

Medizinische Mikrobiologie
Tuberkulosedagnostik

Kulturelle Methoden zur Isolierung von Mykobakterien

DIN
58 943
Teil 3

Medical microbiology; diagnosis of tuberculosis; detection of mycobacteria by culture

Ersatz für Ausgabe 11.80

Inhalt

	Seite		Seite
1 Anwendungsbereich und Zweck	1	8.2 Beimpfung	5
2 Begriffe	1	8.3 Bebrütung	5
3 Bezeichnung	2	8.4 Ablesung	5
4 Anforderungen an das Untersuchungsgut	2	9 Beurteilung	5
5 Untersuchungslaboratorium	2	10 Befundmitteilung	5
6 Annahme des Untersuchungsgutes	3	11 Qualitätssicherung	5
7 Vorbehandlung des Untersuchungsgutes	3	11.1 Laborinterne Qualitätsprüfung	5
7.1 Reagenzien	3	11.2 Externe Qualitätsprüfung	5
7.2 Konzentrierung	3	Zitierte Normen und andere Unterlagen	6
7.3 Dekontaminierung und Homogenisierung	3	Weitere Unterlagen	7
7.4 Praktisches Vorgehen bei verschiedenen Probenarten	4	Frühere Ausgaben	7
8 Anlegen, Bebrüten und Ablesen der Kulturen	5	Änderungen	7
8.1 Kulturmedien	5	Erläuterungen	7

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm gilt für kulturelle Untersuchungen zum Nachweis von Mykobakterien. Diese Untersuchungen sind nach DIN 58 957 Teil 1 der Risiko-Stufe B zugeordnet und in medizinisch-mikrobiologischen Laboratorien mindestens Typ 2 nach DIN 58 956 Teil 1 durchzuführen.

Zweck dieser Festlegungen ist es, die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse zu sichern.

2 Begriffe

2.1 Grundbegriffe

Nach DIN 58 942 Teil 1, DIN 58 956 Teil 1 und DIN 58 957 Teil 1.

2.2 Untersuchungsgut

Das Untersuchungsgut nach dieser Norm ist das in das medizinisch-mikrobiologische Laboratorium zur Untersuchung gelangende Material (Probe).

2.3 Mykobakterien

Mykobakterien sind stäbchenförmige Bakterien, die bei Anwendung besonderer Färbeverfahren den einmal aufgenommenen Farbstoff so fest binden, daß sie auch durch Anwendung von Säure und Alkohol nicht entfärbt werden. Sie werden daher auch als säurefeste Bakterien (säurefeste Stäbchen) bezeichnet.

2.3.1 Tuberkulosebakterien

Als Tuberkulosebakterien werden bezeichnet:

- Mycobacterium tuberculosis einschließlich geographischer Varianten
- Mycobacterium bovis einschließlich BCG-Stämme

2.3.2 Ubiquitär vorkommende „atypische“ Mykobakterien

Alle neben den Tuberkulosebakterien im Rahmen der Tuberkulosedagnostik vorkommenden Mykobakterienarten, die in

erster Linie in der Umgebung des Menschen gefunden werden, werden unter dem taxonomisch nicht zugelassenen Sammelnamen „ubiquitär vorkommende atypische“ Mykobakterien zusammengefaßt.

2.4 Begleitkeime

Begleitkeime sind die in einem Untersuchungsgut neben den Mykobakterien vorhandenen Mikroorganismen.

2.5 Sputum

Sputum ist das aus den tieferen Atemwegen spontan oder durch Provokation hervorgebrachte Sekret.

Anmerkung: Speichel ist kein Sputum.

2.6 Sammelsputum

Sammelsputum besteht aus mehreren Proben, die in einer Zeitspanne bis zu maximal 12 Stunden gesammelt werden.

2.7 Bronchialsekret

Bronchialsekret ist das instrumentell mit oder ohne Spülung gewonnene Sekret der tieferen Atemwege.

2.8 Magennüchternsekret

Magennüchternsekret ist der mittels Sonde beim nüchternen Patienten gewonnene Mageninhalt.

2.9 Magenspülwasser

Magenspülwasser ist der mittels Sonde beim nüchternen Patienten durch Spülung mit steriler Natriumchlorid-Lösung mit einem Massegehalt von 9 g/l oder sterilem Wasser gewonnene Mageninhalt.

2.10 Morgenurin

Morgenurin ist der erste nach der Nachtruhe entleerte Urin.

2.11 Menstrualblut

Menstrualblut ist das mittels geeigneter Vorrichtungen während der Menstruation aufgefangene bluthaltige Sekret der Gebärmutter.

