

ISO 20776-1 (2006) – Anwendung und Fallstricke

Barbara Körber-Irrgang
Michael Kresken

Antiinfectives Intelligence GmbH,
Campus der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, Rheinbach

EUCAST: Methoden zur Empfindlichkeitstestung von Bakterien

[Organization](#)

[EUCAST News](#)

[Clinical breakpoints](#)

[Expert rules](#)

[Setting breakpoints](#)

[MIC distributions](#)

[Zone diameter distributions](#)

Antimicrobial susceptibility testing

[Media preparation](#)

[MIC determination](#)

[Disk diffusion methodology](#)

[Disk diffusion implementation](#)

[Compliance of manufacturers](#)

[Breakpoint tables](#)

[QC Tables](#)

[Calibration and validation](#)

[Guidance documents](#)

[Projects and data submission](#)

[Previous versions of tables](#)

[Antifungal susceptibility testing \(AFST\)](#)

[Frequently Asked Questions \(FAQ\)](#)

[Meetings](#)



search term [Search](#)

... MIC determination

MIC determination of non-fastidious and fastidious organisms

The EUCAST recommendations for MIC determination for non-fastidious organisms are in complete agreement with the recommendations from the International Standards Organisation ([+ ISO](#)).

[+ Media preparation](#)

A document to summarise EUCAST methodology for MIC determination of non-fastidious (MH broth) and fastidious (MH broth with lysed horseblood and beta-NAD) organisms (streptococci including *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *Pasteurella* spp and others) is under preparation.

[+ Quality control tables](#) (ranges and targets of QC organisms)

[✉ Recommend page](#)

EUCAST: Methoden zur Empfindlichkeitstestung von Bakterien

[Organization](#)

[EUCAST News](#)

[Clinical breakpoints](#)

[Expert rules](#)

[Setting breakpoints](#)

[MIC distributions](#)

[Zone diameter distributions](#)

[Antimicrobial susceptibility testing](#)

[Antifungal susceptibility testing \(AFST\)](#)

[Frequently Asked Questions \(FAQ\)](#)

[Meetings](#)

[EUCAST Presentations](#)

Documents

[Rationale Documents](#)

[Standard Operation Procedures](#)

[Discussion documents](#)

[Publications in journals](#)

[Technical notes](#)

[Posters](#)

[Other Documents](#)

External documents

[Reports](#)

[Information for industry](#)

[Links](#)

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Relevant external documents

Here you find other relevant document which were not published by EUCAST

International Organization for Standards (ISO) reference method for clinical laboratory *in vitro* antimicrobial susceptibility testing and evaluation of performance of susceptibility test devices [more](#)

These documents are available for purchase from ISO or national standards organisations. You are advised to check costs as they may differ substantially between suppliers.

ISO 20776-1 (2006)

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: Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.

ISO 20776-2 (2007)

Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices.

[Recommend page](#)

**INTERNATIONAL
STANDARD**

**ISO
20776-1**

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:

Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases

Referenzmethode: MHK-Bestimmung mittels Mikroullondilution

ISO 20776-1: Wesentliche Punkte des Testverfahrens

- Zu verwendende Medien:
 - Kationen-adjustierte Mueller-Hinton Bouillon (CAHMB)
 - CAHMB + 2,5-5% lysiertes Pferdeblut
- Herstellung von Antibiotikaverdünnungen
 - Angabe von Lösungsmitteln und Verdünnungsschema
 - Volumen in Mikrotitrationsplatte
- Vorbereitung des Inokulums
 - Einstellen einer Trübung auf McF Standard 0,5 (1×10^8 KBE/ml)
 - Einstellen der Arbeitszellichte auf 5×10^5 KBE/ml ($2-8 \times 10^5$ KBE/ml)
- Inokulation der Mikrotitrationsplatten: 50 µl AB + 50 µl Inokulum
- Inkubation der Mikrotitrationsplatten: 34-37°C, 16-20 h
- Ablesung der Testergebnisse:
 - Begutachtung der Pos. Kontrolle
 - Ermittlung der minimale Hemmkonzentration

ISO 20776-1:Anwendung und Fallstricke

Medien



Streptokokken-Testmedium



ISO 20776-1 : A.2.3 Testung von Streptokokken

➔ CAMHB + 2,5-5% lysiertes Pferdeblut

EUCAST :

 **EUCAST** EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING
European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Version 2.0
Juni 2012

Herstellen der Medien für den EUCAST Blättchendiffusionstest und für die MHK-Bestimmung mittels Bouillon Mikrodilutionsverfahren

B. Medium für die MHK-Bestimmung mittels Bouillon Mikrodilutionsverfahren

➔ MH-F Bouillon: CAMHB + 5% lysiertes Pferdeblut
+ 20 mg/l β -NAD

Testung von anspruchsvollen Bakterien (außer Streptokokken)



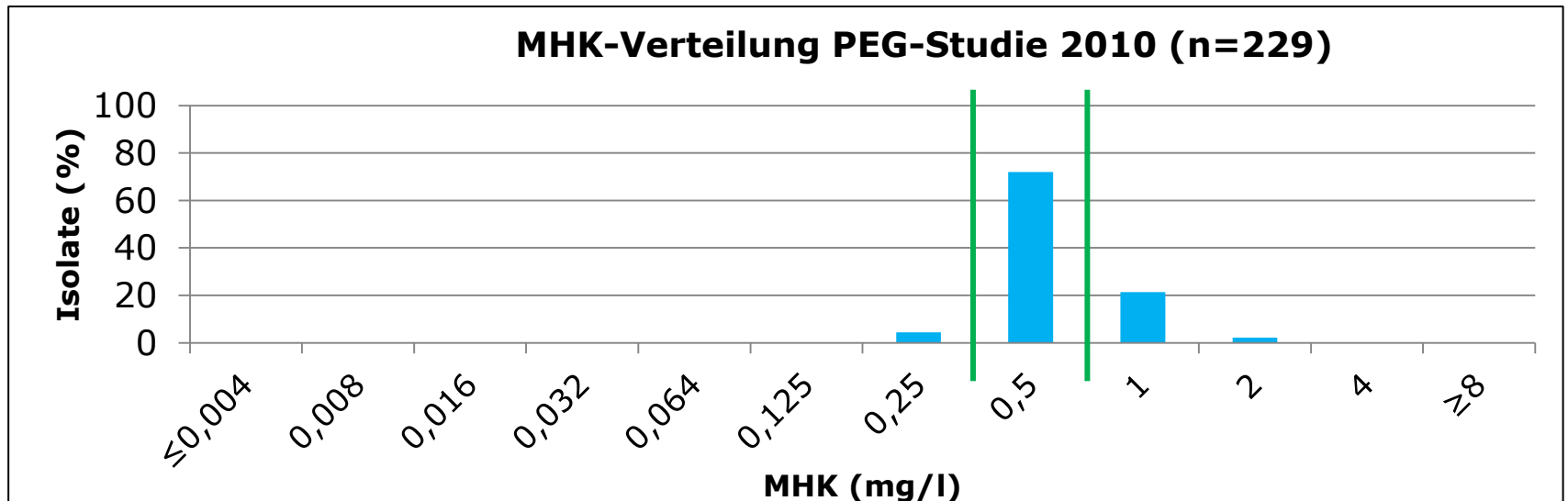
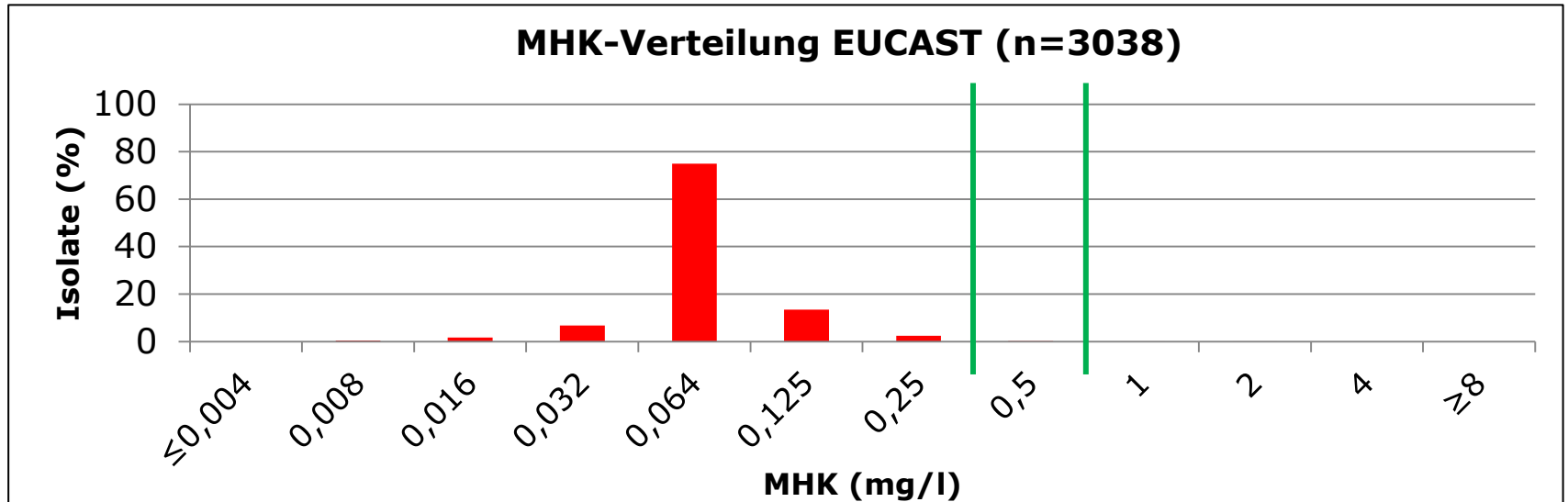
ISO 20776-1 : kein Hinweis auf Methode und Medien

? Was tun ?

Medien zu Testung von *H. influenzae* und *M. catarrhalis*

Spezies	ISO	CLSI	Anbieter von AB-Testpanels	Antiinf. Intell.
<i>H. influenzae</i>	k. A.	HTM-Medium*	Versch. Medien, genaue Angaben zur Zusammensetzung fehlen teilweise	HTM-Medium
<i>M. catarrhalis</i>	k. A.	CAMHB**	Versch. Medien, genaue Angaben zur Zusammensetzung fehlen teilweise	CAMHB + 1% Hefeextrakt

MHK-Häufigkeitsverteilung von Erythromycin bei *M. catarrhalis*



Testung von anspruchsvollen Bakterien (außer Streptokokken)



EUCAST :



Version 2.0
Juni 2012

Herstellen der Medien für den EUCAST Blättchendiffusionstest und für die MHK-Bestimmung mittels Bouillon Mikrodilutionsverfahren

B. Medium für die MHK-Bestimmung mittels Bouillon Mikrodilutionsverfahren

➔ MH-F Bouillon: CAMHB + 5% lysiertes Pferdeblut
+ 20 mg/l β -NAD

➔ Dokument zur Testmethode ist in Vorbereitung

ISO 20776-1: Anwendung und Fallstricke

Inokulum



Einstellen des Inokulums



ISO 20776-1 : 3.4.3 Koloniesuspensionsmethode

- Einstellen der Trübung auf McF Standard 0,5 (1×10^8 KBE/ml)
- 1:200 verdünnen (5×10^5 KBE/ml, $2-8 \times 10^5$ KBE/ml)

Verdünnungen: Labor 1

Erreger	Verdünnung
Staphylokokken Enterokokken Streptokokken	1:200
Enterobacteriaceae, Nonfermenter	1:300
<i>Moraxella</i> spp.	1:100
<i>Haemophilus</i> spp.	1:1000

Verdünnungen: Labor 2

Erreger	Verdünnung
Gram-pos. Bakterien <i>S. pneumoniae</i>	1:100 1:50
Gram-neg. Bakterien	1:200
Anspruchsvolle Bakterien	1:50

Überprüfen des Inokulums: ESBL und MBL-bildende GN-Bakterien



ISO 20776-1 : 3.4.1 Standardisierung des Inokulums

- Zelldichte: Soll 5×10^5 KBE/ml ($2-8 \times 10^5$ KBE/ml)
- Pro getestetes Isolat Zelldichte bestimmen

MHK-Werte (mg/l) von ESBL- und MBL-bildenden Stämmen sowie von *E. coli* ATCC 25922 gegenüber Screening Substanzen und Ciprofloxacin

Stamm (Enzym)	KBE/ml	CTX	CAZ	CIP	Stamm (Enzym)	IMP	MER	CIP
ATCC 25922 (neg)	5×10^4	0,06-0,125	0,125-0,25	0,008-0,015	310-1-40 (VIM-1)	8	2-4	32-64
	5×10^5	0,06-0,125	0,125-0,25	0,008-0,015		16	16-64	32-64
	5×10^6	0,06-0,125	0,125-0,25	0,008-0,015		64-128	128	32-64
100-1-15 (TEM-20)	5×10^4	1-2	0,5-1	0,008	310-1-42 (IMP-1)	1	1	1
	5×10^5	4-8	1	0,008		2-8	2-8	1
	5×10^6	16-128	2-8	0,008-0,015		16-32	16-64	1-2
100-2-22 (CTX-M-15)	5×10^4	128-256	32-64	>64				
	5×10^5	>256	64	>64				
	5×10^6	>256	64-128	>64				

