

Medizinische Mikrobiologie
Tuberkulosedagnostik

Teil 32: Mikroskopische Methoden zum Nachweis
von Mykobakterien

DIN
58943-32

ICS 07.100.10

Ersatz für Ausgabe 1986-08

Deskriptoren: Medizin, Mikrobiologie, Tuberkulosedagnostik, Mykobakterie, mikroskopische Methode

Medical microbiology — diagnosis of tuberculosis — detection of mycobacteria by microscopic methods

Die mikroskopischen Methoden haben gegenüber den kulturellen Methoden nach DIN 58943-3 und dem Tierversuch nach DIN 58943-31 Vorteile und Nachteile:

Vorteil — geringerer methodischer und zeitlicher Aufwand

Nachteile — geringere Empfindlichkeit, geringere Spezifität;

— keine Möglichkeit der Differenzierung zwischen Tuberkulosebakterien und ubiquitären Mykobakterien

Inhalt

	Seite		Seite
1 Anwendungsbereich und Zweck	1	9 Vorbehandlung des Untersuchungsgutes	3
2 Begriffe	1	9.1 Allgemeines	3
3 Bezeichnung	1	9.2 Verarbeitung	3
4 Untersuchungsgut	1	9.3 Fixation	3
4.1 Sputum und Bronchialsekret	2	9.4 Färbung	3
4.2 Anzahl der Proben	2	10 Durchführung der Untersuchung	4
4.3 Transport des Untersuchungsgutes	2	10.1 Hellfeld-Methode	4
5 Untersuchungslaboratorium	2	10.2 Fluoreszenz-Methode	4
6 Annahme des Untersuchungsgutes	2	11 Beurteilung	4
7 Mikroskopische Ausrüstung	2	12 Befundmitteilung	5
8 Reagenzien	2	Zitierte Normen und andere Unterlagen	6
8.1 Sulfosalizylsäure-Lösung	2	Weitere Normen	7
8.2 Ziehl-Neelsen-Färbung	2	Erläuterungen	7
8.3 Auramin-Färbung	3		
8.4 Acridinorange-Färbung	3		

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm gilt für mikroskopische Untersuchungen zum Nachweis von Mykobakterien.

Diese Untersuchungen sind nach DIN 58957-1 der Risiko-Stufe A zugeordnet und in medizinisch-mikrobiologischen Laboratorien mindestens Typ 2 nach DIN 58956-1 durchzuführen unter Beachtung der Anforderungen an den Arbeitsplatz und die mikroskopische Ausrüstung nach DIN 58959-4*).

Die mikroskopischen Methoden nach dieser Norm lassen keine Differenzierung zwischen Tuberkulosebakterien und ubiquitären Mykobakterien zu. Es kann ferner keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich um noch vermehrungsfähige oder um bereits abgestorbene Mykobakterien handelt (z. B. infolge Chemotherapie oder Desinfektions- bzw. Sterilisationsmaßnahmen nach Abgabe des Untersuchungsgutes).

2 Begriffe

Nach DIN 58943-3, DIN 58956-1, DIN 58957-1 und DIN 58959-4*)

3 Bezeichnung

Bezeichnung der mikroskopischen Methoden zum Nachweis von Mykobakterien (M):

Mikroskopie DIN 58943 — M

4 Untersuchungsgut

Bei Proben, die erfahrungsgemäß Tuberkulosebakterien in höherer Konzentration enthalten können (mehr als 10^4 /ml) ist die mikroskopische Untersuchung besonders angezeigt; das gilt vor allem für Sputum und Bronchialsekret.

*) z. Z. Entwurf

Fortsetzung Seite 2 bis 7

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

Dagegen ist die regelmäßige mikroskopische Untersuchung wenig aussichtsreich bei Proben, in denen entweder

- Tuberkulosebakterien nur in geringer Konzentration erwartet werden können, z.B. Pleurapunktat, Menstrualblut oder
- mit dem Vorkommen ubiquitärer Mykobakterien gerechnet werden muß, z.B. im Urin, Magensaft bzw. -spülwasser, Stuhl.

