

DIN EN ISO 16256



ICS 11.100.10

**Labormedizinische Untersuchungen und In-vitro-Diagnostika-Systeme –
Referenzmethode zur Testung der In-vitro-Aktivität von antimikrobiellen
Substanzen gegen Pilze, die Infektionskrankheiten verursachen
(ISO 16256:2012);
Deutsche Fassung EN ISO 16256:2012**

Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems –
Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against yeast of
fungi involved in infectious diseases (ISO 16256:2012);
German version EN ISO 16256:2012

Essais de laboratoire clinique et systèmes de diagnostic in vitro –
Méthode de référence pour soumettre à essai l'activité in vitro des agents antimicrobiens
par rapport aux levures impliquées dans les maladies infectieuses (ISO 16256:2012);
Version allemande EN ISO 16256:2012

Gesamtumfang 25 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 16256:2012) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 212 „Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems“, dessen Sekretariat von ANSI (USA) gehalten wird, in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 140 „In-vitro-Diagnostik Medizinprodukte“ erstellt. Im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. ist im Normenausschuss Medizin (NAMed) der Arbeitsausschuss NA 063-05-10 AA „Chemotherapeutische Untersuchungsmethoden“ zuständig.

Deutsche Fassung

Labormedizinische Untersuchungen und
In-vitro-Diagnostika-Systeme —
Referenzmethode zur Testung der In-vitro-Aktivität von
antimikrobiellen Substanzen gegen Pilze, die
Infektionskrankheiten verursachen
(ISO 16256:2012)

Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test
systems —
Reference method for testing the in vitro activity of
antimicrobial agents against yeast of fungi involved in
infectious diseases
(ISO 16256:2012)

Essais de laboratoire clinique et systèmes de diagnostic in
vitro —
Méthode de référence pour soumettre à essai l'activité in
vitro des agents antimicrobiens par rapport aux levures
impliquées dans les maladies infectieuses
(ISO 16256:2012)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 30. November 2012 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN-CENELEC oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 16256:2012) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 212 „Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 140 „In-vitro-Diagnostik Medizinprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Juni 2013, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2015 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder] CENELEC sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 16256:2012 wurde vom CEN als EN ISO 16256:2012 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Inhalt

Seite

Vorwort	2
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Begriffe	5
3 Testverfahren	8
3.1 Allgemeines	8
3.2 Medium	8
3.3 Antimykotika	9
3.4 Lagerung von Mikrotiterplatten	12
3.5 Vorbereitung des Inokulums — Allgemeines	12
3.6 Beimpfen der Mikrotiterplatten	13
3.7 Bebrüten der Mikrotiterplatten	13
3.8 Ablesen der MHK-Ergebnisse	14
3.9 Bewertung der MHK	15
4 Qualitätskontrolle (QC)	15
Anhang A (informativ) RPMI-1640-Medium	18
A.1 Allgemeines	18
A.2 Literaturhinweise für Anhang A	20
Anhang B (informativ) Bariumsulfat-Trübungsstandard 0,5 nach McFarland	21
Anhang C (informativ) Annehmbare Zeitpunkte der Ablesung für die Bewertung von MHK bei der Anwendung des Verfahrens der visuellen Ablesung der MHK	22
Literaturhinweise	23

Einleitung

Tests zur Empfindlichkeitsprüfung *in vitro* werden bei Mikroorganismen durchgeführt, die im Verdacht stehen, Infektionskrankheiten zu verursachen, insbesondere wenn angenommen wird, dass der Erreger zu einer Spezies gehört, die möglicherweise über eine erworbene Resistenz gegen häufig verwendete antimikrobielle Substanzen verfügt. Außerdem sind diese Tests von Bedeutung bei der Überwachung der Resistenzlage, für epidemiologische Studien zur Empfindlichkeit und für Vergleiche zwischen neuen und etablierten Wirkstoffen.

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von antimikrobiellen Substanzen werden Dilutionsmethoden angewendet, die auch die Referenzmethoden zur antimykotischen Empfindlichkeitsprüfung sind. Die MHK-Methoden werden eingesetzt zur Resistenzüberwachung, zu Vergleichsuntersuchungen neuer Substanzen für Forschungs- oder Registrierungszwecke, zur Bestimmung der Empfindlichkeit von Erregern, für die Routinetests keine eindeutigen Resultate liefern, in Tests mit Erregern, bei denen Routinetests möglicherweise unzuverlässig sind; zudem kommen sie zum Einsatz, wenn für die klinische Behandlung ein quantitatives Ergebnis benötigt wird. In Dilutionstests werden Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit getestet, ein erkennbares Wachstum auf eine Reihe von Agarplatten (Agardilution) oder in Flüssigmedien (Bouillon) (Bouillondilution) zu erzeugen, die Reihenverdünnungen der antimikrobiellen Substanz enthalten.

