

	Medizinische Mikrobiologie Qualitätssicherung im medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium Anforderungen an Bakterien- und Pilzstämmen, die als Kontrollstämmen eingesetzt werden	DIN 58 959 Teil 6
--	---	---

Medical microbiology; quality assurance
in medical microbiological laboratories;
requirements for bacterial and fungal
strains which serve as control strains

Einsprüche bis 29. Feb 1992

Anwendungswarnvermerk
auf der letzten Seite beachten!

Vorgesehen als
Ersatz für
DIN 58 941 T 2/05.84 und
DIN 58 941 T 3/05.84

Inhalt

		Seite			Seite
1	Anwendungsbereich und Zweck	2	4.1.3.3	Ab Agarkultur	5
			4.1.3.4	Ab L-Trocknung (Vakuumtrocknung)...	5
2	Begriffe	2	4.1.3.5	Ab sterilem Trägermaterial (z. B. Sand, Silica-Gel usw.)	5
2.1	Kulturmedien	2			
2.2	Referenzstamm	2	4.1.3.6	Ab flüssigem Stickstoff	5
2.3	Stammkultur	2	4.1.4	Eingangskontrolle	5
2.4	Gebrauchskultur	2	4.2	Stammkulturen	5
			4.2.1	Möglichkeiten zur Herstellung und Aufbewahrung von Stammkulturen unter Verwendung von Kulturmedien ..	6
3	Allgemeine Anforderungen	2			
3.1	Bakterien- und Pilzstämmen	2	4.2.2	Möglichkeiten zur Herstellung und Aufbewahrung von Stammkulturen ohne Verwendung von Kulturmedien ...	6
3.1.1	Referenzstämmen	2			
3.1.2	Stammkulturen und Gebrauchskulturen	2	4.2.3	Kontrolle	6
3.1.3	Kennzeichnung	2	4.3	Gebrauchskulturen	7
3.1.4	Anzuchtbedingungen	2	4.3.1	Aerobe und anaerobe Bakterien	7
3.2	Bebrütungsdauer und Bebrütungs-temperatur	2	4.3.2	Stamm- und Gebrauchskulturen besonderer Spezies	7
3.3	Aufbewahrung und Lagerzeitkonser-vierung von Bakterien und Pilzen ...	3	4.3.3	Pilze	7
3.4	Sicherheitsmaßnahmen	3	4.3.4	Kontrolle	7
4	Anzucht und Kontrolle	3	5	Maximal zulässige Einsatzzeit-spannen für Stamm- und Gebrauchs-kulturen	7
4.1	Referenzstämmen	3			
4.1.1	Bezugsquellen	3	5.1	Stammkulturen für Bakterien und Pilze	7
4.1.2	Anzucht	3	5.2	Gebrauchskulturen von Bakterien und Pilzen	8
4.1.2.1	Ab Lyophilisat (gefriergetrocknete Kulturen	3			
4.1.2.1.1	Öffnen der Einzelampulle	3	6	Vernichtung	8
4.1.2.1.2	Öffnen der Einzelampulle mit einge-schlossenem Wattestopfen	4	7	Stammkartei	8
4.1.2.1.3	Öffnen der Doppelampulle	5	8	Prüfung	8
4.1.2.1.4	Öffnen der Spritzampullen-fläschchen	5			
4.1.2.1.5	Vernichten von kontaminiertem Ampullenmaterial	5			
4.1.3	Anzüchtung und Bebrütung	5			
4.1.3.1	Bebrütung	5			
4.1.3.2	Ab eingefrorene Kulturen	5			
4.1.3.2.1	Ohne Trägermaterial	5			
4.1.3.2.2	Mit Träger (Glasperlen, Kapillaren, Papierblättchen, Papierstreifen, Halme usw.)	5			

Fortsetzung Seite 2 bis 10

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



Documents

Document Sharing Hub

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm gilt für alle Kontrollstämme von Bakterien und Pilzen, die als Referenzstämme, Stamm- und Gebrauchskulturen zur Qualitätssicherung im medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium im Rahmen der Qualitätssicherung eingesetzt werden.