Fortsetzung Seite 2 bis 7

3 Bezeichnung

Bezeichnung der kulturellen Methode zur Isolierung von Mykobakterien (K):

Kulturmethode DIN 58 943 – K

4 Anforderungen an das Untersuchungsgut

4.1 Sputum und Bronchialsekret

Das Volumen soll bei Bronchialsekreten mindestens 1 ml, bei Sputum mindestens 2 ml (optimal 5 ml) betragen.

Anmerkung: Bronchoskopisch gewonnenes Material ist dem Sputum in der Ausbeute überlegen.

4.2 Magennüchternsekret und Magenspülwasser

Das Volumen soll mindestens 2 ml betragen.

Zur Neutralisierung von Magennüchternsekret oder Magenspülwasser eignen sich Röhrchen mit Trinatriumphosphat, die folgendermaßen vorbereitet werden:

Von einer gesättigten Lösung ($70 \text{ g Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ in 100 ml kochendem Wasser gelöst) werden 1 bis 2 ml in heißem Zustand in die Versandgefäße gefüllt. Nach Abkühlung kristallisiert das Salz aus. Die Versandgefäße dürfen dann aufbewahrt werden.

4.3 Morgenurin

Nach Einschränkung der Flüssigkeitszufuhr am Vorabend soll der Morgenurin unter Vermeidung mikrobieller Verunreinigungen (siehe DIN 58 958 Teil 1) in einem Behältnis mit steriler Innenoberfläche aufgefangen werden.

Für die Abklärung einer Urogenitaltuberkulose ist die Untersuchung von mindestens 3 Urinproben mit einem Mindestvolumen von 30 ml je Probe erforderlich. Entnahme der drei Proben an drei verschiedenen Tagen (je eine Probe/Tag).

Anmerkung: 24-h-Sammelurin ist wegen der stärkeren Verunreinigung durch Begleitkeime weniger geeignet.

4.4 Menstrualblut

Menstrualblut wird nach der Gewinnung mit sterilem Wasser etwa zu gleichen Teilen versetzt und in sterilen Behältnissen versandt.

4.5 Sperma und Prostatasekret

Sperma und Prostatasekret sind in einem sterilen Behältnis aufzufangen und ohne Zusatz zu versenden.

4.6 Blut

Die Untersuchung von Blutproben ist nur sinnvoll bei immungeschwächten Patienten. Zur Untersuchung werden 5 bis 10 ml heparinisiertes Vollblut benötigt.

4.7 Sonstige Punktionsflüssigkeiten

Punktionsflüssigkeiten müssen unter sterilen Bedingungen entnommen werden. Das Volumen sollte möglichst 20 ml betragen.

4.8 Gewebeproben und Abstriche

Gewebeproben und Abstriche sollen vor Verdunstung geschützt und in sterilen Gefäßen versandt werden. Ist wegen der Gefahr der Austrocknung ein Zusatz von Flüssigkeit erforderlich, so muß diese steril sein, keine bakterienhemmenden Zusätze enthalten und im Volumen so gering wie möglich sein.

4.9 Anzahl der Proben

Die Anzahl der Proben hängt von der Fragestellung ab, die Anlaß zu der Untersuchung ist.

4.9.1 Noch nicht gesicherte Diagnose

Bei noch nicht gesicherter Diagnose sind nach Möglichkeit drei Proben an drei verschiedenen Tagen (je eine Probe/Tag) zu entnehmen. Sie erbringen mehr als eine einzige Probe. In diagnostisch besonders schwierigen Fällen kann eine größere Anzahl von Proben angezeigt sein.

4.9.2 Behandlungskontrolle

Die Zeitabstände der Behandlungskontrolle sind abhängig von der Art des Falles und der Chemotherapie. Im allgemeinen sind Wiederholungen im Abstand von etwa 4 Wochen zweckmäßig.

4.10 Transport des Untersuchungsgutes

Bei Verpackung und Versand von medizinischem Untersuchungsgut für den Nachweis von Mykobakterien sind DIN 55 515 Teil 1 und Teil 2 und die verkehrsrechtlichen Vorschriften [1] und [2] unbedingt zu beachten. Das Untersuchungsgut soll in einem sterilen und verschlossenen Versandbehältnis transportiert werden. Das Versandbehältnis muß so eindeutig beschriftet sein, daß die Herkunft und Identität des Untersuchungsgutes jederzeit erkennbar ist.

Die Transportdauer, d.h. die Zeit von der Gewinnung des Untersuchungsgutes bis zum Eingang im medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium, soll so kurz wie möglich sein und 48 h nicht überschreiten.