Die geringste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz (in mg/l), die unter definierten Prüfbedingungen *in vitro* ein mikrobielles Wachstum in einem definierten Zeitintervall visuell erkennbar oder optisch messbar reduziert, wird als MHK bezeichnet. Die MHK dient dem Kliniker als Maß für die Empfindlichkeit des Erregers gegen eine antimikrobielle Substanz und als Anhaltspunkt für Therapieentscheidungen. Daher sind sorgfältige Qualitätskontrolle und Standardisierung für eine entsprechende Vergleichspräzision innerhalb und zwischen Laboratorien unerlässlich, da die Ergebnisse von dem angewendeten Verfahren beeinflusst werden können. Es ist allgemein anerkannt, dass MHK-Bestimmungen mit Bouillontests mit Abweichungen von maximal einer Verdünnungsstufe über oder unter dem wahren Endpunkt reproduzierbar sind (d. h. ± 1 Vertiefung einer Mikrotiterplatte oder Röhrchen bei einer Verdünnungsreihe durch Verdopplung).

Als Bouillondilution wird eine Technik bezeichnet, bei der Behälter mit identischen Volumina an Bouillon mit Lösungen antimikrobieller Substanzen in schrittweise (üblicherweise in Zweierschritten) steigenden Konzentrationen mit einer bekannten Anzahl von Erregern beimpft werden.

Bei der Bouillonmikrodilution wird der gleiche Bouillondilutionstest in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Die in dieser Internationalen Norm beschriebenen Referenzmethoden dienen der Empfindlichkeitsprüfung von Reinkulturen von Sprosspilzen. Die in diesem Teil der Internationalen Norm beschriebenen Bouillonmikrodilutionsmethoden sind im Wesentlichen identisch mit denjenigen, die vom Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [1] und vom European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [2] beschrieben wurden. Diese Methoden ergaben für Fluconazol bis zu einer Konzentration von 2 mg/l im Wesentlichen die gleiche, wenn nicht identische MHK [3]. Untersuchungen mit verschiedenen anderen Antimykotika sind geplant oder befinden sich in der Durchführung. Laboratorien, die diese Internationale Norm zur Durchführung von Untersuchungen neuerer Antimykotika oder als Referenzmethode zum Vergleich mit MHK, die mit einem Diagnosegerät erhalten wurden, anwenden möchten, sollten auf der Grundlage der Wahl der MHK-Ablesewerte, die durch visuelle Ablesung (CLSI-Methode) oder unter Anwendung eines Spektrophotometers (EUCAST-Methode) bestimmt wurden, auswählen, welche der Verfahrensmöglichkeiten anzuwenden ist. In jedem Fall sind die verfahrensbezogenen Einzelheiten der gewählten Möglichkeit ausdrücklich einzuhalten.

WARNUNG — Die Anwendung dieser Internationalen Norm kann mit der Anwendung gefährlicher Stoffe, Verfahrensschritte und Ausrüstungsgegenstände verbunden sein. Diese Internationale Norm erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit ihrer Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders von dieser Internationalen Norm, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung die Anwendbarkeit einschränkender Vorschriften zu bestimmen.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm beschreibt eine Methode zur Empfindlichkeitsprüfung von Sprosspilzen gegen Antimykotika, einschließlich *Candida* spp. und *Cryptococcus neoformans*, die Infektionen verursachen. Das hier beschriebene Referenzverfahren wurde nicht bei Untersuchungen der Hefeformen dimorpher Pilze, wie z. B. *B. dermatitidis* und/oder *H. capsulatum* Varietät *capsulatum* angewendet. Außerdem führt die Prüfung von fadenförmigen Pilzen (Schimmelpilzen) zu verschiedenen zusätzlichen Problemen hinsichtlich der Standardisierung, die in dem vorliegenden Verfahren nicht behandelt werden. Referenzmethoden für die antimykotische Empfindlichkeitsprüfung von fadenförmigen Pilzen mit Bouillondilution wurden entwickelt und stehen derzeit als CLSI-Dokument M38 und EUCAST-Dokument E.DEF 9.1 zur Verfügung [4, 5, 6, 7, 8].

Diese Internationale Norm beschreibt die Referenzmethode der Bouillonmikrodilution, die auf eine von zwei Weisen umgesetzt werden kann. Eine Weise umfasst die visuelle Bestimmung von MHK (CLSI-Methode) [1]; die Zweite die spektrophotometrische Bestimmung von MHK (EUCAST-Methode) [2]. Die MHK widerspiegelt die Aktivität des Wirkstoffs unter den beschriebenen Prüfbedingungen und kann unter Berücksichtigung anderer Faktoren, wie z. B. der Pharmakologie des Wirkstoffs oder antimykotischer Resistenzmechanismen, zur Interpretation für klinische Zwecke angewendet werden. MHK können als „sensibel“ (S), „dosisabhängig sensibel“ (S-DD), „intermediär“ (I), „nicht sensibel“ (NS) oder „resistent“ (R) eingestuft werden. Die Verteilung der MHK-Werte kann zudem dazu dienen, Wildtyp-Pilzpopulationen von Nicht-Wildtyp-Pilzpopulationen zu unterscheiden. Die klinische Interpretation der MHK-Werte fällt nicht in den Anwendungsbereich dieser Internationalen Norm; erläuternde Grenzwerte für die Kategorien, die für die von CLSI und EUCAST abgeleiteten Methoden spezifisch sind, können durch Hinzuziehen der von den Organisationen bereitgestellten aktuellen erläuternden Tabellen [2, 9] ermittelt werden. Es ist ratsam, die Routinemethoden oder Diagnosegeräte zur Empfindlichkeitsprüfung mit dieser Referenzmethode zu vergleichen, um vergleichbare und zuverlässige Ergebnisse für Validierungs- oder Registrierungs-zwecke sicherzustellen.

2 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

2.1

Antimykotikum

Substanz biologischen, semisynthetischen oder synthetischen Ursprungs, die das Wachstum von Pilzen hemmt oder diese abtötet und daher für die Therapie von Infektionskrankheiten potentiell von Nutzen ist

ANMERKUNG Desinfektionsmittel, Antiseptika und Konservierungsmittel sind in dieser Definition nicht inbegriffen.

2.2

Antimykotika — Eigenschaften

2.2.1

Potenz

wirksamer Anteil einer Testsubstanz, bestimmt mit einem Bioassay anhand eines Referenzpulvers derselben Substanz

ANMERKUNG Die Potenz wird angegeben als Massenanteil in Milligramm je Gramm (mg/g) oder als Aktivitätsgehalt in internationalen Einheiten (I. E.) je Gramm oder als Volumenanteil oder Massenanteil in Prozent oder als Stoffmengenkonzentration (Massenanteil) in Mol je Liter der Bestandteile in der Testsubstanz.

2.2.2

Konzentration

Gehalt eines Antimykotikums in einem definierten Flüssigkeitsvolumen

ANMERKUNG 1 Die Konzentration wird in mg/l angegeben.

ANMERKUNG 2 mg/l = µg/ml; von der Verwendung der Einheit µg/ml wird jedoch abgeraten.

2.3

Stammlösung

Ausgangslösung für weitere Verdünnungen

2.4

minimale Hemmkonzentration

MHK

geringste Konzentration, die unter definierten *In-vitro*-Prüfbedingungen in einem vorgegebenen Zeitintervall das Wachstum um einen vereinbarten Betrag verringert

ANMERKUNG Die MHK wird in mg/l angegeben.

2.5

Grenzwert

Breakpoint

BP

spezifische MHK-Werte, die angewendet werden können, um Pilze in die klinischen Kategorien „sensibel“, „dosisabhängig sensibel“, „intermediär“, „nicht sensibel“ und „resistent“ einzustufen

ANMERKUNG Die aktuellen erläuternden Grenzwerte können den letzten Veröffentlichungen der Organisationen entnommen werden, die diese Referenzmethode anwenden (z. B. CLSI und EUCAST) [1, 2, 9].

2.5.1

Verfahren der visuellen Ablesung

2.5.1.1

sensibel

S

Pilzstamm, der *in vitro* von einem Antimykotikum einer bestimmten Konzentration inhibiert wird, welches mit einer hohen therapeutischen Erfolgswahrscheinlichkeit assoziiert ist

ANMERKUNG 1 Die Einstufung von Pilzstämmen als sensibel erfolgt durch Anwendung der geeigneten Grenzwerte in einem definierten phänotypischen Testsystem.

ANMERKUNG 2 Unter bestimmten Umständen (z. B. Veränderungen der üblichen Wirkstoffdosierungen, Auftreten neuer Resistenzmechanismen) kann dieser Grenzwert geändert werden.

2.5.1.2

dosisabhängig sensibel

S-DD

Pilzstamm, der *in vitro* von einem Antimykotikum in einer Konzentration inhibiert wird, die *in vivo* unter Verwendung höherer Dosen des Wirkstoffes als im Normalfall erreicht wird, wenn ein derartiges Dosierungsschema sicher angewendet werden kann

ANMERKUNG 1 Die Einstufung von Pilzstämmen als dosisabhängig sensibel erfolgt durch Anwendung der geeigneten Grenzwerte in einem definierten phänotypischen Testsystem.

ANMERKUNG 2 Diese Empfindlichkeitsklasse impliziert, dass eine Infektion durch das Isolat an Körperstellen, an denen sich die Wirkstoffe physiologisch konzentrieren, oder bei der Möglichkeit der Verwendung einer hohen Wirkstoffdosis in geeigneter Weise therapiert werden kann.

ANMERKUNG 3 Unter bestimmten Umständen (z. B. Veränderungen der üblichen Wirkstoffdosierungen, Auftreten neuer Resistenzmechanismen) kann dieser Grenzwert geändert werden.