

DIN EN ISO 20776-1



ICS 11.100.20

Ersatz für
DIN EN ISO 20776-1:2007-02

**Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Leistungsbewertung 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 20776-1:2019, einschließlich der korrigierten Fassung von 2019-12);
Deutsche Fassung EN ISO 20776-1:2020**

Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices –

Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases (ISO 20776-1:2019, including Corrected version 2019-12);

German version EN ISO 20776-1:2020

Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes –

Partie 1: Méthode de référence de microdilution en bouillon pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses (ISO 20776-1:2019, y compris version corrigée 2019-12);

Version allemande EN ISO 20776-1:2020

Gesamtumfang 28 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 20776-1:2020) 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 Gremium ist der NA 063 BR „Beirat des DIN-Normenausschusses Medizin (NAMED)“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED).

DIN EN ISO 20776 besteht unter dem allgemeinen Titel *Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Leistungsbewertung von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung* aus den folgenden Teilen:

- Teil 1: *Referenzmethode zur Testung der In-vitro-Aktivität von antimikrobiellen Substanzen gegen schnell wachsende aerobe Bakterien, die Infektionskrankheiten verursachen*
- Teil 2: *Evaluation der Leistung einer Vorrichtung zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung*

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 20776-1:2007-02 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Überarbeitung zu einem Dokument, das sich ausschließlich auf die Durchführung der Bouillon-Mikrodilution bezieht;
- b) Streichen der Definitionen und Angaben zu den Breakpoints für S, I und R;
- c) Verschiebung der Tabellen in die Anhänge;
- d) Streichen der Tabelle zur Qualitätskontrolle;
- e) Aktualisierung der Tabelle der global eingesetzten Lösungs- und Verdünnungsmittel für antimikrobielle Substanzen (jetzt Anhang B);
- f) Aktualisierung der Angaben zu speziellen Nährmedien und Verfahren für bestimmte derzeit eingesetzte antimikrobielle Substanzen;
- g) redaktionelle Überarbeitung.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 20776-1: 2007-02

Deutsche Fassung

Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und
Leistungsbewertung 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 20776-1:2019, einschließlich der korrigierten Fassung
von 2019-12)

Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of
performance of antimicrobial susceptibility test devices —
Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing
the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly
growing aerobic bacteria involved in infectious diseases
(ISO 20776-1:2019, including Corrected version 2019-12)

Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des
performances des dispositifs pour antibiogrammes —
Partie 1: Méthode de référence de microdilution en
bouillon pour la détermination de la sensibilité in vitro aux
agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance
rapide impliquées dans les maladies infectieuses
(ISO 20776-1:2019, y compris version corrigée 2019-12)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 22. April 2020 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	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Testverfahren	9
4.1 Allgemeines	9
4.2 Medium	9
4.3 Antimikrobielle Substanzen	9
4.3.1 Allgemeines	9
4.3.2 Herstellung der Stammlösungen	9
4.3.3 Herstellung der Arbeitslösungen	10
4.3.4 Vorbereitung der Mikrotiterplatten	10
4.3.5 Lagerung der Mikrotiterplatten	10
4.4 Vorbereitung des Inokulums	11
4.4.1 Allgemeines	11
4.4.2 Flüssigkulturmethode	11
4.4.3 Direkte Koloniesuspensionsmethode	11
4.5 Inokulation der Mikrotiterplatten	12
4.6 Inkubation der Mikrotiterplatten	12
4.7 Ablesung der Ergebnisse	12
4.8 Spezielle Testsituationen, in denen die MHK-Werte unzuverlässige Ergebnisse liefern könnten	13
5 Qualitätskontrolle	13
Anhang A (informativ) Vorgaben für Mueller-Hinton-Bouillon	14
A.1 Allgemeines	14
A.2 Testung anspruchloser Organismen in Mueller-Hinton-Bouillon	14
A.2.1 Allgemeines	14
A.2.2 Kationeneinstellung und -konzentration	14
A.2.3 Einstellung des Mueller-Hinton-Referenzmediums zur Mikrodilution bei Untersuchung bestimmter Bakterienspezies und sonstiger mikrobieller Substanzen	15
A.2.4 Weitere Nährmediumfragen, für die internationale Normung bisher aussteht	16
Anhang B (informativ) Lösungsmittel und Verdünnungsmittel zur Herstellung von Stammlösungen ausgewählter antimikrobieller Substanzen	17
Anhang C (informativ) Herstellung gebrauchsfertiger Verdünnungen von Lösungen antimikrobieller Substanzen zur Verwendung in MHK-Tests mit Dilutionsmethoden	23
Anhang D (informativ) Spezielle Testsituationen	24
D.1 Allgemeines	24
D.2 Spezielle Testsituationen	24
D.2.1 Anspruchsvolle aerobe und fakultativ anaerobe Bakterienspezies (z. B. Haemophilus)	24
D.2.2 Mecillinam	24
D.2.3 Fosfomycin	24
Literaturhinweise	25

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 20776-1:2020) 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 Januar 2021 und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juli 2023 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 20776-1:2006.

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 20776-1:2019 einschließlich der korrigierten Fassung von 2019-12 wurde von CEN als EN ISO 20776-1:2020 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (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 Themen 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.

Eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link: 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.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 20776-1:2006), die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- Überarbeitung zu einem Dokument, das sich ausschließlich auf die Durchführung der Bouillon-Mikrodilution bezieht;
- Definitionen und Angaben zu den Breakpoints für S, I und R gelöscht;
- eingebettete Tabellen in die Anhänge verschoben;
- Tabelle zur Qualitätskontrolle entfernt;
- Tabelle (jetzt Anhang B) der global eingesetzten Lösungs- und Verdünnungsmittel für antimikrobielle Substanzen aktualisiert;
- aktualisierte Angaben zu speziellen Nährmedien und Verfahren für bestimmte derzeit eingesetzte antimikrobielle Substanzen.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 20776 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

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.

Diese korrigierte Fassung der ISO 20776-1:2019 beinhaltet folgende Korrektur:

- pH-Wert des Verdünnungsmittels für Ampicillin in Anhang B von 8,0 auf 6,0 korrigiert.

Einleitung

Antimikrobielle *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfungen 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 Prüfungen zur Überwachung der Resistenzlage, für epidemiologische Studien zur Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen und für Vergleiche zwischen neuen und etablierten Wirkstoffen eingesetzt werden.

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von antimikrobiellen Substanzen werden in der antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung Dilutionsmethoden verwendet. MHK-Methoden werden eingesetzt zur Resistenzüberwachung, zur Festlegung identifizierender Wildtyp-Phänotypen, zu Vergleichsuntersuchungen neuer Wirkstoffe, zur Bestimmung der Empfindlichkeit von Erregern, die bei Routineprüfungen keine eindeutigen Resultate liefern, bei der Prüfung von Erregern, bei denen Routineprüfungen unzuverlässig sein können, und wenn ein quantitatives Ergebnis für das klinische Management erforderlich ist. Dilutionstests prüfen Mikroorganismen auf visuell erkennbares Wachstum in Bouillon (Flüssigdilution), die die antimikrobielle Substanz in steigenden Konzentrationen enthalten, oder auf Serien von Agarplatten (Agardilution).

Die geringste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz (in mg/l), die unter definierten *In-vitro*-Bedingungen ein visuell erkennbares mikrobielles Wachstum in einem definierten Zeitintervall verhindert, wird als MHK bezeichnet. Die MHK dient dem Kliniker als Orientierungshilfe für die Empfindlichkeit des Erregers gegenüber einer antimikrobiellen Substanz und kann als Anhaltspunkt für Therapieentscheidungen dienen. Für die laborinterne und laborübergreifende Reproduzierbarkeit von Bouillon-MHK-Untersuchungen ist eine sorgfältige Kontrolle und Standardisierung erforderlich. Die MHK-Werte erstrecken sich meist über zwei bis drei Stufen der Verdünnungsverdoppelung und weisen einen dominanten Median auf.

