
Annex A (informative) Testing of the drug susceptibility to fluoroquinolones	25
Annex B (informative) Orienting assessment of the drug susceptibility testing for the cases in which the quality requirements are not fulfilled	27
Bibliography.....	35

Vorwort

Der Norm-Entwurf wurde vom Arbeitsausschuss NA 063-05-03 AA „Tuberkulose- und Mykobakterien-diagnostik“ des Normenausschusses Medizin im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Mykobakterien (AKM) erarbeitet. Der AKM ist ein Expertengremium aus dem deutschsprachigen Raum, das u. a. Studien zur mykobakteriologischen Diagnostik koordiniert.

- DIN 58943, *Medizinische Mikrobiologie — Tuberkulosedagnostik* besteht aus
- *Beiblatt1: Leitfaden für einen differenzierten Einsatz der Nachweismethoden*
- *Teil 3: Kulturelle Methoden zum Nachweis von Mykobakterien*
- *Teil 4: Primärproben zur Tuberkulose- und Mykobakteriosediagnostik — Qualitative und quantitative Anforderungen, Gewinnung, Transport und Aufbewahrung*
- *Teil 7: Modifiziertes Löwenstein-Jensen-Kulturmedium zur Anzucht von Mykobakterien*
- *Teil 8: Empfindlichkeitsprüfung von Tuberkulosebakterien gegen Chemotherapeutika*
- *Teil 9: Phänotypische Differenzierung von Tuberkulosebakterien*
- *Teil 32: Mikroskopische Methoden zum Nachweis von Mykobakterien*
- *Teil 40: Bewertungskriterien für kulturelle Schnellverfahren zum Nachweis von Mykobakterien*

Änderungen

Gegenüber der Ausgabe DIN 58943-8:1996-10 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Aktualisierung der Anforderungen an die biologische Sicherheit;
- b) Hinweis auf Haltbarkeit hergestellter Kulturmedien gemäß WHO und IUATLD;
- c) Wahlmöglichkeit zwischen zwei verschiedenen kritischen Konzentrationen (und den entsprechenden zusätzlichen Testkonzentrationen) von Rifampicin;
- d) Veränderung der kritischen Konzentration von Ethambutol;
- e) Veränderung der zusätzlichen Testkonzentration von Nikotinsäureamid;
- f) Forderung nach Dokumentation der Testergebnisse bei der Untersuchung der zusätzlich zur kritischen Konzentration untersuchten Prüfsubstanz-Konzentration;
- g) Vereinfachung des Ableseschemas zur Beurteilung des Wachstums der Tuberkulosebakterien;
- h) Veränderung des *MHK*-Wertes von Rifampicin für den Kontrollstamm *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv;
- i) Präzisierung der Untersuchungen im Rahmen der Qualitätsprüfung;

Foreword

This draft standard has been prepared by the *Arbeitsausschuss NA 063-05-03 AA "Tuberkulose- und Mykobakteriendiagnostik"* (Diagnosis of Tuberculosis Working Committee) of *Normenausschuss Medizin* (Medical Standards Committee) in the *DIN Deutsches Institut für Normung e.V.* (German Institute for Standardization) in cooperation with the *Arbeitskreis Mykobakterien (AKM)* (Mycobacteria Working Group). The AKM is a panel of experts from the German-speaking area coordinating, among other things, studies on mycobacteriological diagnostics.

DIN 58943, *Medical microbiology — Diagnosis of tuberculosis* consists of the following parts

- *Supplement 1: Guidance for the specialized use of methods of detection*
- *Part 3: Detection of mycobacteria by culture methods*
- *Part 4: Primary samples for the diagnostics of tuberculosis and mycobacteria — Qualitative and quantitative requirements, extraction, transport and storage*
- *Part 7: Modified Löwenstein-Jensen medium for the growth of mycobacteria*
- *Part 8: Methods for the determination of susceptibility of tubercle bacilli to chemotherapeutic agents*
- *Part 9: Phenotypic differentiation of tubercle bacilli*
- *Part 32: Detection of mycobacteria by microscopic methods*
- *Part 40: Evaluation criteria for fast culture procedures for the detection of mycobacteria*

Amendments

Compared with the DIN 58943-8:1996-10 edition, the following amendments have been made:

