

	Medizinische Mikrobiologie Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung anaerober bakterieller Krankheitserreger gegen Chemotherapeutika Agar-Dilutionsmethode und Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode	DIN 58 944 Teil 1
Medical microbiology; method for the determination of susceptibility testing of anaerobic pathogenic bacteria to chemotherapeutic agents; agardilution method and micro broth dilution method	Einsprüche bis 29. Feb 1992 Anwendungswarnvermerk auf der letzten Seite beachten!	Vorgesehen als Ersatz für Ausgabe 02.86 und DIN 58 944 T 2/02.86
1 Anwendungsbereich und Zweck Diese Norm gilt für die Empfindlichkeitsprüfung anaerober bakterieller Krankheitserreger, insbesondere der Gattungen <i>Bacteroides</i>, <i>Prevotella</i> [1], <i>Porphyromonas</i>, <i>Peptostreptococcus</i>, <i>Peptococcus</i> und <i>Clostridium</i> mit der Agar-Dilutions- und der Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode [2], [3]. Die Untersuchungen sind in einem medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium durchzuführen, das mindestens Typ 2 nach DIN 58 956 Teil 1 entsprechen muß. Die Agar-Dilutionsmethode nach dieser Norm ist vor allem geeignet zur - Untersuchung größerer Stammkollektive - Bestimmung von Resistenzmustern - periodischen Erfassung der Resistenzlage (Chemotherapeutikaempfindlichkeit) - vergleichenden Untersuchung mit bekannten Chemotherapeutika - Evaluierung neuer Chemotherapeutika Die Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode eignet sich darüber hinaus zur Testung einzelner Bakterienstämme. Zweck dieser Festlegungen ist es, in den bakteriologischen Laboratorien vergleichbare, d. h. wiederholbare und reproduzierbare Ergebnisse der Chemotherapeutika-Empfindlichkeitsprüfung von anaeroben bakteriellen Krankheitserregern zu ermöglichen [4], [5], [6] und [7].	2 Begriffe Grundbegriffe nach DIN 58 940 Teil 1 und DIN 58 956 Teil 1. 2.1 Anaerobe Bakterien (Anaerobier) Anaerobier im Sinne dieser Norm sind Bakterien, die sich mittels Oberflächenkultur ausschließlich in anaerober Atmosphäre, nicht jedoch bei Luftzutritt sowie nicht in einem Gemisch von Luft mit einem Volumenanteil bis 10 % CO₂ (z. B. im Kerzentopf) vermehren lassen. Anmerkung: Für Flüssigkulturen gelten teilweise besondere Bedingungen. 2.2 Anaerobe bakterielle Krankheitserreger Anaerobe bakterielle Krankheitserreger sind Ursachen von Toxiinfektionen oder eitrigen und/oder septischen Infektionen [8]. 2.3 Anaerobe Atmosphäre Eine anaerobe Atmosphäre wird dadurch erreicht, daß in dicht verschließbaren Kulturgefäßen oder Brutschränken durch chemische oder physikalische Verfahren der Volumenanteil des Sauerstoffs auf ≤ 2 % gesenkt und aufrechterhalten wird. 2.4 Kontrollstämme Kontrollstämme im Sinne dieser Norm sind Anaerobierkulturen, deren Empfindlichkeit gegenüber be-	Fortsetzung Seite 2 bis 6 Normenausschuß Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

stimmten Chemotherapeutika aufgrund von publizierten multizentrischen Vergleichsuntersuchungen als bekannt und konstant betrachtet wird.

3 Bezeichnung

Bezeichnung der Empfindlichkeitsprüfung von anaeroben bakteriellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika

nach der Agar-Dilutionsmethode (AD):
Methode DIN 58 944 - AD

nach der Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode (MBD):
Methode DIN 58 944 - MBD

4 Geräte

4.1 Kulturgefäße

Zur Aufnahme des Kulturmediums dienen Petrischalen aus Glas nach DIN 12 339 oder Petrischalen aus Kunststoff mit Nocken oder andere geeignete Gefäße bzw. Systeme.

Eine anaerobe Atmosphäre in den Kulturgefäßen muß sichergestellt sein.

4.2 Geräte zum Beimpfen der Kulturmedien

Für die Beimpfung der Kulturmedien und Mikrotitrationsplatten sind Pipettier-/Auftragesysteme notwendig, die eine definierte, reproduzierbare Volumenabgabe im Bereich 0,001 bis 100 µl mit einer Abweichung von max. 5 % sicherstellen.

Zur Beimpfung fester Kulturmedien wird ein Multi-point-Inokulator (z. B. Replikator nach Steers et al [9]) benötigt. Alternativ kommen andere Systeme in Betracht, die eine definierte Auftragemenge von 0,001 ml sicherstellen.