Überprüfen des Inokulums: ESBL und MBL-bildende GN-Bakterien



ISO 20776-1 : 3.4.1 Standardisierung des Inokulums

- Zelldichte: Soll 5×10^5 KBE/ml ($2-8 \times 10^5$ KBE/ml)
- Pro getestetes Isolat Zelldichte bestimmen

MHK-Werte (mg/l) von ESBL- und MBL-bildenden Stämmen sowie von *E. coli* ATCC 25922 gegenüber Screening Substanzen und Ciprofloxacin

Stamm (Enzym)	KBE/ml	CTX	CAZ	CIP	Stamm (Enzym)	IMP	MER	CIP
ATCC 25922 (neg)	5×10^4	0,06-0,125	0,125-0,25	0,008-0,015	310-1-40 (VIM-1)	8	2-4	32-64
	5×10^5	0,06-0,125	0,125-0,25	0,008-0,015		16	16-64	32-64
	5×10^6	0,06-0,125	0,125-0,25	0,008-0,015		64-128	128	32-64
100-1-15 (TEM-20)	5×10^4	1-2	0,5-1	0,008	310-1-42 (IMP-1)	1	1	1
	5×10^5	4-8	1	0,008		2-8	2-8	1
	5×10^6	16-128	2-8	0,008-0,015		16-32	16-64	1-2
100-2-22 (CTX-M-15)	5×10^4	128-256	32-64	>64	<u>Klinische Breakpoints EUCAST (v. 3.0)</u> CTX: S \leq 1; R > 2 CAZ: S \leq 1; R > 4 IMP, MER: S \leq 2; R > 8			
	5×10^5	>256	64	>64				
	5×10^6	>256	64-128	>64				

Überprüfen des Inokulums: Daptomycin



Auswirkung des Inokulums auf die Empfindlichkeit verschiedener Erreger gegen Daptomycin (Mikrobouillondilution)

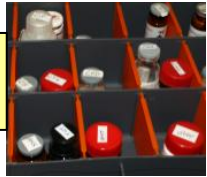
Spezies (Anzahl)	Inokulum (KBE/ml)	MHK (mg/l)									
		0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	≥32
MSSA (n=6)	5 x 10 ⁴			3	3						
	5 x 10 ⁵				6						
	5 x 10 ⁶					4	2				
MRSA (n=8)	5 x 10 ⁴			1	4	1	2				
	5 x 10 ⁵				1	5	1	1			
	5 x 10 ⁶					1	6	1			
MRSE (n=6)	5 x 10 ⁴				2	4					
	5 x 10 ⁵				1	5					
	5 x 10 ⁶					2	4				
<i>E. faecalis</i> (n=7)	5 x 10 ⁴					4	3				
	5 x 10 ⁵						7				
	5 x 10 ⁶						3	4			
<i>E. faecium</i> (n=6)	5 x 10 ⁴						3	3			
	5 x 10 ⁵						1	5			
	5 x 10 ⁶						1	2	3		

ISO 20776-1: Anwendung und Fallstricke

Antibiotika



Amoxicillin/Clavulansäure



ISO 20776-1 : Qualitätskontrolle, Tabelle 4

Antimicrobial Agent	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 ^a NCTC 12973 ^b CIP 103429 ^c DSM 2569 ^d	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103
Amoxicillin-clavulanic acid (fixed 2:1 ratio)	0,12/ 0,06-0,5/0,25	0,25/0,12- 1,0/0,5	2/1-8/4

EUCAST : Breakpoint Tabellen, Version 3.1, 11.02.2013

Variable Konzentration von AMX + 2 mg/l CLA fix

Breakpoints: **S**: $\leq 8/2$ **R**: $> 8/2$ (Enterobacteriaceae)

Amoxicillin/Clavulansäure



A) Verhältnistestung: 2 Teile Amoxicillin + 1 Teil Clavulansäure
(CLSI Richtlinien)

Breakpoints: **S**: $\leq 8/4$ **I**: $16/8$ **R**: $\geq 32/16$ (Enterobacteriaceae)

B) Fixe Konzentration: Variable Konzentration von AMX + 2 mg/l
Clavulansäure fix (nach EUCAST)

Breakpoints: **S**: $\leq 8/2$ **R**: $> 8/2$ (Enterobacteriaceae)

Amoxicillin/Clavulansäure



E. coli (Urinisolate, Akute Zystitis, Frauen 18-65 Jahre, ARESC-Studie 2003-2006*)

Verhältnistestung: (nach CLSI)

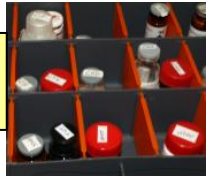
% S	% I	% R
88,6	10,2	1,2

E. coli (Urinisolate, Frauen 18-65 Jahre, TP-N PEG-Studie 2010)

Fixe Konzentration: (nach EUCAST)

% S	% I	% R
75,3	-	24,7

Fosfomycin



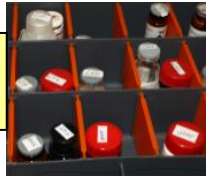
ISO 20776-1 : 3.8 Spezielle Testsituationen

Ergebnisse der Mikrodilution sind nicht verlässlich.
Als Referenzmethode sollte die Agardilution dienen.

EUCAST : Breakpoint Tabellen, Version 3.1, 11.02.2013

Miscellaneous	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments c Letters for comments on
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Daptomycin	1	1 [†]		Note ^A	Note ^A	1. Isolates with MIC values above antimicrobial susceptibility tests reference laboratory. Until there current resistant breakpoint they A. Use an MIC method.
Fosfomycin iv	32	32		Note ^A	Note ^A	

Fosfomycin



Vergleich Agardilution mit Mikrodilution

E. cloacae (n=20)

Fosfomycin MIC (AD) minus MIC (MD)

Difference (in dilution steps)								
-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
0	0	0	6	11	2	1	0	0

K. pneumoniae (n=22)

Fosfomycin MIC (AD) minus MIC (MD)

Difference (in dilution steps)								
-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
0	0	2	2	7	8	3	0	0

K. oxytoca (n=20)

Fosfomycin MIC (AD) minus MIC (MD)

Difference (in dilution steps)								
-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
0	0	2	7	7	4	0	0	0

Fosfomycin

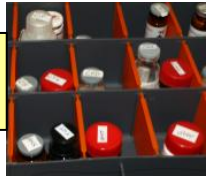


Labore (n=25): Methoden der Empfindlichkeitsprüfung
(Teilprojekt H, PEG-Studie 2010)

Testmethode	Labore	
	Gram neg.	Gram pos.
Agardiffusionstest	3	3
Vitek 2	7	9
Agardiffusionstest / Vitek 2	2	3
Mikrodilution (Micronaut, andere)	3	2
MicroScan	2	
MicroScan / Vitek 2		1
Agardiffusionstest / MicroScan		1
BD Phoenix	1	
Agardiffusionstest / BD Phoenix	2	3
Keine	5	3

Agardilution???

Imipenem



ISO 20776-1 : 3.3.5 Lagerung der Mikrotitrationsplatten

Keine Angabe wie lange Mikrotitrationsplatten vor Inokulation bei RT stehen dürfen.

➔ Imipenem labil bei hoher Luftfeuchtigkeit: Nach Auspacken der MHK-Platten schnell (innerhalb von 30 min) verwenden

Auswirkung der Zeit, in der Mikrotitrationsplatten mit Imipenem der Luftfeuchtigkeit ausgeliefert sind, auf die Empfindlichkeitstestung von *E. coli*

Substanz (Studie)		MHK (mg/l)												%S	%I	%R	
		≤ 0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128				≥256
Imipenem (2004) (n=745)	abs.	-	-	242	352	108	40	2	0	0	0	1	-	-			
	kum-%	-	-	32,5	79,7	94,2	99,6	99,9	99,9	99,9	99,9	100,0	-	-	99,6	0,3	0,1
Imipenem (2007) (n=648)	abs.	-	-	581	65	2	0	0	0	0	0	0	-	-			
	kum-%	-	-	89,9	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	-	-	100,0	0,0	0,0
Imipenem (2010) (n=627)	abs.	-	-	-	608	16	3	0	0	0	0	0	-	-			
	kum-%	-	-	-	97,0	99,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	-	-	100,0	0,0	0,0

ISO 20776-1: Anwendung und Fallstricke

Erreger



Detektion von Resistenzmechanismen: MRSA



ISO 20776-1 : 3.8 Spezielle Testsituationen

Testsubstanz: Oxacillin

Medium + 2% NaCl (fin. Konz.), 24 h Inkubation

Referenzmethode: Molekularer Nachweis des *mecA*-Gens

MRSA-Screening PEG-Resistenzstudie 2010

- MHK-Bestimmung gegen Oxacillin (R: >2 mg/l) und Cefoxitin (R: >4 mg/l)
- *S. aureus* R gegen Oxacillin und Cefoxitin → MRSA
- 2 Stämme: Oxacillin 2 mg/l und Cefoxitin 8 mg/l → *mecA*-PCR: pos