- a) updating of the requirements for biological safety;
- b) information on the shelf-life of the prepared culture media, as stated by the WHO and the IUATLD;
- c) option to choose between two different critical concentrations (and the respective additional test concentrations) of rifampicin;
- d) modification of the critical concentration of ethambutol;
- e) modification of the additional test concentration of nicotinamide;
- f) demand for a documentation of the test results for the test substance concentration tested in addition to the critical concentration;
- g) simplification of the reading scheme for assessing the growth of tubercle bacilli;
- h) modification of the rifampicin MIC value for the control strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv;
- i) more precise description of the examinations carried out within the framework of quality testing;

- j) Wegfall von Anhang A (normativ) „Alternative Methoden der Empfindlichkeitsprüfung zur Referenzmethode“;
- k) Einfügung von Anhang A (informativ) „Empfindlichkeitsprüfung von Fluorchinolonen“;
- l) Einfügung von Anhang B (informativ) „Orientierenden Beurteilung der Empfindlichkeitsprüfung bei Nichterfüllung von Qualitätsanforderungen“;
- m) redaktionelle Überarbeitung.

Frühere Ausgaben

DIN 58943-8: 1986-01, 1996-10

- j) deletion of Annex A (normative) “Methods for the determination of susceptibility alternative to the reference method”;
- k) introduction of Annex A (informative) “Testing of the drug susceptibility to fluoroquinolones”;
- l) introduction of Annex B (informative) “Orienting assessment of the drug susceptibility testing for the cases in which the quality requirements are not fulfilled”;
- m) editorial revision.

Previous editions

DIN 58943-8: 1986-01, 1996-10

Einleitung

Die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung von Tuberkulosebakterien gegen Chemotherapeutika sind die Grundlage für eine rationale Therapie. Außerdem werden von der Beurteilung der Häufigkeit von Resistenzen bei Tuberkulosebakterien in einer Region Empfehlungen für die kalkulierte Therapie abgeleitet. Durch die vorliegende Norm soll die Aussagekraft der Empfindlichkeitstestung, also deren Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit, sichergestellt und damit eine Grundlage für internationale Vergleichbarkeit gegeben werden.

Die in der Norm beschriebene Methode basiert auf der Proportionsmethode von Canetti et al. (1969), die auf der Grundlage von sowohl klinisch-therapeutischen als auch mykobakteriologischen Daten entwickelt wurde. Diese Methode ist folglich für die Validierung von neu entwickelten Testmethoden von großer Bedeutung und sollte bei der Beurteilung von Stämmen herangezogen werden, bei denen mit anderen Methoden widersprüchliche Ergebnisse bei der Bewertung der Empfindlichkeit erzielt werden.

Die vorliegende Norm enthält keine Angaben zum Testen von neueren Chemotherapeutika, weil dazu mit dem hier verwendeten Kulturmedium keine Publikationen vorliegen. Publikationen mit Löwenstein-Jensen-Medium, dessen Rezeptur von dem hier verwendeten abweicht, und unveröffentlichte Erfahrungen aus dem AKM zeigen jedoch, dass es möglich ist, entsprechend der in der vorliegenden Norm beschriebenen Methode Tuberkulosebakterien hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber neueren Chemotherapeutika zu charakterisieren (siehe Anhang A (informativ)).

Eine Empfindlichkeitstestung ist immer dann angezeigt, wenn bei einem Patienten erstmalig Tuberkulosebakterien angezüchtet werden, oder wenn Grund zur Annahme besteht, dass der aktuelle Erregerstamm im Vergleich zum ursprünglich untersuchten Stamm ein verändertes Empfindlichkeitsmuster aufweisen könnte.

Introduction

The results of determining the susceptibility of tubercle bacilli to chemotherapeutic agents form the basis of a rational antituberculous therapy. Furthermore, from assessing the frequency of drug resistances of tubercle bacilli in a certain region, recommendations for a calculated therapy are derived. This standard is intended to ensure the informative value of the methods for drug susceptibility testing, i. e. their sensitivity, specificity and reproducibility, thus providing a basis for comparability on an international level.

The method described in the standard is based on the proportion method described by Canetti et al. (1969) which has been developed on the basis of both clinical-therapeutical and mycobacteriological data. Consequently, this method is of major significance for validating newly developed test methods and should be applied for assessing strains which give contradictory susceptibility results when different evaluation methods are used.

This standard does not contain information on testing newer chemotherapeutic agents, as no pertinent publications exist for the culture medium used here. Publications on test series using the Löwenstein-Jensen medium, of which the formulation differs from that of the medium used here, as well as unpublished experiences of AKM members have shown, however, that as far as their susceptibility to newer chemotherapeutic agents is concerned it is possible to characterize tubercle bacilli in accordance with the method described in this standard (see Annex A (informative)).