4.3 Anaerostaten

Als Anaerostaten sind Spezialgefäße ¹⁾ mit H₂- und CO₂-Entwicklern sowie z. B. Palladium-Katalysatoren oder Spezialgefäße mit sauerstoffbindendem Eisenkatalysator und CO₂-Entwickler ¹⁾ zu verwenden, die eine anaerobe Atmosphäre nach Abschnitt 6 sicherstellen.

Die Handhabung der einzelnen Produkte erfolgt nach den Anweisungen der Hersteller.

Als Alternative kommen Anaerobier-Brutschränke ¹⁾, die konstant eine anaerobe Atmosphäre (Gaszusammensetzung: inertes Gas, z. B. N₂ mit einem Volumenanteil von 80 bis 90 %, Wasserstoff mit einem Volumenanteil von 3 bis 7 % und Kohlenstoffdioxid mit einem Volumenanteil von 5 bis 10 % in Gegenwart eines Katalysators) erreicht werden kann, in Betracht.

4.4 Mikrotitrationsplatten

Zur Aufnahme des Kulturmediums dienen Kunststoff- oder Glasbehälter mit inertem Material mit einer geeigneten Anzahl (≥ 3) küvettenartiger Vertiefungen mit einem Fassungsvermögen von ≤ 500 µl.

5 Kulturmedien

Anmerkung: Nicht alle anaeroben Krankheitserreger lassen sich mit den nachfolgend beschriebenen Kulturmedien ausreichend gut anzüchten.

Bei Verwendung von Zusätzen, z. B. Serum, Blut, (außer den in den Abschnitten 5.1, 5.2 und 5.3 angegebenen Zusätzen) müssen die Kontrollstämme nach Abschnitt 7 Ergebnisse erbringen, die mit den Ergebnissen von Kontrollstämmen ohne Zusatz vergleichbar sind. Andernfalls müssen die Ergebnisse für jedes Chemotherapeutikum neu evaluiert und für die Kontrollstämme entsprechende Grenz(Kontroll)-bereiche nach DIN 58 959 Teil 15 *) festgelegt werden.

5.1 Kulturmedien für die Vorkultur und Bebrütungszeit

Für die Vorkultur der zu prüfenden anaeroben Stämme ist Rosenow-Bouillon ¹⁾ zu verwenden. In diesem Kulturmedium sollten Clostridium 24 h, Bacteroides- und Prevotella-Arten 48 h und Peptostreptococcus-, Peptococcus- und Porphyromonas-Arten 72 h lang in anaerober Atmosphäre bei (36 ± 1) °C bebrütet werden.

Sollen andere anaerobe bakterielle Krankheitserreger geprüft werden, so ist eine der Generationszeit dieser Stämme angepaßte Bebrütungszeit zu wählen.

Als Alternative kommt die Anzüchtung in Thioglykolatmedium ohne Indikator in Betracht, welches vor dem Sterilisieren mit Hämin (5 mg/l) und unmittelbar vor Gebrauch mit Vitamin K₁ (0,1 mg/l) in den angegebenen Konzentrationen supplementiert wird.

Auf den Zusatz von Natriumhydrogencarbonat (1 g/l) darf verzichtet werden, wenn die Festlegungen der anaeroben Atmosphäre nach Abschnitt 6 berücksichtigt werden. Eine Bebrütungszeit von 18 bis 24 h bei (36 ± 1) °C ist empfehlenswert, wenn hiermit reproduzierbare Ergebnisse sichergestellt werden.

Die Verwendung eines anderen, jedoch mindestens gleichwertigen Kulturmediums ist möglich.

Die Vorkultur darf auch auf festen Oberflächenmedien (z. B. Schaedler-Agar mit Zusatz von 5 % Schafblut und Vitamin K₁) erfolgen. Dazu wird der Stamm auf dem Kulturmedium fraktioniert ausgestrichen. Bebrütet wird bei (36 ± 1) °C im Anaerostaten nach Abschnitt 4.3 in einer anaeroben Atmosphäre nach Abschnitt 6. Die Bebrütungszeit sollte bei Clostridien 24 h, bei Bacteroides und Prevotella 48 h, und bei Fusobacterium, Peptostreptococcus und Peptococcus 72 h betragen.

Der Zeitraum zwischen der Entnahme der Vorkultur aus dem Anaerostaten und Herstellung des Inokulums darf 30 min nicht überschreiten.

Die Stämme, die zuvor tiefgefroren oder lyophilisiert aufbewahrt wurden, müssen vor der Empfindlichkeitsprüfung über drei anaerobe Subkulturen geführt werden.

*) Z. Z. Entwurf

¹⁾ Über die Bezugsquellen gibt Auskunft: