

DIN EN ISO 16256



ICS 11.100.10

Ersatz für
DIN EN ISO 16256:2013-04

**Labormedizinische Untersuchungen und In-vitro-Diagnostika-Systeme –
Bouillon-Mikrodilution-Referenzmethode zur Testung der
In-vitro-Aktivität von antimikrobiellen Substanzen gegen Sprosspilze, die
Infektionskrankheiten verursachen (ISO 16256:2021);
Deutsche Fassung EN ISO 16256:2021**

Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems –
Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents
against yeast fungi involved in infectious diseases (ISO 16256:2021);
German version EN ISO 16256:2021

Laboratoires d'analyses de biologie médicale et systèmes de diagnostic in vitro –
Méthode de référence de microdilution en milieu liquide pour soumettre à essai l'activité in
vitro des agents antimicrobiens par rapport aux levures impliquées dans les maladies
infectieuses (ISO 16256:2021);
Version allemande EN ISO 16256:2021

Gesamtumfang 26 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 16256:2021) 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“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 063-03-03 AA „Qualitätsmanagement in medizinischen Laboratorien“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed).

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 16256:2013-04 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Hinzufügung von „broth micro-dilution“ zum Titel (Englisch und Französisch);
- b) Entfernung der 48-h-Messung für Candida-Spezies durch die visuelle Messmethode;
- c) Streichung der Definitionen für Suszeptibilität und Resistenz, die über den Rahmen dieses Testleistungsdokuments hinausgehen;
- d) Aufnahme von Überlegungen zur antimykotischen Prüfung von Hefespezies mit Mikroverdünnungsschalen, die von den Herstellern der Schalen vor der Verwendung in den Tests „behandelt“ wurden;
- e) Aktualisierung der Prüfmethoden zur Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Keime für visuelle und Spektralphotometer-Testwege;
- f) Hinzufügung neuer Antimykotika (z. B. Isavuconazol, Rezafungin) zu den Test- und Qualitätskontrollbereichstabellen;
- g) detaillierte Charakterisierung der Bestandteile einer Formulierung von RPMI-1640, von der bekannt ist, dass sie reproduzierbare Ergebnisse von Antimykotika-Empfindlichkeitstests für Candida-Arten und *Cryptococcus neoformans* liefert;
- h) Neuordnung der Anhänge;
- i) Aktualisierung des Literaturverzeichnisses mit relevanteren Informationen über die Durchführung von Antimykotika-Empfindlichkeitstests für Hefepilze.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 16256: 2013-04

Deutsche Fassung

Labormedizinische Untersuchungen und
In-vitro-Diagnostika-Systeme —
Bouillon-Mikrodilution-Referenzmethode zur Testung der
In-vitro-Aktivität von antimikrobiellen Substanzen gegen
Sprosspilze, die Infektionskrankheiten verursachen
(ISO 16256:2021)

Clinical laboratory testing and
in vitro diagnostic test systems —
Broth micro-dilution reference method for testing
the in vitro activity of antimicrobial agents against yeast
fungi involved in infectious diseases (ISO 16256:2021)

Laboratoires d'analyses de biologie médicale et
systèmes de diagnostic in vitro —
Méthode de référence de microdilution en milieu
liquide pour soumettre à essai l'activité in vitro des
agents antimicrobiens par rapport aux levures
impliquées dans les maladies infectieuses
(ISO 16256:2021)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 2. August 2021 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 CEN-CENELEC-Management-Zentrum 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, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, 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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Testverfahren	10
4.1 Allgemeines	10
4.1.1 Platten und Methode	10
4.1.2 Bedingungen für die Verwendung von Mikrotiterplatten für den Einmalgebrauch	10
4.2 Medium	11
4.2.1 Allgemeines	11
4.2.2 Verfahren der visuellen Ablesung	11
4.2.3 Verfahren der spektrophotometrischen Ablesung	11
4.3 Antimykotika	11
4.3.1 Allgemeines	11
4.3.2 Herstellung von Stammlösungen	11
4.3.3 Herstellung von Arbeitslösungen	12
4.4 Vorbereitung der Mikrotiterplatten für die Bouillon-Mikrodilution	14
4.4.1 Vorbereitung für visuell abzulesende Tests – Verfahren der visuellen Ablesung	14
4.4.2 Vorbereitung für spektrophotometrisch abzulesende Tests – Verfahren der spektrophotometrischen Ablesung	14
4.5 Lagerung von Mikrotiterplatten	14
4.6 Vorbereitung des Inokulums	14
4.6.1 Allgemeines	14
4.6.2 Vorbereitung des Inokulums für den Test mit visueller Ablesung	14
4.6.3 Vorbereitung des Inokulums für den Test mit spektrophotometrischer Ablesung	15
4.7 Beimpfen der Mikrotiterplatten	15
4.8 Bebrüten der Mikrotiterplatten	16
4.8.1 Allgemeines	16
4.8.2 Verfahren der visuellen Ablesung	16
4.8.3 Verfahren der spektrophotometrischen Ablesung	16
4.9 Ablesen der MHK-Ergebnisse	16
4.9.1 Allgemeines	16
4.9.2 Methode der visuellen Ablesung	16
4.9.3 Methoden der spektrophotometrischen Ablesung	17
4.10 Bewertung der MHKs	17
5 Qualitätskontrolle (QC)	17
Anhang A (informativ) RPMI-1640-Medium	20
A.1 Allgemeines	20
Anhang B (informativ) Bariumsulfat-Trübungsstandard 0,5 nach McFarland	22
Literaturhinweise	23

