

**Medizinische Mikrobiologie
Qualitätssicherung
im medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium
Einsatz von Kontrollstämmen bei der
Empfindlichkeitsprüfung von aeroben Krankheitserregern**

DIN
58 959
Teil 14

Medical microbiology; quality assurance in medical microbiological laboratories; use of control strains for susceptibility testing of pathogenic aerobic bacteria

Einsprüche bis 29. Feb 1992

Anwendungswarnvermerk
auf der letzten Seite beachten!

Inhalt

		Seite			Seite
1	Anwendungsbereich und Zweck	1	4.8.2	Dilutionsmethoden	5
2	Begriffe	1	4.9	Änderung der Prüfhäufigkeit (Korrekturmaßnahmen)	5
3	Allgemeine Anforderungen an das Mitführen von Kontrollstämmen	1	4.9.1	Korrekturmaßnahmen bei täglicher Prüfung	5
4	Anforderungen an den Nachweis der Qualität der Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von aeroben Krankheitserregern ..	1	4.9.2	Korrekturmaßnahmen bei wöchentlicher Prüfung	5
4.1	Qualitätsmerkmale	2	4.10	Qualitätsprüfung des Agar-Diffusions-testes	6
4.2	Kontrollstämmen	2	4.10.1	Durchführung	6
4.3	Kulturmedien	2	4.10.2	Auswertung der Prüfergebnisse	6
4.3.1	Qualitätsmerkmale für Kulturmedien	2	4.11	Qualitätsprüfung der Agar-Dilutionsmethode	6
4.3.2	Kontrollstämmen für Kulturmedien	2	4.11.1	Durchführung	6
4.3.3	Prüfhäufigkeit der Kulturmedien	2	4.11.2	Auswertung der Prüfergebnisse	6
4.3.4	Qualitätsprüfung der Kulturmedien	3	4.12	Qualitätsprüfung der Bouillon-Dilutionsmethoden	6
4.4	Inokulum	3	4.12.1	Durchführung der Makro-Bouillon-Dilutionsmethode	6
4.5	Testblättchen	3	4.12.2	Durchführung der Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode	7
4.6	Chemotherapeutika-Lösungen (Stammlösung) ..	3	4.12.3	Auswertung der Prüfergebnisse der Makro- und Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode	7
4.7	Prüfhäufigkeit	4		Zitierte Normen und andere Unterlagen	7
4.7.1	Prüfhäufigkeit selbsthergestellter Reagenzien und Testblättchen	4		Erläuterungen	8
4.7.2	Prüfhäufigkeit des Inokulum	4		Anwendungswarnvermerk	8
4.7.3	Prüfhäufigkeit der Methoden	4			
4.8	Kontrolle der Prüfrichtigkeit und -Präzision	4			
4.8.1	Agar-Diffusionstest	4			

1 Anwendungsbereich und Zweck

Die Festlegungen dieser Norm beziehen sich auf die Bedingungen und Verfahren, die für den Einsatz von Kontrollstämmen bei der Empfindlichkeitsprüfung aerober, schnellwachsender Bakterien gegenüber Chemotherapeutika zu beachten sind und auf die Maßstäbe, nach denen die mit den Kontrollstämmen erhaltenen Ergebnisse auszuwerten sind.

Zweck dieser Norm ist es, die Ergebnisse der in medizinisch-mikrobiologischen Laboratorien unter aeroben Bedingungen durchgeführten Empfindlichkeitsprüfungen durch das Mitführen von Kontrollstämmen in bezug auf ihre Zuverlässigkeit, Verwertbarkeit und Reproduzierbarkeit zu sichern.

2 Begriffe

Medizinisch-mikrobiologische Begriffe, die als bekannt vorausgesetzt werden, sind in dieser Norm nicht definiert.

