

DIN EN ISO 20776-1

ICS 11.100.20

Einsprüche bis 2018-09-06
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 20776-1:2007-02

Entwurf

**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/DIS 20776-1:2018);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 20776-1:2018**

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: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial
agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases
(ISO/DIS 20776-1:2018);
German and English version prEN ISO 20776-1:2018

Systèmes d'essais en laboratoire et de diagnostic in vitro –
Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour
antibiogrammes –
Partie 1: Méthode de référence pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents
antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies
infectieuses (ISO/DIS 20776-1:2018);
Version allemande et anglaise prEN ISO 20776-1:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-07-06 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-
Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de,
sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an named@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann
im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-
Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED), 10772 Berlin, Burggrafenstr. 6,
10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 54 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED)



Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20776-1:2018) 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).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 20776-1:2007-02 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Überarbeitung ausschließlich für Leistungsanforderung an Bouillon-Mikroverdünnung;
- b) Streichen der Begriffsbestimmungen und Informationen zu S,I, R Breakpoint;
- c) Tabellen wurden in Anhänge verschoben;
- d) Streichen der Tabelle über Qualitätskontrollbereiche;
- e) Aktualisierung der Tabelle über Lösungsmittel und Verdünnungsmittel zur Herstellung von weltweit eingesetzten antimikrobiellen Substanzen (jetzt Anhang B);
- f) Aktualisierung der Angaben über spezielle Kulturmedien und die Leistungsfähigkeit von Verfahren für spezifische, gegenwärtig verwendete antimikrobielle Substanzen wurden aktualisiert.

**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/DIS 20776-1:2018)**

Systèmes d'essais en laboratoire et de diagnostic in vitro — Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes — Partie 1 : Méthode de référence pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses (ISO/DIS 20776-1:2018)

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: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases (ISO/DIS 20776-1:2018)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	4
Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Internationalen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EU-Richtlinie 98/79	5
Vorwort	6
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich.....	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Testverfahren	10
4.1 Allgemeines.....	10
4.2 Medium.....	10
4.3 Antibiotika.....	10
4.3.1 Allgemeines.....	10
4.3.2 Herstellung der Stammlösungen.....	10
4.3.3 Herstellung der Arbeitslösungen.....	11
4.3.4 Vorbereitung der Mikrotitrationsplatten	11
4.3.5 Lagerung der Mikrotitrationsplatten	11
4.4 Vorbereitung des Inokulums.....	12
4.4.1 Allgemeines.....	12
4.4.2 Flüssigkulturmethode	12
4.4.3 Direkte Koloniesuspensionsmethode	12
4.5 Inokulation der Mikrotitrationsplatten.....	13
4.6 Inkubation der Mikrotitrationsplatten.....	13
4.7 Ablesung der Ergebnisse	13
4.8 Spezielle Testsituationen, in denen die MHK-Werte unzuverlässig sein können	13
5 Qualitätskontrolle.....	14
Anhang A (normativ) Vorgaben für Mueller-Hinton-Bouillon	15
A.1 Allgemeines.....	15
A.2 Testung nicht-anspruchsvoller Erreger in Mueller-Hinton-Bouillon	15
A.2.1 Allgemeines.....	15
A.2.2 Kationeneinstellung und -konzentration	15
A.2.3 Einstellung des Mueller-Hinton-Referenzmediums zur Mikroduplikation bei Untersuchung bestimmter Bakterienspezies und sonstiger antimikrobieller Wirkstoffe	16
A.2.4 Weitere Nährmediumfragen, für die bisher keine internationalen Normen vorliegen.....	17
Anhang B (normativ) Lösungsmittel und Verdünnungsmittel zur Herstellung von Stammlösungen ausgewählter Antibiotika.....	18
Anhang C (normativ) Herstellung gebrauchsfertiger Verdünnungen von Antibiotikallösungen zur Verwendung in MHK-Tests mit Dilutionsmethoden [8]	24
Anhang D (informativ) Spezielle Testsituationen.....	25
D.1 Allgemeines.....	25
D.2 Spezielle Testsituationen	25
D.2.1 Anspruchsvolle aerobe und fakultativ anaerobe Bakterienspezies (z. B. Haemophilus)	25

D.2.2	Mecillinam	25
D.2.3	Fosfomycin.....	25
	Literaturhinweise	26

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20776-1:2018) 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.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird ISO 20776-1:2006 ersetzen.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 20776-1:2018 wurde von CEN als prEN ISO 20776-1:2018 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Anhang ZA (informativ)

Zusammenhang zwischen dieser Internationalen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EU-Richtlinie 98/79

Durch Vereinbarung zwischen ISO und CEN wurde festgelegt, dass dieser CEN-Anhang in der DIS und in der FDIS enthalten ist, jedoch nicht in der veröffentlichten ISO-Norm.