Susceptibility testing is advisable whenever tubercle bacilli have been cultured for the first time from a certain patient, or when there is reason to suspect that, compared with the isolate originally examined, the current isolate could exhibit a modified pattern of susceptibility.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für die Empfindlichkeitsprüfung von Tuberkulosebakterien, die auf dem verwendeten Kulturmedium ein zur Bewertung ausreichendes Wachstum haben.

Diese Norm legt eine Methode fest, die als Referenzmethode gilt, an der andere Methoden zur Empfindlichkeitstestung von Tuberkulosebakterien zu justieren sind.

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 58943-3, *Kulturelle Methoden zum Nachweis von Mykobakterien*

DIN 58943-7, *Medizinische Mikrobiologie — Tuberkulosedagnostik — Teil 7: Modifiziertes Löwenstein-Jensen-Kulturmedium zur Anzucht von Mykobakterien*

DIN 58959-3, *Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 3: Anforderungen an Untersuchungsauftrag und Befundbericht*

DIN EN 980, *Symbole zur Kennzeichnung von Medizinprodukten*

DIN EN 12128, *Biotechnik — Laboratorien für Forschung, Entwicklung und Analyse — Sicherheitsstufen mit mikrobiologischer Laboratorien, Gefahrenbereich, Räumlichkeiten und technische Sicherheitsanforderungen*

Verordnung zur Umsetzung der EG-Richtlinien über den Schutz der Beschäftigten von gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe; Artikel 1 Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung — BioStoffV)

Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 100, Schutzmaßnahmen für gezielte Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in Laboratorien

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach DIN 58940-1, DIN 58943-3, DIN EN 980, DIN EN 12128 und die folgenden Begriffe.

3.1

Teststamm

Untersuchungsgut zur Empfindlichkeitsprüfung

ANMERKUNG Ein Teststamm ist eine Reinkultur von Tuberkulosebakterien. Sie sollte nicht länger als 5 Wochen bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ auf festen Kulturmedien nach DIN 58943-7 bebrütet worden sein

3.2

kritische Konzentration

niedrigste Konzentration einer Prüfsubstanz im Kulturmedium, bei der das Wachstum von Tuberkulosebakterien Resistenz gegen das entsprechende Chemotherapeutikum anzeigt

1 Scope

This standard applies to the determination of the drug susceptibility of tubercle bacilli whose growth on the culture medium used is sufficient for evaluation.

This standard specifies a method that is considered to be the reference method and to which other methods for the determination of the drug susceptibility of tubercle bacilli shall be adjusted.

2 Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

DIN 58940-1, *Medical microbiology — Susceptibility testing of pathogens to antimicrobial agents — Part 1: Terminology*

DIN 58943-3, *Medical microbiology — Diagnosis of tuberculosis — Part 3: Detection of mycobacteria by culture methods*

DIN 58943-7, *Medical microbiology — Diagnosis of tuberculosis — Part 7: Modified Löwenstein-Jensen medium for the growth of mycobacteria*

DIN 58959-3, *Quality management in medical microbiology — Part 3: Requirements for request and report forms*

DIN EN 980, *Graphical symbols for use in the labelling of medical devices*

DIN EN 12128, *Biotechnology — Laboratories for research, development and analysis — Containment levels of microbiology laboratories, areas of risk, localities and physical safety requirements*

Verordnung zur Umsetzung der EG-Richtlinien über den Schutz der Beschäftigten gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe; Artikel 1 Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung — BioStoffV) (German Biomaterial regulation)

Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe (Technical Rule for Biological Agents, TRBA) 100, Schutzmaßnahmen für gezielte Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in Laboratorien (Protective measures for specific and unspecific work in laboratories involving biological agents)

3 Terms and definitions

For the purposes of this document, the terms and definitions given in DIN 58940-1, DIN 58943-3, DIN EN 980, DIN EN 12128 and the following apply.

3.1

test strain

specimen used for susceptibility testing

NOTE A test strain is a pure culture of tubercle bacilli. It should not have been incubated for more than five weeks at $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ on solid culture media in accordance with DIN 58943-7.

3.2

critical concentration

lowest concentration of a test substance in the culture medium at which the growth of tubercle bacilli indicates resistance to the respective antituberculous drug