Über den geeigneten Versand in Sonderfällen müssen sich Einsender und Laboratorium verständigen.

Dem Untersuchungsgut ist ein schriftlicher, vom Einsender unterschriebener, gegen Durchfeuchtung und Verschmutzung geschützter Untersuchungsauftrag beizufügen, dessen Aufbau und Inhalt den Mindestanforderungen nach DIN 58 941 Teil 4 entsprechen muß. Insbesondere ist für den Untersucher (z. B. Laborarzt) von Bedeutung:

- gewünschte Untersuchung
Kulturmethode DIN 58 943 – K
gegebenenfalls zusammen mit
Tierversuch DIN 58 943 – TV
Mikroskopie DIN 58 943 – M
- Untersuchungsgut
Entnahme vor oder während der Erst- bzw. Wiederholungsbehandlung.

5 Untersuchungslaboratorium

Die kulturellen Methoden zum Nachweis von Mykobakterien sind in einem medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium mindestens Typ 2 nach DIN 58 956 Teil 1 durchzuführen, unter Einhaltung der sicherheitstechnischen Anforderungen an Untersuchungen der Risiko-Stufe B nach DIN 58 957 Teil 1. Es muß sichergestellt werden, daß die nachstehenden Vorschriften und Regeln in der jeweils gültigen Fassung beachtet werden:

- Unfallverhütungsvorschriften und Merkblätter der gesetzlichen Unfallversicherungsträger [3] bis [5]
- Richtlinien des Bundesgesundheitsamtes (BGA) über Desinfektionsmaßnahmen bei Tuberkulose [6]
- Empfehlungen des Deutschen Zentralkomitees zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK) [7] und [8]
- die Liste der vom Bundesgesundheitsamt (BGA) geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren [9]

6 Annahme des Untersuchungsgutes

Das im Untersuchungslaboratorium eingetroffene Untersuchungsgut und der dazugehörige Untersuchungsauftrag sind auf Übereinstimmung und etwaige Auffälligkeiten hin zu überprüfen und zu numerieren. Für eine Dokumentation nach DIN 58 941 Teil 4 ist Sorge zu tragen.

Die kulturelle Untersuchung soll am Eingangstag des Untersuchungsgutes beginnen. Untersuchungsgut, das nicht innerhalb 1 bis 2 h verarbeitet werden kann, ist bei Kühlschranktemperatur (5 ± 1) °C zu lagern.

7 Vorbehandlung des Untersuchungsgutes

Das Untersuchungsgut enthält häufig Begleitkeime, die das Kulturverfahren stören. Je nach Art des Untersuchungsgutes werden unterschiedliche Methoden angewandt, um bei größtmöglicher Schonung der Mykobakterien die Begleitkeime abzutöten, siehe Tabelle 1.

Darüber hinaus ist in den meisten Fällen eine Homogenisierung des Untersuchungsgutes erforderlich. Hierdurch wird die Dekontaminierung und die in vielen Fällen erforderliche Konzentrierung erleichtert.

Zur Vorbehandlung sollten nur Einmalzentrifugenröhrchen z. B. nach DIN 58 970 Teil 2 benutzt werden,

Zur Qualitätssicherung sind die Anforderungen nach Abschnitt 9.1.2 zu erfüllen.

7.1 Reagenzien

7.1.1 Natriumchlorid-Lösung

NaCl ¹⁾	9 g
steriles destilliertes Wasser	1 l

7.1.2 Sulfosalizylsäure

Sulfosalizylsäure ¹⁾	200 g
steriles destilliertes Wasser	1 l

7.1.3 N-Acetyl-L-Cystein-NaOH-Lösung

sterile Na ₃ -Citrat · 2 H ₂ O, 2,9%ige Lösung	50 ml
sterile NaOH, 4%ige Lösung	50 ml
N-Acetyl-L-Cystein	500 mg
Natriumcitratlösung und NaOH mischen und N-Acetyl-L-Cystein dazugeben. Die Lösung ist instabil; sie ist täglich frisch anzusetzen.	

7.1.4 Phosphatpufferlösung

Phosphatpuffer pH = 6,8 (nach Sörensen) 1/15 molar
(4,84g KH₂PO₄ + 5,53g Na₂HPO₄ · 2 H₂O + 1000ml Aqua dest.)