Detektion von Resistenzmechanismen: MRSA



EUCAST



Dezember 2012

EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance

5. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Tabelle 1: Interpretation bei verschiedenen Oxacillin und Cefoxitin Ergebnissen

	Cefoxitin MHK oder Agardiffusion	
	S	R
Oxacillin MHK R	Report as R	Report as R
Oxacillin MHK S	Report as S	Report as R

Detektion von Resistenzmechanismen: HL-Aminoglykosidresistenz bei Enterokokken



ISO 20776-1 : 3.8 Spezielle Testsituationen

Einige Stämme sind hochresistent gegen Aminoglykoside (MHK >500 mg/l). Bei solchen Isolaten besteht keine Synergie. Der getestete Konzentrationsbereich sollte daher breit genug sein, um auch solche Isolate zu erfassen.

HL-Aminoglykosidresistenz-Screening, PEG-Resistenzstudie 2010

CLSI : GEN >500 mg/l; STR >1000 mg/l

EUCAST : Breakpoint Tabellen, Version 3.1, 11.02.2013

GEN >128 mg/l; STR >512 mg/l

Detektion von Resistenzmechanismen: HL-Aminoglykosidresistenz bei Enterokokken



VR-E. faecium (n=38),
PEG-Studie 2010 (Zentrallabor)

Antibiotikum	MHK (mg/l)	
	>500	>1000
Gentamicin	18,4%	
Streptomycin		5,3%

VR-E. faecium (n=38),
PEG-Studie 2010 (RKI)

Antibiotikum	MHK (mg/l)	
	>128	>512
Gentamicin	28,9%	
Streptomycin		89,5%

Detektion von Resistenzmechanismen: HL-Aminoglykosidresistenz bei Enterokokken



MHK-Häufigkeitsverteilung: Gentamicin und Enterokokken (EUCAST)

Spezies (Anzahl)	MHK (mg/l)										
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
<i>E. faecalis</i> (n=6)	19	38	77	192	898	1829	720	64	59	74	802
<i>E. faecium</i> (n=8)	9	22	91	598	1182	580	94	13	11	46	320

MHK-Häufigkeitsverteilung: Streptomycin und Enterokokken (EUCAST)

Spezies (Anzahl)	MHK (mg/l)										
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
<i>E. faecalis</i> (n=6)			2	5	4	21	85	237	305	202	191
<i>E. faecium</i> (n=8)		2	5	2	5	96	489	411	28	4	59

Zusammenfassung

- ISO-Norm und Empfehlungen des EUCAST besser aufeinander abstimmen:
 - Medium für Streptokokken
 - Medium, Methode für anspruchsvolle Bakterien ergänzen
 - präzisere Angaben zur Überprüfung des Inokulums wünschenswert
 - Breakpoints und Qualitätskontrolle für AMX + CLA vereinheitlichen

- EUCAST - Änderungen:
 - Verweis auf CLSI bzgl. Toleranzbereiche der Kontrollstämme, Testung von neuen Antibiotika!?

Weiteres

ISO 20776-1 : Testung von anaeroben Bakterien

Methode bzw. Hinweis auf Medien fehlt

EUCAST : Breakpoints vorhanden aber

Methode bzw. Hinweis auf Medien fehlt

➔ Anwendung von CLSI Methode

ISO 20776-1 : 4. Qualitätskontrolle

Toleranzbereiche zum Teil veraltet, Verweis auf CLSI

EUCAST : Bezieht sich auf ISO 20776-1 und damit auf CLSI

Weiteres

ISO 20776-1 : Neue Antibiotika (z.B. Ceftarolin)

Hinweis zu Löslichkeit und Testung fehlen

EUCAST : Breakpoints vorhanden

➔ Nachschlagen in aktuellen CLSI Dokumenten

ISO 20776-1 : 7.3 Ablesung der Ergebnisse

MHK: für alle Antibiotika (außer Sulfonamide und Trimethoprim) vollständige, visuelle Inhibition des Bakterien-Wachstums

evtl. auch 80% Wachstumshemmung für Erythromycin, Linezolid festlegen

Erythromycin MHK, *S. aureus* GC