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 16256:2021) 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“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis April 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2024 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 16256:2012.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 16256:2021 wurde von CEN als EN ISO 16256:2021 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 212, *Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems* erarbeitet in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 140, *In-vitro-Diagnostik*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 16256:2012), die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- dem Titel wurde im Englischen „broth micro-dilution“ bzw. im Französischen „de microdilution en milieu liquide“ (Bouillon-Mikrodilution) hinzugefügt;
- für die *Candida*-Spezies wurde bei der Methode der visuellen Ablesung die Ablesung nach 48 h gestrichen;
- die Definitionen von Empfindlichkeit und Resistenz, die außerhalb des Anwendungsbereiches dieses Dokuments liegen, wurden gestrichen;
- Erörterungen zur Verwendung von Mikrotiterplatten, die von den Herstellern vor ihrer Verwendung zu Prüfzwecken „vorbehandelt“ wurden, bei der Antimykotikaprfung von Sprosspilzen wurden aufgenommen;

- die Vorgehensweisen bei der Lebendkeimzahlbestimmung bei dem visuellen und dem spektrophotometrischen Verfahren wurden aktualisiert;
- in den Tabellen zu den Prüf- und Qualitätskontrollbereichen wurden neue Antimykotika (Isavuconazol, Rezafungin) hinzugefügt;
- die Bestandteile einer Rezeptur von RPMI-1640, die bekanntermaßen reproduzierbare Ergebnisse bei Antimykotikaempfindlichkeitsprüfungen von *Candida*-Spezies und *Cryptococcus neoformans* liefert, wurden im Detail charakterisiert;
- die Anhänge wurden neu zugeordnet;
- die Literaturhinweise wurden um weitere relevante Informationen zur Durchführung von Antimykotikaempfindlichkeitsprüfungen von Sprosspilzen ergänzt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

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 (MHKs) von antimikrobiellen Substanzen werden Dilutionsmethoden angewendet, die auch die Referenzmethoden zur Antimykotikaempfindlichkeitsprüfung sind. Die MHK-Methoden werden eingesetzt zur Resistenzüberwachung, zu Vergleichsuntersuchungen neuer Substanzen für Forschungs- oder Registrierungs-zwecke, 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 einer Reihe von Agarplatten (Agardilution) oder in 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 vorgegebenen 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. Für eine entsprechende Vergleichspräzision innerhalb und zwischen Laboratorien sind eine sorgfältige Qualitätskontrolle und eine Standardisierung 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 Bouillon-Mikrodilution wird der gleiche Bouillondilutionstest in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Die in diesem Dokument beschriebenen Referenzmethoden dienen der Empfindlichkeitsprüfung von Reinkulturen von Sprosspilzen. Die in diesem Dokument beschriebenen Bouillon-Mikrodilutionsmethoden sind identisch mit denjenigen, die vom Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [1] [5] und vom Europäischen Ausschuss für die Untersuchung auf Antibiotikaempfindlichkeit (EUCAST, en: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [2] [10] beschrieben wurden. Zunächst wurde gezeigt, dass diese Methoden für Fluconazol bis zu einer Konzentration von 2 mg/l ähnliche, wenn nicht identische MHKs liefern [3]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Methoden für zwei Kontrollstämme von lizenzierten Antimykotika ähnliche MHKs wie die in diesem Dokument beschriebenen liefern, auch wenn Ergebnisse der Qualitätskontrolle für das Spektrophotometer tendenziell etwas niedriger als für die Methode der visuellen Ablesung liegen können. Laboratorien, die dieses Dokument zur Durchführung von Untersuchungen neuerer Antimykotika oder als Referenzmethode zum Vergleich mit MHKs, die mit einem Diagnosegerät erhalten wurden, anwenden möchten, können auf der Grundlage der Wahl der MHK-Ablesewerte, die durch visuelle Ablesung (CLSI-Methode) [5] oder unter Anwendung eines Spektrophotometers (EUCAST-Methode) [2] [10] bestimmt wurden, auswählen, welche der Verfahrensmöglichkeiten anzuwenden ist. In jedem Fall sind die verfahrenstechnischen Einzelheiten der gewählten Möglichkeit ausdrücklich einzuhalten. Laut erster Ausgabe dieses Dokuments, d. h. ISO 16256:2012, wurden die angegebenen Qualitätskontrollprüfungen