Diese Internationale Norm wurde im Rahmen eines Mandates, das dem CEN von der Europäischen Kommission und der Europäischen Freihandelszone erteilt wurde, erarbeitet, um ein Mittel zur Erfüllung der grundlegenden Anforderungen der Richtlinie nach dem neuen Konzept 98/79 bereitzustellen.

Sobald diese Norm im Amtsblatt der Europäischen Union im Rahmen der betreffenden Richtlinie in Bezug genommen und in mindestens einem der Mitgliedstaaten als nationale Norm umgesetzt worden ist, berechtigt die Übereinstimmung mit den normativen Abschnitten dieser Norm innerhalb der Grenzen des Anwendungsbereichs dieser Norm zu der Annahme, dass eine Übereinstimmung mit den entsprechenden grundlegenden Anforderungen der Richtlinie und der zugehörigen EFTA-Vorschriften gegeben ist.

WARNUNG — Für Produkte, die in den Anwendungsbereich dieser Norm fallen, können weitere Anforderungen und weitere EU-Richtlinien anwendbar sein.

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 Bouillonmikrodilution bezieht;
- Definitionen und Angaben zu den Breakpoints für S, I und R gelöscht;
- eingebettete Tabellen in die Anhänge verschoben;
- Tabelle zum Qualitätslenkungsbereich entfernt;
- Tabelle (jetzt Anhang B) der global eingesetzten Lösungs- und Verdünnungsmittel für Antibiotika aktualisiert;
- aktualisierte Angaben zu speziellen Nährmedien und Verfahren für bestimmte derzeit eingesetzte Antibiotika.

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

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 in der antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung Dilutionsmethoden verwendet. Die MHK-Bestimmung wird eingesetzt zur Resistenzüberwachung, zur Festlegung identifizierender Wildtyp-Phänotypen, 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. Sorgfältige Qualitätskontrolle und Standardisierung sind unerlässlich, um innerhalb und zwischen Labors reproduzierbare Ergebnisse bei den Bouillon-MHK-Untersuchungen zu erzielen. Die MHK-Werte erstrecken sich meist über zwei bis drei Stufen der Verdünnungsverdoppelung und weisen einen dominanten Median auf.

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 standardisiertem Mueller-Hinton-Medium (Volumen $\leq 200 \mu\text{l}$) gut wachsen, wobei das Medium je nach dem zu untersuchenden Antiinfektivum gegebenenfalls zu modifizieren ist.

Die in diesem Teil der ISO 20776 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 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 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 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. Allerdings gehört die klinische Interpretation nicht zur Zielsetzung dieses Teils der ISO 20776. Diese Modifikationen sind in einem separaten Anhang dieses Dokuments aufgeführt. Es ist erforderlich, andere Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung (z. B. mittels Plattendiffusion oder Diagnosegeräten) anhand der Ergebnisse dieser Referenzmethode zu kalibrieren, um vergleichbare und reproduzierbare 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:

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

3.1 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 1 zum Begriff: Desinfektionsmittel, Antiseptika und Konservierungsmittel sind nicht inbegriffen.

3.2 Antibiotika — Eigenschaften

3.2.1

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 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.

3.2.2

Konzentration

Gehalt eines Antibiotikums in einem definierten Flüssigkeitsvolumen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Konzentration wird in mg/l angegeben.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die designierte ISO-Einheit ist mg/l.

3.3

Stammlösung

Ausgangslösung für weitere Verdünnungen

3.4

Minimale Hemmkonzentration

MHK

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

Anmerkung 1 zum Begriff: Die MHK wird in mg/l angegeben.

3.5

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

3.6

Wildtyp

Isolat ohne bekannte Resistenzmechanismen gegen ein Antibiotikum

3.7

Referenzstamm

katalogisierter und charakterisierter Bakterienstamm mit stabilem, definiertem Empfindlichkeitsphänotyp und/oder -genotyp

Anmerkung 1 zum Begriff: Referenzstämme werden als Stammkulturen geführt, von denen Arbeitskulturen angeimpft werden. Sie können von Stammsammlungen bezogen werden und dienen der Qualitätskontrolle.

3.8 Empfindlichkeitsprüfung

3.8.1

Dilutionsmethode

Technik, bei der eine Serie von Behältern mit Antibiotikallösungen schrittweise steigender Konzentration (üblicherweise in Zweierschritten) und einem Medium mit definiertem Inokulum beschickt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Zweck der Prozedur ist die Bestimmung der MHK.

3.8.2

Mikrodilution

Dilutionsmethode, die in Mikrotitrationsplatten mit einem Fassungsvermögen von $\leq 200 \mu\text{l}$ je Vertiefung durchgeführt wird

3.9

Bouillon

flüssiges Medium zur *in-vitro*-Anzucht von Bakterien

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei dem Bouillon-Referenzverfahren handelt es sich um standardisiertes Mueller-Hinton-Medium (siehe Anhang A).

3.10

Inokulum

Anzahl der Bakterien in einer Suspension, bezogen auf das Endvolumen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Dichte des Inokulums wird in koloniebildenden Einheiten je Milliliter (CFU/ml) angegeben.

3.11

Inokulumeffekt

Verschiebung der MHK bei Änderung der Inokulumkonzentration

4 Testverfahren

4.1 Allgemeines

Die Tests werden in Polystyrol-Mikrotitrationsplatten durchgeführt. Antibiotika-Arbeitslösungen werden in Aliquots von 50 µl (das Inokulum wird dann ebenfalls in einem Volumen von 50 µl zugegeben) oder 100 µl vorgelegt (das Inokulum wird dann in einem Volumen von maximal 10 µl zugegeben).

4.2 Medium

Als Medium dient Mueller-Hinton-Bouillon (nähere Angaben siehe Anhang A bzw. Anhang D für spezielle Testsituationen).

4.3 Antibiotika

4.3.1 Allgemeines

Antibiotika müssen direkt vom Hersteller oder von zuverlässigen Lieferanten bezogen werden. Für den klinischen Einsatz bestimmte pharmazeutische Präparate sind zur MHK-Testung nicht geeignet. Die Substanzen müssen als Pulver mit Chargennummer, Angabe der Potenz, Haltbarkeitsdatum und Empfehlungen zur Lagerung geliefert werden. Die Antibiotika müssen in dicht verschlossenen Behältern mit Trocknungsmittel lichtgeschützt bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur gelagert werden. Hygroskopische Substanzen sollten in Aliquots aufgeteilt werden, von denen jeweils eines je Testserie verwendet wird.

Um Kondenswasserbildung zu vermeiden, die Behälter vor dem Öffnen auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

4.3.2 Herstellung der Stammlösungen

Zum Abwiegen der Antibiotika ist eine geeichte Analysenwaage zu verwenden. Um die Potenz des jeweiligen Präparats bei der Bestimmung der Substanzmengen bzw. Lösungsmittelvolumina zu berücksichtigen, muss die folgende Gleichung verwendet werden:

$$m = \frac{V \times \rho}{P} \quad (1)$$

$$V = \frac{m \times P}{\rho} \quad (2)$$

Dabei ist

- ρ die Konzentration der Stammlösung in mg/l;
- m die Masse der Trockensubstanz in g;
- P die Potenz des Präparats (Trockensubstanz) in mg/g;
- V das Lösungsmittelvolumen in l.

Die Konzentration der Stammlösungen sollte 1 000 mg/l nicht unterschreiten, wobei jedoch die Löslichkeit einiger Substanzen ein limitierender Faktor ist. Die in den Tests eingesetzten Konzentrationen der Stammlösungen richten sich nach der Methode zur Herstellung der Arbeitslösungen (Verdünnungsreihen). Falls keine abweichende Herstellerempfehlung vorliegt, sollten die Substanzen in sterilem destilliertem Wasser verdünnt werden. Bei einigen Antibiotika müssen andere Lösungsmittel eingesetzt werden (siehe Anhang B).