7.1.5 Natriumlaurylsulfat

Natriumlaurylsulfat ¹⁾	3 g
NaOH	1 g
Aqua dest.	100 ml

7.1.6 Phosphorsäure

Phosphorsäure ¹⁾	1,5 ml
Bromkresolpurpur-Lösung (0,25 g/l)	1,5 ml
Aqua dest.	1000 ml

7.1.7 Modifizierte Nekal-BX-Lösung

a) Lösung 1: Nekal-BX ¹⁾ trocken	0,01 g
NaOH ¹⁾ fest	0,5 g
Na ₃ PO ₄ · 12 H ₂ O ¹⁾	0,1 g
steriles destilliertes Wasser auf	100 ml
b) Lösung 2: CaCl ₂ · 2 H ₂ O ¹⁾	2,0 g
BaCl ₂ · 2 H ₂ O ¹⁾	4,0 g
steriles destilliertes Wasser auf	100 ml

Beide Lösungen sind bei Temperaturen von 4 bis 25 °C etwa 4 Wochen stabil.

7.1.8 Schwefelsäure

- Schwefelsäure mit einem Volumengehalt zwischen 4 und 8%, je nach Untersuchungsgut und Grad der Verunreinigung (siehe Abschnitt 7.3.5).
- zur Neutralisation: Natronlauge mit Indikator (siehe Abschnitt 7.1.9)

7.1.9 Natronlauge-Bromkresolpurpur-Lösung

NaOH ¹⁾ in rotulis reinst	4 g
destilliertes Wasser	100 ml
Bromkresolpurpur-Lösung (1 : 250)	2,5 ml
0,4 g Bromkresolpurpur ¹⁾ wird in 2 bis 3 ml Natronlauge mit einem Volumenanteil zwischen 10 und 20% gelöst und auf 100 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.	

7.2 Konzentrierung

Die Mykobakterien werden in flüssigen bzw. nach Abschnitt 7.3 verflüssigten Proben durch Zentrifugieren für mindestens 20 min in verschlossenen Zentrifugenröhrchen z. B. nach DIN 58 970 Teil 2 in einer gekühlten Zentrifuge z. B. nach DIN 58 970 Teil 3 bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von nicht weniger als RZB = 3000²⁾ und einer Rotorraumtemperatur von (16 ± 10) °C im Sediment angereichert.

Durch Fällungsmethoden, z. B. Sulfosalizylsäure, mit einer Massenkonzentration von 200 g/l, nach Abschnitt 7.1.2 kann bei eiweißarmem Untersuchungsgut der Anreicherungsseffekt verbessert werden, gegebenenfalls nach vorheriger Zugabe von etwas Eiweiß (z. B. 1 ml Serum oder Plasma auf 100 ml Flüssigkeit).

7.3 Dekontaminierung und Homogenisierung

7.3.1 Auswahl der Vorbehandlungsmethoden

Nach derzeitigem Erkenntnisstand ist es nicht möglich, eine Standardmethode zur Vorbehandlung des Untersuchungsgutes zu empfehlen. Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die z. Z. gebräuchlichsten Methoden mit ihren Vor- und Nachteilen.

7.3.2 Vorbehandlung mit N-Acetyl-L-Cystein

Bis zu 10 ml Probe mit einem gleichen Volumen N-Acetyl-L-Cystein-NaOH-Lösung nach Abschnitt 7.1.3 in einem Zentrifugenglas mit einem Fassungsvermögen von 30 bis 50 ml versetzen. Röhrchen verschließen, gut durchschütteln und für die weitere Einwirkungszeit von 25 min auf einen Schüttler geben. Danach Röhrchen bis 1 cm unter den Rand mit Phosphatpufferlösung nach Abschnitt 7.1.4 auffüllen und bei mindestens RZB = 3000²⁾ für 20 min zentrifugieren. Überstand verworfen und das Sediment in 1 ml steriler Kochsalzlösung nach Abschnitt 7.1.1 resuspendieren. Suspension auf Kulturmedien verimpfen.

7.3.3 Vorbehandlung mit Natriumlaurylsulfat

In einem Zentrifugenröhrchen (Fassungsvermögen 50 ml, mit spitzem Boden) 2 Teile Sputum und 3 Teile Natriumlaurylsulfatlösung nach Abschnitt 7.1.5 mischen. Röhrchen fest verschließen und kräftig mit der Hand schütteln. Danach das Gemisch für 40 min in einem Schüttelapparat durchmischen. Anschließend mit Phosphorsäure nach Abschnitt 7.1.6 (30 bis 40 ml) bis zum Farbumschlag des pH-Indikators neutralisieren und für 30 min bei mindestens RZB = 3000²⁾ zentrifugieren. Überstand vorsichtig abgießen und verworfen. Das Sediment verimpfen.

¹⁾ Über die Bezugsquelle gibt Auskunft:

Normenausschuß Medizin (NAME) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Postfach 107, 1000 Berlin 30

²⁾ Siehe DIN 58 970 Teil 1