

## DIN EN ISO 20776-1



ICS 11.100.10

**Labormedizinische Untersuchungen und *In-vitro*-Diagnostika-Systeme –  
Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Evaluation von  
Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung –  
Teil 1: Referenzmethode zur Testung der *In-vitro*-Aktivität von  
antimikrobiellen Substanzen gegen schnell wachsende aerobe  
Bakterien, die Infektionskrankheiten verursachen (ISO 20776-1:2006);  
Deutsche Fassung EN ISO 20776-1:2006**

Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems –  
Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial  
susceptibility test devices –

Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against  
rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases (ISO 20776-1:2006);  
German version EN ISO 20776-1:2006

Systèmes d'essais en laboratoire et de diagnostic in vitro –

Essais de réceptivité d'agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs de  
réceptivité antimicrobienne –

Partie 1: Méthode de référence pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents  
microbiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies  
infectieuses (ISO 20776-1:2006);

Version allemande EN ISO 20776-1:2006

Gesamtumfang 26 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

## Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 20776-1:2006) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 140 „In-vitro-Diagnostik“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 212 „Labormedizinische Untersuchungen und In-vitro-Diagnostika-Systeme“ unter wesentlicher Beteiligung deutscher Experten erstellt. Im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. war hierfür der Normenausschuss Medizin (NAMed), NA 063-05-10 AA „Chemotherapeutische Untersuchungsmethoden“, zuständig.

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

DIN ISO 20776 *Labormedizinische Untersuchungen und In-vitro-Diagnostika-Systeme — Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Evaluation von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung* besteht aus:

- *Teil 1: Referenzmethode zur Testung der In-vitro-Aktivität von antimikrobiellen Substanzen gegen schnell wachsende aerobe Bakterien, die Infektionskrankheiten verursachen*
- *Teil 2: Evaluation von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung* (zz. Entwurf)

Deutsche Fassung

Labormedizinische Untersuchungen und  
*In-vitro*-Diagnostika-Systeme —  
Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Evaluation  
von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung —  
Teil 1: Referenzmethode zur Testung der *In-vitro*-Aktivität  
von antimikrobiellen Substanzen gegen  
schnell wachsende aerobe Bakterien,  
die Infektionskrankheiten verursachen  
(ISO 20776-1:2006)

Clinical laboratory testing and in  
vitro diagnostic test systems —  
Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of  
performance of antimicrobial susceptibility test devices —  
Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of  
antimicrobial agents against rapidly growing aerobic  
bacteria involved in infectious diseases  
(ISO 20776-1:2006)

Systèmes d'essais en laboratoire et de diagnostic in vitro —  
Essais de réceptivité d'agents infectieux et évaluation  
des performances des dispositifs de  
réceptivité antimicrobienne —  
Partie 1: Méthode de référence pour la détermination  
de la sensibilité in vitro aux agents microbiens des bactéries  
aérobies à croissance rapide impliquées  
dans les maladies infectieuses  
(ISO 20776-1:2006)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 14. November 2006 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 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, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B- 1050 Brüssel

# Inhalt

|                                                                                                                                                    | Seite     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Vorwort .....</b>                                                                                                                               | <b>3</b>  |
| <b>Einleitung.....</b>                                                                                                                             | <b>4</b>  |
| <b>1 Anwendungsbereich .....</b>                                                                                                                   | <b>5</b>  |
| <b>2 Begriffe .....</b>                                                                                                                            | <b>5</b>  |
| <b>3 Testverfahren .....</b>                                                                                                                       | <b>7</b>  |
| 3.1 Allgemeines .....                                                                                                                              | 7         |
| 3.2 Medium .....                                                                                                                                   | 7         |
| 3.3 Antibiotika .....                                                                                                                              | 8         |
| 3.3.1 Allgemeines .....                                                                                                                            | 8         |
| 3.3.2 Herstellung der Stammlösungen .....                                                                                                          | 8         |
| 3.3.3 Herstellung der Arbeitslösungen .....                                                                                                        | 12        |
| 3.3.4 Vorbereitung der Mikrotitrationsplatten .....                                                                                                | 13        |
| 3.3.5 Lagerung der Mikrotitrationsplatten .....                                                                                                    | 13        |
| 3.4 Vorbereitung des Inokulums .....                                                                                                               | 14        |
| 3.4.1 Allgemeines .....                                                                                                                            | 14        |
| 3.4.2 Flüssigkulturmethode .....                                                                                                                   | 14        |
| 3.4.3 Koloniesuspensionsmethode .....                                                                                                              | 14        |
| 3.5 Inokulation der Mikrotitrationsplatten .....                                                                                                   | 15        |
| 3.6 Inkubation der Mikrotitrationsplatten .....                                                                                                    | 15        |
| 3.7 Ablesung der Ergebnisse .....                                                                                                                  | 15        |
| 3.8 Spezielle Testsituationen, in denen die MHK-Werte unzuverlässig sein können .....                                                              | 15        |
| <b>4 Qualitätskontrolle .....</b>                                                                                                                  | <b>17</b> |
| <b>Anhang A (normativ) Vorgaben für Mueller-Hinton-Bouillon .....</b>                                                                              | <b>21</b> |
| A.1 Allgemeines .....                                                                                                                              | 21        |
| A.2 Testung nicht-anspruchsvoller Erreger in Mueller-Hinton-Bouillon .....                                                                         | 21        |
| A.2.1 Allgemeines .....                                                                                                                            | 21        |
| A.2.2 Kationensupplementation .....                                                                                                                | 21        |
| A.2.3 Testung von Streptokokken .....                                                                                                              | 22        |
| A.2.4 Sonstige Aspekte im Zusammenhang mit dem Nährmedium .....                                                                                    | 22        |
| <b>Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den<br/>grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 98/79 .....</b> | <b>23</b> |
| <b>Literaturhinweise .....</b>                                                                                                                     | <b>24</b> |

## Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 20776-1:2006) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 140 „In vitro diagnostic medical devices“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 212 „Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems“ 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 Mai 2007, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2007 zurückgezogen werden.

Zum Zusammenhang mit EG-Richtlinien siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokuments ist.

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

## Einleitung

Tests zur Empfindlichkeitsprüfung *in vitro* werden bei Mikroorganismen durchgeführt, die im Verdacht stehen, Infektionskrankheiten zu verursachen, insbesondere wenn der Erreger zu einer Spezies gehört, die gegen häufiger verwendete antimikrobielle Substanzen resistent sein kann. Darüber können diese Tests zur Überwachung der Resistenzlage, für epidemiologische Studien zur Antibiotikaempfindlichkeit und für Vergleiche zwischen neuen und etablierten Wirkstoffen eingesetzt werden.

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Antiinfektiva werden Dilutionsmethoden verwendet, die auch die Referenzmethoden der antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung sind. Die MHK-Bestimmung wird eingesetzt zur Resistenzüberwachung, zu Vergleichsuntersuchungen neuer Substanzen und zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit von Erregern, für die Routinetests keine eindeutigen Resultate liefern. Zudem kommen sie in klinischen Fällen zum Einsatz, wenn für die Therapieentscheidung ein quantitatives Ergebnis benötigt wird. Dilutionstests prüfen Mikroorganismen auf visuell erkennbares Wachstum auf Serien von Agarplatten (Agardilution) oder in Flüssigmedien (Flüssigdilution), die das Antibiotikum in steigenden Konzentrationen enthalten.

Die geringste Konzentration eines Antibiotikums (in mg/l), die unter definierten Bedingungen *in vitro* ein visuell erkennbares mikrobielles Wachstum in einem definierten Zeitintervall verhindert, wird als MHK bezeichnet. Die MHK dient dem Kliniker als Maß für die Empfindlichkeit des Erregers gegen ein Antibiotikum und kann als Anhaltspunkt für Therapieentscheidungen dienen. Die Ergebnisse werden maßgeblich von den Testbedingungen beeinflusst. Daher sind sorgfältige Qualitätskontrolle und Standardisierung unerlässlich, um innerhalb und zwischen Labors reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Im Allgemeinen sind MHK-Testergebnisse mit Abweichungen von maximal einer Verdünnungsstufe über oder unter dem tatsächlichen Wert reproduzierbar ( $\pm 1$  Vertiefung bzw. Röhrchen bei Verdünnung in Zweierstufen).

Als **Makrodilution** wird eine Technik bezeichnet, bei der separate Behälter mit identischen Volumina an Medium und (gewöhnlich exponentiell) steigenden Antibiotikakonzentrationen mit einem bekannten Inokulum des Erregers versetzt werden.

Bei der **Mikrodilution** wird der gleiche Test in Mikrotitrationsplatten durchgeführt.

Die in diesem Teil der ISO 20776 beschriebene Referenzmethode dient der Empfindlichkeitsprüfung von Reinkulturen aerober Bakterien, die auf Agar mittels Übernachtinkubation kultiviert werden können und in Mueller-Hinton-Medium (gegebenenfalls supplementiert) gut wachsen. Die beschriebene Mikrodilutionsmethode ist im Wesentlichen identisch mit denjenigen, die in vielen Ländern, u. a. Frankreich [1], Deutschland [2], Schweden [3], Großbritannien [4] und den USA [5], bereits zum Einsatz kommen. Eine ebenfalls weitgehend identische Mikrodilutionsmethode wurde vom European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) beschrieben [6]. Alle genannten Protokolle basieren auf den von Ericsson und Sherris beschriebenen Methoden [7].

**Warnung** Die Durchführung der in diesem Teil der ISO 20776 beschriebenen Referenzmethoden kann den Einsatz gefährlicher Materialien, Prozeduren oder Gerätschaften erfordern. Es werden nicht notwendigerweise alle Sicherheitsaspekte der Methoden erörtert. Die Einhaltung adäquater Sicherheitsstandards, die Befolgung von Arbeitsschutzvorschriften und die Beachtung eventueller Rechtsvorschriften obliegt dem Anwender dieses Teils der ISO 20776.

## 1 Anwendungsbereich

Dieser Teil der ISO 20776 beschreibt eine Referenzmethode (Mikrodilution) zur MHK-Bestimmung. Die MHK ist ein Maß für die Aktivität einer Substanz unter den beschriebenen Testbedingungen. Bei der Interpretation für klinische Zwecke können auch andere Faktoren wie die Pharmakologie des Wirkstoffs oder bakterielle Resistenzmechanismen berücksichtigt werden. Diese Vorgehensweise erlaubt die Einstufung bakterieller Isolate in die Kategorien sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R). Die Verteilung der MHK-Werte kann zudem dazu dienen, bakterielle Wildtyp-Populationen von Nicht-Wildtyp-Populationen zu unterscheiden. Für bestimmte Antibiotika/Erreger-Kombinationen sind Modifikationen der Basismethode erforderlich, um die klinische Interpretation der MHK-Ergebnisse zu erleichtern. Obwohl die klinische Interpretation nicht zur Zielsetzung dieses Teils der ISO 20776 gehört, sind entsprechende Modifikationen in einer separaten Tabelle aufgelistet. Es ist ratsam, andere Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung (z. B. mittels Routinetests oder Diagnosegeräten) anhand der Ergebnisse dieser Referenzmethode zu kalibrieren, um vergleichbare und reproduzierbare Werte sicherzustellen.

## 2 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

### 2.1

#### Antibiotikum

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

ANMERKUNG Desinfektionsmittel, Antiseptika und Konservierungsmittel sind nicht inbegriffen.

### 2.2 Antibiotika – Eigenschaften

#### 2.2.1

##### Potenz

antibiotisch wirksamer Anteil einer Testsubstanz, bestimmt mit einem Bioassay anhand eines Referenzpräparats desselben Wirkstoffs

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

#### 2.2.2

##### Konzentration

Gehalt eines Antibiotikums in einem definierten Flüssigkeitsvolumen

ANMERKUNG 1 Die Konzentration wird in mg/l angegeben.

ANMERKUNG 2  $\text{mg/l} \equiv \mu\text{g/ml}$ ; von der Verwendung der Einheit  $\mu\text{g/ml}$  wird jedoch abgeraten.

### 2.3

#### Stammlösung

Ausgangslösung für weitere Verdünnungen

## 2.4

### Minimale Hemmkonzentration

#### MHK

geringste Konzentration eines Antibiotikums, die unter definierten *In-vitro*-Bedingungen in einem vorgegebenen Zeitintervall ein visuell erkennbares mikrobielles Wachstum verhindert

ANMERKUNG Die MHK wird in mg/l angegeben.

## 2.5

### Breakpoint

#### BP

spezifische Werte mikrobiologischer Parameter wie der MHK, auf deren Basis Bakterien in die klinisch interpretierbaren Kategorien „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ eingestuft werden können

ANMERKUNG Die aktuellen Breakpoints können den Veröffentlichungen der Organisationen entnommen werden, die diese Referenzmethode verwenden (z. B. CLSI und EUCAST).

### 2.5.1

#### sensibel

##### S

als sensibel gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er *in vitro* von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einer hohen therapeutischen Erfolgswahrscheinlichkeit assoziiert ist

ANMERKUNG 1 Die Einstufung eines Bakterienstamms als sensibel erfolgt durch Anwendung des geeigneten Breakpoints in einem definierten phänotypischen Testsystem.

ANMERKUNG 2 Verschiedene Umstände (z. B. Veränderungen der üblichen Dosierungen, Auftreten neuer Resistenzmechanismen) können eine Anpassung des Breakpoints erforderlich machen.

### 2.5.2

#### intermediär

##### I

als intermediär gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er *in vitro* von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einem unsicheren therapeutischen Ergebnis assoziiert ist

ANMERKUNG 1 Die Einstufung eines Bakterienstamms als intermediär erfolgt durch Anwendung des geeigneten Breakpoints in einem definierten phänotypischen Testsystem.

ANMERKUNG 2 Die Einstufung als intermediär bedeutet, dass eine Infektion mit dem geprüften Isolat in Lokalisationen mit erhöhter Wirkstoffkonzentration oder bei Verwendung erhöhter Dosierungen möglicherweise erfolgreich therapiert werden kann.

ANMERKUNG 3 Diese Kategorie dient auch als „Pufferzone“, um zu verhindern, dass geringfügige zufällige Variationen der Testbedingungen zu wesentlichen Abweichungen in der Interpretation der Ergebnisse führen.

ANMERKUNG 4 Verschiedene Umstände (z. B. Veränderungen der üblichen Dosierungen, Auftreten neuer Resistenzmechanismen) können eine Anpassung der Breakpoints erforderlich machen.

### 2.5.3

#### resistent

##### R

als resistent gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er *in vitro* von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit des Therapieversagens assoziiert ist

ANMERKUNG 1 Die Einstufung eines Bakterienstamms als resistent erfolgt durch Anwendung des geeigneten Breakpoints in einem definierten phänotypischen Testsystem.