ANMERKUNG Bei neueren, nicht in Anhang B des vorliegenden Dokuments aufgeführten antimikrobiellen Substanzen sind für den jeweiligen Wirkstoff die Herstellerangaben zu den bestmöglichen Lösungs- und Verdünnungsmitteln zu beachten. Auf eine Sterilisation der Lösungen kann üblicherweise verzichtet werden. Falls erforderlich, sollte die Sterilisation durch Membranfiltration erfolgen. Die Wirkstoffkonzentrationen der Lösungen vor und nach Filtration sollten mit einem geeigneten Assay verglichen werden, um sicherzustellen, dass keine Verluste durch Adsorption eingetreten sind.

Falls keine Angaben zur Stabilität der Stammlösungen unter bestimmten Lagerbedingungen vorliegen, sollten sie für jede Testserie frisch angesetzt werden.

4.3.3 Herstellung der Arbeitslösungen

Der geeignete Konzentrationsbereich hängt sowohl vom Erreger als auch vom getesteten Antibiotikum ab. Der geeignete Konzentrationsbereich muss die vollständige MHK-Endpunktbestimmung der jeweiligen Referenzstämme erlauben. Ausgehend von 1 mg/l als Basiskonzentration werden Konzentrationsreihen mit jeweils zweifachen Verdünnungsschritten in Mueller-Hinton-Bouillon angesetzt. Verdünnungen sollten nicht durch Verdünnungsreihen erstellt werden, sondern nach der in Anhang C beschriebenen Vorgehensweise. Falls keine Informationen zur Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Lösungen vorliegen, müssen diese am Tag der Zubereitung verwendet werden.

4.3.4 Vorbereitung der Mikrotitrationsplatten

Die gebrauchsfertigen Verdünnungen werden in Mikrotitrationsplatten pipettiert, und zwar je 50 µl je Vertiefung bei doppelter Endkonzentration oder 100 µl je Vertiefung bei einfacher Endkonzentration.

Mindestens eine Vertiefung mit 50 µl bzw. 100 µl antibiotikafreier Lösung sollte als positive Wachstumskontrolle für jeden getesteten Stamm mitgeführt werden. Zusätzlich sollte für jede getestete Art von Erreger als Negativkontrolle eine Vertiefung mit 100 µl antibiotikafreier Lösung ohne Inokulum vorgesehen werden.

4.3.5 Lagerung der Mikrotitrationsplatten

Die befüllten Mikrotitrationsplatten dürfen entweder sofort verwendet oder für bis zu 3 Monate aufbewahrt werden bzw. bis die dokumentierte Qualitätskontrolle oder sonstiger Nachweis den Abbau der antimikrobiellen Substanz belegt. Dazu sollten die Platten in Plastikbeutel eingeschweißt und sofort bei $\leq -60^\circ\text{C}$ eingefroren werden, es sei denn, die verwendeten Antibiotika sind auch bei höherer Temperatur stabil.

Mikrotitrationsplatten dürfen nicht in Gefrierschränken mit automatischer Enteisung gelagert werden. Aufgetaute Antibiotikallösungen dürfen nicht wieder eingefroren werden, da wiederholte Einfrier-/Auftau-Zyklen den Zerfall einiger Wirkstoffe, vor allem der β -Lactamasen, beschleunigen.

Tiefgekühlte Mikrotitrationsplatten sollten über einen Zeitraum bis zu 2 h auftauen und innerhalb von 4 h nach Entnahme aus dem Gefrierschrank beimpft werden.

4.4 Vorbereitung des Inokulums

4.4.1 Allgemeines

Die Standardisierung des Inokulums ist von ausschlaggebender Bedeutung für die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Empfindlichkeitsprüfung mit Dilutionsmethoden. Für jedes Isolat, das mit dieser Referenzmethode getestet wird, muss daher sowohl die Reinheit als auch die Zelldichte in koloniebildenden Einheiten bestimmt werden.

4.4.2 Flüssigkulturmethode

Das Inokulum darf entweder mittels Verdünnung einer Flüssigkultur gewonnen werden oder durch Suspension von über Nacht auf nichtselektiven Agarmedien gewachsenen mehreren morphologisch ähnlichen Kolonien (wenn möglich) in Nährmedium; hierbei kommt eine Impföse oder ein Watteträger zum Einsatz. Zur Vermeidung einer Kontamination mit anderen Spezies und atypischen Varianten derselben Spezies sollten bei der Suspension von Kolonien morphologisch ähnliche Kolonien aufgenommen werden.

Das Nährmedium darf die Aktivität des getesteten Antibiotikums nicht inhibieren. Die Flüssigkultur wird bei $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ inkubiert, bis ihre Trübung mindestens dem McFarland-Standard 0,5 entspricht [4]. Falls erforderlich, wird die Kultur durch Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung oder Medium auf diesen Trübungsgrad eingestellt. Dazu kann ein Photometer (Absorption 0,08 bis 0,13 bei 625 nm Wellenlänge in 1-cm-Küvetten) oder ein geeichtes Nephelometer verwendet werden. Alternativ können Inokulum und der McFarland-Standard 0,5 vor einem weißen Hintergrund mit schwarzen Linien visuell verglichen werden (Inokulum und Standard in gleichartigen Röhrchen). Auch jede andere Methode, mit der sich reproduzierbare Zelldichten (CFU/ml) einstellen lassen, kann verwendet werden. Die Zelldichte des Inokulums im Testansatz muss 5×10^5 CFU/ml betragen (Bereich: 2×10^5 CFU/ml bis 8×10^5 CFU/ml).

ANMERKUNG Herstellung eines McFarland-Standards 0,5: 0,5 ml einer 0,048-molaren Bariumchloridlösung (BaCl_2) ($11,72 \text{ g/l BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) unter ständigem Rühren zu 99,5 ml Schwefelsäure (H_2SO_4) 0,18 mol/l pipettieren.

4.4.3 Direkte Koloniesuspensionsmethode

Mehrere auf nichtselektivem Agar gewachsene, morphologisch ähnliche Kolonien [Inkubation bei $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 18 h bis 24 h; falls erforderlich, auch länger] werden mit einer Impföse aufgenommen und in steriles Medium oder physiologische Kochsalzlösung transferiert. Die Suspension wird auf eine Trübung von McFarland-Standard 0,5 eingestellt, wie in 4.4.2 für Flüssigkulturen beschrieben.

Die Dichte lebensfähiger Zellen im gebrauchsfertigen Inokulum hängt bei allen Bakterien von der Wachstumsphase der Kultur ab. Der Effekt ist bei anspruchsvollen Keimen wie *Streptococcus pneumoniae* besonders ausgeprägt, hier kann die Verwendung älterer Kulturen zu einer signifikanten Reduktion der Dichte lebensfähiger Zellen im Inokulum führen.

Mit einer der beiden Methoden hergestellte bakterielle Suspensionen häufigerer klinisch relevanter Spezies enthalten bei korrekt eingestellter Dichte etwa $1 - 2 \times 10^8$ CFU/ml.

Das wie beschrieben hergestellte und dichteadjustierte Inokulum wird in Nährbouillon auf eine Arbeitszelldichte von 5×10^5 CFU/ml (Bereich 2×10^5 CFU/ml bis 8×10^5 CFU/ml) eingestellt. Die jeweils benötigte Verdünnung hängt von der Bakterienspezies und dem Inokulationsmodus ab. Der Transfer von

0,1 ml einer standardisierten Suspension von Mikroorganismen in ein Röhrchen mit 9,9 ml (Dilution 1 : 100) Nährbouillon ergibt eine Suspension von 1×10^6 CFU/ml; nach Zugabe von 50 µl dieser Suspension zu einem Aliquot (50 µl) einer Antibiotikumlösung liegt letztendlich ein Inokulum mit 5×10^5 CFU/ml gramnegativer Bakterien vor (beispielsweise *Escherichia coli*). Enthalten die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatte 100 µl Nährlösung mit Antibiotikum, sollte die Zellsuspension so eingestellt werden, dass das benötigte Inokulum in 10 µl Volumen enthalten ist. Es können unterschiedliche Verdünnungen der auf McFarland-Standard 0,5 eingestellten Suspension erforderlich sein; die geeignete Verdünnung ist in Vorversuchen festzulegen [5].

4.5 Inokulation der Mikrotitrationsplatten

Die Inokulation der Mikrotitrationsplatten muss binnen 30 min nach Standardisierung der Inokulumsuspension erfolgen, um die Dichte lebender Zellen möglichst konstant zu halten. In jede Vertiefung, die 50 µl Nährmedium mit Antibiotikaverdünnung (siehe 4.3) enthält, werden 50 µl Bakteriensuspension (siehe 4.4) pipettiert. Werden 100 µl Antibiotikaverdünnung vorgelegt, sollte das zugegebene Inokulum ein Volumen von maximal 10 µl haben.

Zur Kontrolle der Zelldichte im Testansatz, die etwa 5×10^5 CFU/ml betragen sollte, sind Keimzahlbestimmungen vorzunehmen. Dazu sind 10 µl der Positivkontrolle zu entnehmen und in 10 ml Medium oder physiologischer Kochsalzlösung zu verdünnen. 100 µl dieser Verdünnung sind auf einer geeigneten Agarplatte auszustreichen und über Nacht zu inkubieren. Eine geeignete Testsuspension ergibt 20 bis 80 Kolonien. Wenn dies nicht der Fall ist, sollten Korrekturmaßnahmen für den richtigen Inokulumansatz ergriffen werden.

4.6 Inkubation der Mikrotitrationsplatten

Um eine Austrocknung der Proben zu verhindern, sollten die Mikrotitrationsplatten vor der Inkubation in Polyethylenbeutel eingeschweißt oder mit einem dicht schließenden Deckel bzw. einer selbstklebenden Abdeckfolie versehen werden. Damit die Mikrotiterplatten nicht ungleichmäßig erwärmt werden, sollten nicht mehr als vier Platten aufeinandergestapelt und der Stapel oben mit einer einzelnen Plattenabdeckung abgedeckt werden.

Falls nicht anders angegeben, werden die Mikrotitrationsplatten für die meisten Antibiotika/Erreger-Kombinationen bei $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ für (18 ± 2) h in normaler Atmosphäre inkubiert. Inkubatoren mit CO₂-angereicherter Atmosphäre sollten nicht verwendet werden.

4.7 Ablesung der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind nur dann abzulesen, wenn eine ausreichende Zelldichte in der Positivkontrolle (Sediment oder deutliche Trübung) erreicht wurde, die nicht inokulierten Proben oder Negativkontrollen (sofern vorhanden) kein Bakterienwachstum zeigen und die Reinheit und adäquate Zelldichte des Inokulums geprüft wurden. Die Zelldichte in jeder Vertiefung wird mit derjenigen der Positivkontrolle verglichen. Die MHK ist die geringste Konzentration, die ein sichtbares Bakterienwachstum vollständig inhibiert. Hierzu gibt es Ausnahmen (beispielsweise schleppende Endpunkte bei Linezolid, partielle Hemmung durch Sulfonamide, unvollständige Hemmung bei einigen Bakteriostatika), denen der Anwender besondere Aufmerksamkeit schenken muss.

4.8 Spezielle Testsituationen, in denen die MHK-Werte unzuverlässig sein können

Es kann vorkommen, dass die MHK nicht die klinisch relevante Aktivität einer Substanz wiedergibt. Daher muss bei einigen Antibiotika die Interpretation der Ergebnisse für klinische Zwecke möglicherweise modifiziert werden. In solchen Fällen muss die Referenzmethode modifiziert werden, etwa durch Veränderung der Inkubationsbedingungen oder des Mediums. Auch bestimmte Resistenzmechanismen werden unter den Bedingungen der Standarddilutionsmethode nicht immer zuverlässig exprimiert, darunter einige β-Lactamasen, Effluxpumpen oder modifizierte Zielstrukturen. In diesen Fällen sollten die

MHK-Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden und andere Anhaltspunkte zur Entscheidung über die klinische Therapie herangezogen werden. In Anhang D (informativ) sind eine Reihe von Antibiotika/Bakterien-Kombinationen aufgeführt, die besondere Aufmerksamkeit erfordern.