Diese Norm spezifiziert die standardisierte Züchtung, Lagerung, Bereitstellung und laufende Kontrolle von definierten und einheitlichen Reinkulturen, die als Kontrollstämme zur Qualitätssicherung eingesetzt werden, um reproduzierbare Resultate und eine gesicherte mikrobiologische Diagnostik zu ermöglichen.

2 Begriffe

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

Begriffe zum Qualitätssicherungssystem nach DIN 58 959 Teil 1 *).

2.1 Kulturmedien

Kulturmedien für Bakteriologie nach DIN 58 942 Teil 1.

2.2 Referenzstamm

Ein Referenzstamm ist ein von Kulturensammlungen (siehe Beiblatt 1 zu DIN 58 959 Teil 7 *) erhältlicher, katalogisierter und in seinen Merkmalen charakterisierter und definierter Bakterien- oder Pilzstamm, der bei der Qualitätssicherung eingesetzt wird.

2.3 Stammkultur

Eine Stammkultur ist eine Subkultur eines Referenzstammes, die in den einzelnen Laboratorien weitergezüchtet und aufbewahrt wird. Sie dient als Ausgangsmaterial für die Gebrauchskulturen (= Kontrollstämme) im mikrobiologischen Laboratorium.

2.4 Gebrauchskultur

Eine Gebrauchskultur ist eine Subkultur von Stammkulturen, die als Ausgangsmaterialien (= Kontrollstämme) für die Qualitätssicherung dienen.

3 Allgemeine Anforderungen

3.1 Bakterien- und Pilzstämme

3.1.1 Referenzstämme

Referenzstämme sind von Kulturensammlungen zu beziehen und müssen in geeigneten, z. B. in den von den Kulturensammlungen empfohlenen Kulturmedien angezüchtet werden. Sie müssen auf Reinheit und stammetypische Merkmale untersucht und anschließend in ein empfohlenes Stammkulturmedium überimpft bzw. aufbewahrt werden, siehe Abschnitt 3.3 und Abschnitt 4.1.4.

3.1.2 Stammkulturen und Gebrauchskulturen

Stammkulturen und Gebrauchskulturen müssen in ihren Merkmalen mit den Merkmalen des Referenzstammes übereinstimmen. Sie müssen die entsprechenden Merkmale besitzen, die bei der Qualitätskontrolle von Bedeutung sind.

Bewährte Methoden zur Herstellung und Aufbewahrung von Stamm- und Gebrauchskulturen zur Qualitätssicherung sind im Beiblatt 1 und Beiblatt 2 zu DIN 58 959 Teil 6 *) aufgeführt.

3.1.3 Kennzeichnung

Die Referenzstämme sind durch Angabe des abgekürzten Namens der Sammlung, der Sammlungsnummer und einer taxonomischen Bezeichnung eindeutig gekennzeichnet (z. B. *E. coli* DSM 1103); ATCC- und DSM-Nummern siehe Beiblatt 2 zu DIN 58 959 Teil 7 *).

Bei der laborinternen Kennzeichnung der Stamm- und Gebrauchskulturen sollten die Empfehlungen der ECCO (European Culture Collection Curator's Organisation) eingehalten werden [1]:

- Die Stämme sind nur mit der vollen Bezeichnung zu verwenden.
- Wurden die Stämme ursprünglich von einer Kulturensammlung bezogen und im eigenen Laboratorium weiter subkultiviert und als Kontrollstämme aufbewahrt, werden sie mit der ursprünglichen Nummer und einem Zusatz neu gekennzeichnet. Der Zusatz kann numerisch oder alphanumerisch gewählt werden. Es ist anzuraten, als Zusatz einen speziellen Code zu verwenden, der Bezug auf die Firma bzw. das Laboratorium nimmt (z. B. aus *E. coli* DSM 1103 wird *E. coli* DSM 1103/LAB3, wobei LAB3 das Laboratorium ist, in dem der Kontrollstamm aufbewahrt wird).
- Stammt der Kontrollstamm nicht aus einer ECCO-Kulturensammlung wird der Stamm neu gekennzeichnet mit der Ursprungsbezeichnung und dem Kontrollcode des Laboratoriums oder vorzugsweise mit dem Kontrollcode des Laboratoriums und einer Nummer oder einer Kombination von Buchstaben und Ziffern, die in der Stammkartei die genaue Bezeichnung und Herkunft des Stammes erkennen lassen müssen (siehe Abschnitt 7).
- Jede Änderung der Stammeseigenschaften und Weiterzüchtung dieses Stammes bedingt eine Änderung des Zusatzes der Identifikationsnummer.

Nicht gekennzeichnetes Material bzw. ein Stamm ohne Identifikationsnummer darf nicht verwendet werden.

3.1.4 Anzuchtbedingungen

Die Kulturmedien zur Aufbewahrung von Stamm- und Gebrauchskulturen dürfen keine Selektivmedien sein.

Zur Aufbewahrung von Stammkulturen sollten die Kulturmedien keine Kohlenhydrate enthalten.

Gebräuchliche Kulturmedien [2], [3], sofern nicht anders angegeben, zur Anzüchtung von Referenzstämmen sowie die Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sind in den Handbüchern der Kulturensammlungen sowie im Beiblatt 1 und Beiblatt 2 zu DIN 58 959 Teil 6 *) aufgeführt.

3.2 Bebrütungsdauer und Bebrütungstemperatur

Die Bebrütung der Stamm- und Gebrauchskulturen erfolgt für Bakterien bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 24 bis 48 h, für Pilze bei 22 bis 25 °C für 5 bis 16 d, je nach Reifezeit des Pilzes (als Richtwert 10 d) bzw. 72 h bei Hefen, sofern im Einzelfall keine abweichende Temperatur oder Bebrütungszeit empfohlen wird oder organismenbedingt anzuwenden ist.

*) Z. Z. Entwurf

3.3 Aufbewahrung und Lagerzeitkonservierung von Bakterien und Pilzen

Für die Aufbewahrung von Bakterien- und Pilzkulturen im Laboratorium stehen neben der Gefriertrocknung zahlreiche und einfache Methoden zur Langzeitkonservierung zur Verfügung, die jedoch nicht für alle Spezies gleichermaßen geeignet sind [2], z. B.

- Trocknen in sterilem Sand, wasserfreiem Silica-Gel oder Molekularsieben
- Trocknen an Glas- oder Keramikperlen
- Trocknen in Gelatineplättchen
- Vakuumtrocknung (L-Trocknung)
- Gefriertrocknung (Ein- oder Doppelampullenmethode)
- Einfrieren bei etwa - 80 °C
- Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff

Bakterienkulturen werden auch heute noch zu oft durch regelmäßiges Überimpfen auf frische Kulturmedien über längere Zeiträume konserviert. Neben erheblichem Zeit- und Materialaufwand sprechen noch weitere Punkte gegen dieses (Subkultur) Verfahren:

- Kontamination
- Selektion von Mutanten
- Verlust stammetypischer Eigenschaften
- Änderung des Resistenzverhaltens
- Verwechslung der Kontrollstämmen beim Überimpfen
- Falsche Beschriftung/Bezeichnung

Neben den noch verwendeten Methoden zur Langzeitkonservierung, siehe Tabelle 1 und Tabelle 2 sowie Beiblatt 1 und Beiblatt 2 zu DIN 58 959 Teil 6 *) haben sich miniaturisierte Verfahren zur Tieftemperaturlagerung (Behälter mit flüssigem Stickstoff, Tiefkühlschrank bzw. Tiefkühltruhe) als besonders vorteilhaft erwiesen. Hierbei werden Zellsuspensionen in Kunststoffhalmen, Glas- oder Keramikperlen, Glas- oder Kunststoffkapillaren als Träger eingefroren [2].

Bewährte Methoden sind im Beiblatt 1 und Beiblatt 2 zu DIN 58 959 Teil 6 *) beschrieben.

3.4 Sicherheitsmaßnahmen

Die als Referenzstämmen vorgesehenen Bakterien- und Pilzstämmen sind mit einem unterschiedlichen Risiko für den Arbeitsausführenden und die Umwelt behaftet. Der Umgang mit solchen Kulturen erfordert entsprechende sicherheitstechnische Maßnahmen nach DIN 58 956 Teil 1 und [4].

Kulturen sind nur durch fachlich vorgebildete oder durch unterwiesene Personen zu bearbeiten. Entsprechend der jeweiligen Risiko-Gruppe darf mit Bakterien- und Pilzstämmen nur in Laboratorien Typ 2, Typ 3 oder Typ 4 nach DIN 58 956 Teil 1 und [4], gegebenenfalls in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 1, 2 oder 3 nach DIN 12 950 Teil 10 gearbeitet werden.

Darüber hinaus sind die Empfehlungen nach [5], [6] und [7] zu beachten.

4 Anzucht und Kontrolle

4.1 Referenzstämmen

4.1.1 Bezugsquellen

Um reproduzierbare Resultate bei mikrobiologischen Prüfverfahren und der Qualitätssicherung zu erhalten, ist die Bereitstellung von einheitlichem und standardisiertem Versuchsmaterial erforderlich. Die Referenzstämmen, die für die Qualitätssicherung eingesetzt werden, sind daher von Kulturensammlungen zu beziehen. Bezugsquellen sind im Beiblatt 1 zu DIN 58 959 Teil 7 *) aufgeführt.

4.1.2 Anzucht

Die Anzucht ist unter Beachtung der von den Kulturensammlungen beigelegten Informationen bzw. in deren Katalogen ausgedruckten Hinweise und Methoden durchzuführen.

Sofern nicht anders angegeben, erfolgt die Anzucht für Bakterien in Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon oder -Agar bei $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ für 24 bis 48 h, für Pilze bei 20 bis 28 °C für 2 bis 7 d in Sabouraud-, Malzextrakt- oder Czapek-Dox-Medium, bei Hefen z. B. in supplementiertem Yeast-Nitrogen (YN)-Medium.

4.1.2.1 Ab Lyophilisat (gefriergetrocknete Kulturen)

Das Öffnen von Ampullen gefriergetrockneter Kulturen erfolgt nach den Abschnitten 4.1.2.1.1 bis 4.1.2.1.5.

Zur Zeit sind 5 verschiedene Arten von Ampullen in Gebrauch (siehe Abschnitt 4.1.2.1.1, Bild 1 bis Bild 5).

Die Ampullentypen der verschiedenen Kulturensammlungen und deren Öffnung sind unter Abschnitt 4.1.2.1.1 und Abschnitt 4.1.2.1.2 zusammengefaßt.

4.1.2.1.1 Öffnen der Einzelampulle

Die Ampulle wird mit einem Glasmesser etwa in halber Höhe rundherum angeritzt (siehe Pfeil) und anschließend oberflächendesinfiziert (z. B. 5 min einlegen in sporenfreiem Ethanol mit einer Volumenkonzentration von 80 %).

Danach wird die Ampulle mit einem sterilen Watte- oder Filzstreifen, steriler Gaze oder sterilem Zellstoff umwickelt und an der angeritzten Stelle aufgebrochen.

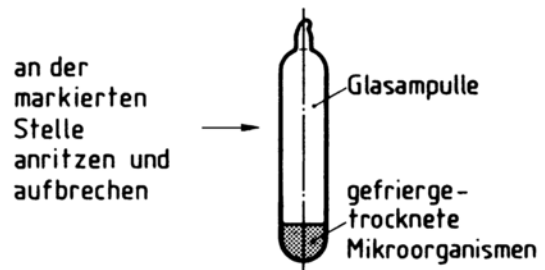


Bild 1. Einzelampulle (Typ 1 nach NRRL 1)) (einfache, einwandige Ampulle ohne Wattestopfen)

*) Z. Z. Entwurf

1) Abkürzungen der Kulturensammlungen siehe Beiblatt 1 zu DIN 58 959 Teil 1 (z. Z. Entwurf)