Zitierte Normen und andere Unterlagen und Erläuterungen siehe Originalfassung der Norm

Weitere Begriffe nach DIN 58 940 Teil 1, DIN 58 959 Teil 1 *) und DIN 58 959 Teil 6 *)

3 Allgemeine Anforderungen an das Mitführen von Kontrollstämmen

Nach DIN 58 959 Teil 7 *) und DIN 58 959 Teil 13 *)

4 Anforderungen an den Nachweis der Qualität der Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von aeroben Krankheitserregern

Anmerkung: Zur Empfindlichkeitsprüfung von aeroben Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika steht eine Vielzahl von Methoden mit individuellen Modifikationen zur Verfügung, [1], [2] und [3].

*) Z. Z. Entwurf

Fortsetzung Seite 2 bis 7

Normenausschuß Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

Genormt sind z. Z.:

- Agar-Diffusionstest nach DIN 58 940 Teil 3 mit Testblättchen nach DIN 58 940 Teil 2,
- Agar-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 6,
- Makro-Bouillon-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 5 und
- Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 8.

Die Festlegungen nach dieser Norm zur Qualitätssicherung der Empfindlichkeitsprüfungen beschränken sich auf die genormten Methoden. Qualitätssichernde Maßnahmen für den Einsatz von Kontrollstämmen bei der Empfindlichkeitsprüfung von speziellen Krankheitserregern sind nach DIN 58 959 Teil 16 *) beschrieben.

4.1 Qualitätsmerkmale

Die zu prüfenden Qualitätsmerkmale beziehen sich auf:

- Kontrollstämmen
- Kulturmedien
- Inokulum
- Reagenzien
- Testblättchen
- Chemotherapeutika und Standardsubstanzen
- Testdurchführung
- Auswertung/Testinterpretation
- Dokumentation

4.2 Kontrollstämmen

Anforderungen nach DIN 58 959 Teil 6 *).

Entsprechend der gewählten Methode zur Empfindlichkeitsprüfung sind mindestens die festgelegten Kontrollstämmen einzusetzen, für:

- Agar-Diffusionstest nach DIN 58 940 Teil 3
- Agar-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 6
- Makro-Bouillon-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 5
- Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 8

Für HHD- oder MHK/MBK-Bestimmungen mit einer Kombination β -Lactam-Chemotherapeutika + β -Lactamasehemmer sind zusätzlich die entsprechenden β -Lactamasebildenden Kontrollstämmen mitzuführen.

4.3 Kulturmedien

Als Kulturmedium sollte Mueller-Hinton-Agar ¹⁾ bzw. Mueller-Hinton-Bouillon ¹⁾ verwendet werden.

Das Kulturmedium ist bei der Eigenherstellung nach Angaben der Hersteller zuzubereiten und zu sterilisieren.

Kulturmedien durch Fremdbezug dürfen nur von Herstellern stammen, welche mindestens die Qualitätsmerkmale nach Abschnitt 4.3.1 nachweisen können.

Andere Kulturmedien dürfen nur verwendet werden, wenn alle Parameter der jeweiligen Methode der Empfindlichkeitsprüfung validiert worden sind, für:

- Agar-Diffusionstest nach DIN 58 940 Teil 3
- Agar-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 6

Kationensupplemente sollten bei der Agar-Dilutionsmethode nicht zugesetzt werden. Supplementierte Kulturmedien oder sterile Hämoglobininlösung sollen nur verwendet werden für spezielle Krankheitserreger, die nicht auf unsupplementierten Kulturmedien wachsen und wenn entsprechende Kontrollstämmen mitgeführt werden können; siehe auch DIN 58 959 Teil 16 *).

- Makro-Bouillon-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 5 und Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 8

Kationensupplement:

Für Mueller-Hinton-Bouillon ¹⁾, bei der mit verschiedenen Gentamicin-Verdünnungen und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583 ein MHK-Wert außerhalb der in Beiblatt 1 zu DIN 58 959 Teil 14 *) angegebenen Grenz(Kontroll)bereiche festgestellt wird, ist der Kationengehalt wie nachstehend zu ergänzen: Mueller-Hinton-Bouillon ¹⁾ wird hergestellt wie vom Hersteller angegeben, im Sterilisator sterilisiert und über Nacht bei 4 °C gelagert bzw. im Eisbad aufbewahrt, wenn sie am gleichen Tag verwendet wird. Je 1 Liter kaltes Kulturmedium werden unter Rühren 2,5 mg der gekühlten Mg^{++} -Stammlösung und 5 ml der gekühlten Ca^{++} -Stammlösung zugegeben, so daß eine Endkonzentration von 25 mg Mg^{++} /ml bzw. 50 mg Ca^{++} /ml erreicht wird. Dieses Medium wird als supplementierte Mueller-Hinton-Bouillon ¹⁾ bezeichnet.

4.3.1 Qualitätsmerkmale für Kulturmedien

Die zu prüfenden Merkmale gelten sowohl für die Eigenherstellung als auch für den Fremdbezug und beziehen sich auf:

- Sterilität
- pH-Wert
- Thymidin- oder Thymingehalt
- Kationengehalt
- überschüssige Feuchtigkeit
- Wachstums-/Hemmeigenschaften
- Eignung für Empfindlichkeitsprüfung
- Dokumentation der getesteten Qualitätsmerkmale

4.3.2 Kontrollstämmen für Kulturmedien

Es sind die zu der jeweiligen Methode der Empfindlichkeitsprüfung angegebenen Kontrollstämmen zur Prüfung der eingesetzten Kulturmedien zu verwenden:

- Agar-Diffusionstest nach DIN 58 940 Teil 3
- Agar-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 6
- Makro-Bouillon-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 5
- Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 8

4.3.3 Prüfhäufigkeit der Kulturmedien

Bei Eigenherstellung: jede Charge (neue Chargennummer) des Trockenmediums

*) Z. Z. Entwurf

¹⁾ Über die Bezugsquelle gibt der Normenausschuß Medizin (NAMED) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Postfach 11 07, 1000 Berlin 80, Auskunft.

Bei Fremdbezug: bei Bezug von einem neuen Lieferanten, danach jede 5. bis 10. Charge des gleichen Lieferanten.

4.3.4 Qualitätsprüfung der Kulturmedien

Die Qualitätsprüfung erfolgt nach DIN 58 959 Teil 9 *) und bezieht sich auf:

- Sterilität

Eine repräsentative Anzahl (bei Eigenherstellung mindestens 3) von Platten ist für 72 h bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ zu inkubieren. Falls sich kein Bakterienwachstum zeigt, entspricht die Charge den Anforderungen. Diese Platten sind nicht mehr für die Empfindlichkeitsprüfung zu verwenden.

- pH-Wert

Die Messung erfolgt nach Mazeration einer kleinen Medienmenge nach der Sterilisation und Abkühlung oder mittels einer Oberflächenmethode. Der pH-Wert muß 7,2 bis 7,4 betragen.

- Thymin/Thymidingehalt

Die Prüfung ist mit Mueller-Hinton-Agar ¹⁾ bzw. Mueller-Hinton-Bouillon ¹⁾ und Enterococcus faecalis ATCC 29212 oder ATCC 19434 und Trimethoprim-Sulfamethoxazol durchzuführen.

Akzeptable Ergebnisse:

Agar-Diffusionstest: Klare Hemmhöfe mit einem Durchmesser von ≥ 24 mm und ≤ 34 mm. Kulturmedien mit einem überschüssigen Thymidingehalt zeigen keine oder trübe Hemmhöfe mit Wachstum winziger Kolonien in dem Hemmhof.

Dilutionsmethoden: Die Endpunkte sollten einfach zum Ablesen sein (entweder kein Wachstum bzw. 80 % Reduktion im Vergleich zur Kontrolle) und innerhalb der in Beiblatt 1 zu DIN 58 959 Teil 14 *) angegebenen Grenz(Kontroll)bereiche liegen.

- Kationen (Mg^{++} , Ca^{++})-Gehalt

Unterschiedlicher Kationengehalt beeinflusst die Testblättchen bzw. Kulturmedien mit Tetracyclinen, Polymyxin und Aminoglycosiden.

Akzeptable Ergebnisse: HHD- bzw. MHK-Werte liegen innerhalb der in Beiblatt 1 zu DIN 58 959 Teil 14 *) aufgeführten Grenz(Kontroll)bereiche für Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853.

- Überschüssige Feuchtigkeit

Die Prüfung ist visuell durchzuführen, ob die Oberfläche feucht ist oder sich Wassertropfen angesammelt haben. Bei überschüssiger Feuchtigkeit sind die Platten geöffnet (Agarseite nach unten) im Brutschrank für 15 bis 30 min bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ zu inkubieren.

- Wachstums/Hemmeigenschaften

Agar-Diffusionstest: Die Kulturmedien sind mit jeweils 10^2 bis 10^3 KBE ²⁾ der unter Abschnitt 4.3.2 aufgeführten Kontrollstämme zu beimpfen. Zusätzlich wird entsprechend DIN 58 940 Teil 3 eine Platte mit Enterococcus faecalis ATCC 29212 beimpft und ein Trimethoprim-Sulfamethoxazol-Testblättchen aufgelegt. Das Kulturmedium entspricht den Qualitätsmerkmalen, wenn alle eingesetzten Kontrollstämme inner-

halb von 24 h ausreichendes Wachstum zeigen (> 20 bis 50 KBE ²⁾/Platte) und wenn sich bei Enterococcus faecalis klare Hemmhöfe um das Testblättchen mit einem Durchmesser > 24 mm ergeben.

Agar-Dilutionsmethode: Die Kulturmedien sind mit jeweils 10^2 bis 10^3 KBE ²⁾ der unter Abschnitt 4.3.2 aufgeführten Kontrollstämme zu beimpfen. Zusätzlich wird entsprechend DIN 58 940 Teil 6 eine Platte mit Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 beimpft und ein 10- μg -Gentamicin-Testblättchen aufgelegt. Das Kulturmedium entspricht den Qualitätsmerkmalen, wenn alle eingesetzten Kontrollstämme innerhalb von 24 h ausreichendes Wachstum zeigen (> 20 bis 50 KBE ²⁾/Platte) und wenn der Hemmhofdurchmesser um das Testblättchen innerhalb des in Beiblatt 1 zu DIN 58 959 Teil 14 *) angegebenen Grenz(Kontroll)bereiches liegt.

Bouillon-Dilutionsmethoden: Die Kulturmedien sind mit jeweils 10^2 bis 10^3 KBE ²⁾ der unter Abschnitt 4.3.2 aufgeführten Kontrollstämme zu beimpfen.

Das Kulturmedium entspricht den Qualitätsmerkmalen, wenn alle eingesetzten Kontrollstämme innerhalb von 24 h ausreichendes Wachstum zeigen (bei Überimpfen auf festen Kulturmedien > 20 bis 50 KBE ²⁾/Platte).

- Eignungsprüfung

Eine Eignungsprüfung von Kulturmedien ist nur bei der Evaluierung neuer Kulturmedien durchzuführen. Hierbei ist eine Empfindlichkeitsprüfung mit jeweils den unter Abschnitt 4.3.2 angegebenen Kontrollstämmen und mindestens je einem antibakteriell wirksamen Chemotherapeutikum aus jeder Wirkstoffgruppe, die im Beiblatt 1 zu DIN 58 959 Teil 13 *) aufgeführt ist, durchzuführen.

4.4 Inokulum

Das Inokulum muß den Anforderungen an die jeweilige Methode der Empfindlichkeitsprüfung entsprechen:

- Agar-Diffusionstest nach DIN 58 940 Teil 3
- Agar-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 6
- Makro-Bouillon-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 5
- Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode nach DIN 58 940 Teil 8

4.5 Testblättchen

Die Testblättchen müssen den Anforderungen nach DIN 58 940 Teil 2 entsprechen.

4.6 Chemotherapeutika-Lösungen (Stammlösung)

- Als Standardsubstanzen sollten Reinsubstanzen der Chemotherapeutika entsprechend der jeweiligen Pharmakopoe bzw. direkt vom pharmazeutischen Hersteller verwendet werden. Substanzen aus der Apotheke oder für die Applikation bereits gebrauchsfertiger Chemotherapeutika dürfen nicht verwendet werden.

*) Z. Z. Entwurf

¹⁾ Siehe Seite 2

²⁾ KBE = Koloniebildende Einheiten