5 Qualitätskontrolle

Die Qualität der Testresultate wird durch Mitführen von Referenzstämmen überprüft. Die Ausgangskulturen der Referenzstämmen sollten in lyophilisiertem oder tiefgefrorenem Zustand (–60 °C oder kälter) aufbewahrt werden. Zum Einsatz bei Testungen werden die Ausgangskulturen der Referenzstämmen auf nichtselektiven Agarmedien subkultiviert. Nur von dieser primären Subkultur dürfen binnen einer Woche weitere Subkulturen angelegt werden. Falls verfügbar, sollten an jedem Testtag mindestens zwei relevante Referenzstämmen mitgeprüft werden. Kolonien der Referenzstämmen werden dabei in gleicher Weise aufgearbeitet wie die der Teststämmen. Die MHK-Werte der Referenzstämmen sollten innerhalb der in den neuesten Versionen des CLSI-Dokuments M100 [15] und des EUCAST-Qualitätskontrolldokuments [16] aufgeführten Toleranzbereiche liegen. Die Informationen lassen sich nicht in einer einzigen Qualitätskontrolltabelle zusammenfassen. Unterschiede in den Medien, Referenzstudien, Herstellern der Pulver usw. sind möglicherweise für einige der Unterschiede in den Qualitätskontrollbereichen verantwortlich, die sich auf die Labortestergebnisse auswirken können. Mit der Zeit sind die Qualitätskontrollbereiche möglicherweise nachzujustieren, da dann neue Informationen vorliegen, die in der vorliegenden Revision von ISO 20776-1 noch nicht bekannt waren. Und schließlich sind eventuell auch neue Wirkstoffe hinzuzufügen, die in ISO 20776-1 noch nicht vorlagen. Die standardisierte Durchführung der Mikrodilutionsmethode in Nährbouillon zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung sollte die meisten Unterschiede in den Qualitätskontrollbereichen beschränken, doch sollten Labormitarbeiter und Hersteller von Gerätschaften zur Mikrodilution anhand der angegebenen Dokumente überprüfen, dass die festgelegten Bereiche auch eingehalten werden.

Anhang A (normativ)

Vorgaben für Mueller-Hinton-Bouillon

A.1 Allgemeines

Falls es der getestete Erreger nicht erfordert, sollten außer divalenten Kationen keine weiteren Zusätze verwendet werden.

A.2 Testung nicht-anspruchsvoller Erreger in Mueller-Hinton-Bouillon

A.2.1 Allgemeines

Das Standardmedium für nicht-anspruchsvolle Erreger ist Mueller-Hinton-Bouillon. Die Originalrezeptur wurde wie folgt angesetzt [6]:

- Getrocknete Infusion aus 300 g Rindfleisch
- Caseinhydrolysat 17,5 g
- Maisstärke 1,5 g
- Destilliertes Wasser QSP 1 000 ml
- pH 7,2-7,4

Mueller-Hinton-Bouillon stammt fast immer von einem der zahlreichen kommerziellen Hersteller. Alle Hersteller setzen die Bouillon aus Pulver an und halten sich an die Originalrezeptur für dieses Nährmedium.

A.2.2 Kationeneinstellung und -konzentration

Das Testmedium sollte ausreichende Kationenkonzentrationen aufweisen, um ein adäquates bakterielles Wachstum sicherzustellen und die MHK-Werte der Kontrollstämme in den angegebenen Toleranzbereichen der CLSI- und EUCAST-Dokumente zu halten.

Neue Chargen von Mueller-Hinton-Medium müssen unter Umständen auf ihren Kationengehalt untersucht werden. Dies kann mittels induktiv gekoppelter Plasmaspektroskopie (ICP) oder Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie (FAAS) [7] erfolgen.

Zur Kalzium- und Magnesiumeinstellung werden Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mg/l angesetzt (3,68 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bzw. 8,36 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, jeweils in 100 ml deionisiertem Wasser), mittels Membranfiltration sterilisiert und bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt. Die Zugabe von je 0,1 ml der Kationen-Stammlösungen mit 10 mg/l Kationengehalt zu 1 l Medium erhöht die Kationenkonzentration um 1 mg/l. Bei 4 °C bis 8 °C unter Rühren zugeben.

Für die meisten Antibiotika/Erreger-Kombinationen ergeben sich bei Endkonzentrationen von 20 mg/l bis 25 mg/l Kalzium und 10 mg/l bis 12,5 mg/l Magnesium adäquate MHK-Resultate der Kontrollstämme [8], [9]. Im vorliegenden Dokument bezieht sich die Untersuchung mit Mueller-Hinton-Bouillon auf ein Mueller-Hinton-Nährmedium mit eingestelltem Kationenanteil.

Situationen, bei denen der Kationenanteil der Mueller-Hinton-Bouillon zusätzlich adjustiert werden muss, um reproduzierbare Ergebnisse der antimikrobiellen Empfindlichkeit zu erhalten, finden sich nachstehend im informativen Anhang A.