Als **Makrodilution** (Bouillon-Makrodilution) wird eine Technik bezeichnet, bei der Behälter mit identischen Volumina an Bouillon und (gewöhnlich exponentiell) steigenden Konzentrationen von antimikrobiellen Substanzen mit einer bekannten Anzahl von Mikroorganismen versetzt werden.

Bei der **Mikrodilution** (Bouillon-Mikrodilution) wird der Bouillon-Dilutionstest in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Die in diesem Dokument beschriebene Methode dient der Prüfung von Reinkulturen aerober Bakterien, die leicht auf Agar mittels Übernachtinkubation kultiviert werden können und gut in standardisierten Mikrotiterplatten wachsen, die standardisierte Mueller-Hinton-Bouillon (Volumen $\leq 200 \mu\text{l}$) enthalten, wobei diese je nach der zu untersuchenden antimikrobiellen Substanz gegebenenfalls zu modifizieren ist.

Die in diesem Dokument beschriebene Mikrodilutionsmethode ist im Wesentlichen identisch mit denjenigen, die in vielen Ländern bereits zum Einsatz kommen und als Methoden vom Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [1] und dem European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [2] veröffentlicht wurden. Diese Methoden basieren auf den von Ericsson und Sherris beschriebenen Methoden [3].

WARNUNG — Die Anwendung dieses Dokuments kann die Anwendung gefährlicher Stoffe, Arbeitsgänge und Geräte mit sich bringen. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, auf alle vorhandenen Sicherheitsprobleme hinzuweisen, die mit seiner Anwendung verbunden sind. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, angemessene Sicherheits- und Gesundheitsschutzpraktiken festzulegen und die Anwendbarkeit aller anderen Einschränkungen vor der Verwendung zu bestimmen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt eine Referenzmethode, Mikrodilution, zur MHK-Bestimmung. Die MHK kann dem Kliniker als Orientierungshilfe dienen und spiegelt das Maß für die Aktivität einer Substanz unter den beschriebenen Testbedingungen wider. Hierbei können auch andere Faktoren wie die Pharmakologie und Pharmakokinetik des Wirkstoffs oder bakterielle Resistenzmechanismen berücksichtigt werden. Diese Vorgehensweise erlaubt die Einstufung von Bakterien 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. Obgleich die klinische Interpretation des MHK-Werts nicht im Anwendungsbereich dieses Dokuments liegt, sind für bestimmte Kombinationen von antimikrobiellen Substanzen/Erregern Modifikationen der Basismethode erforderlich, um die klinische Interpretation zu erleichtern. Diese Modifikationen sind in einem separaten Anhang dieses Dokuments aufgeführt. Es ist erforderlich, andere Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung (z. B. mittels Plattendiffusion oder Diagnoseprüfgeräten) mit dieser Referenzmethode zur Validierung zu vergleichen, um vergleichbare und verlässliche Werte sicherzustellen.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

antimikrobielle Substanz

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 1 zum Begriff: Desinfektionsmittel, Antiseptika und Konservierungsmittel sind in dieser Definition nicht enthalten.

3.2

Potenz

Maß der Wirkstoffaktivität, die als jene Menge angegeben wird, die benötigt wird, um eine Wirkung bestimmter Intensität zu erzielen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Potenz wird angegeben als Massenanteil in Milligramm je Gramm (mg/g), als Aktivitätsgehalt in internationalen Einheiten (I.E., en: International Units) je Gramm, als Volumenanteil bzw. Massenanteil in Prozent oder als Stoffmengenkonzentration (molarer Anteil) in Mol je Liter an Bestandteilen in der Testsubstanz.