Deshalb sollen — wenn überhaupt — Magennüchternsekret und Magenspülwasser, Morgenurin, Spermaflüssigkeit, Punktionsflüssigkeiten, Gewebeproben und Abstriche sowie Stuhl und Menstrualblut nur im Zusammenhang mit der kulturellen Methode nach DIN 58943-3 auch mikroskopisch untersucht werden. Die Anforderungen an das jeweilige Untersuchungsgut sind DIN 58943-3 zu entnehmen.

Diese Einschränkung gilt nicht für Liquor; dieses Untersuchungsgut sollte immer auch mikroskopisch untersucht werden.

4.1 Sputum und Bronchialsekret

Das Mindestvolumen soll 2 ml betragen.

ANMERKUNG: Bronchiale Bürstenabstriche sind den Sekreten in der Ausbeute überlegen.

4.2 Anzahl der Proben

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

4.2.1 Noch nicht gesicherte Diagnose

Bei noch nicht gesicherter Diagnose sind drei Proben an drei verschiedenen Tagen (je eine Probe/Tag) zu entnehmen. Sie erbringen mehr als eine einzige Probe.

Häufigere Untersuchungen ergeben dagegen kaum größere zusätzliche diagnostische Sicherheit. In diagnostisch besonders schwierigen Fällen (z.B. bei fraglich aktiver Lungentuberkulose) können sie trotzdem angezeigt sein.

4.2.2 Behandlungskontrolle

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

4.3 Transport des Untersuchungsgutes

Bei Verpackung und Versand von medizinischem Untersuchungsgut für die Tuberkulosedagnostik sind DIN 55515-1 und DIN 55515-2 und die verkehrsrechtlichen Vorschriften [1] und [2] unbedingt zu beachten. Das Untersuchungsgut soll in einem keimfrei gemachten und verschlossenen Versandgefäß transportiert werden. Das Versandgefäß 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 58959-3*) entsprechen muß. Insbesondere ist für den Untersucher (Laborarzt) von Bedeutung:

- gewünschte Untersuchung
- Mikroskopie DIN 58943 — M

gegebenenfalls zusammen mit
Kulturmethode DIN 58943 — K
Tierversuch DIN 58943 — TV

— Untersuchungsgut

Entnahme vor oder während der Erst- bzw. Wiederholungsbehandlung.

5 Untersuchungslaboratorium

Die mikroskopische Untersuchung ist in einem medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium mindestens Typ 2 nach DIN 58956-1 durchzuführen, unter Einhaltung der sicherheitstechnischen Anforderungen an Untersuchungen der Risiko-Stufe A nach DIN 58957-1, und der Mindestanforderungen an den Arbeitsplatz und die mikroskopische Ausrüstung nach DIN 58959-4*).

Es muß sichergestellt werden, daß die nachstehenden Vorschriften und Regeln in der jeweils gültigen Fassung beachtet werden:

- Unfallverhütungsvorschriften und Merkblätter des Hauptverbandes der gewerblichen Berufsgenossenschaften [3] bis [5]
- Empfehlungen des Deutschen Zentralkomitees zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK) [6] und [7]
- die Liste der vom Bundesgesundheitsamt (BGA) geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren [8].

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 58959-3*) ist Sorge zu tragen.

Die mikroskopische 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 Mikroskopische Ausrüstung

Nach DIN 58959-4*)

Für die mikroskopische Hellfeld-Methode ist eine 90- bis 100fache Objektivvergrößerung erforderlich, Filter werden nicht benötigt.

Für den zu verwendenden Farbstoff bei der Fluoreszenz-Methode sind Filterkombinationen nach Angaben der Hersteller einzusetzen.

Aufflicht-Fluoreszenz-Mikroskope sind Durchlicht-Fluoreszenz-Mikroskopen vorzuziehen.

8 Reagenzien

8.1 Sulfosalizylsäure-Lösung

Sulfosalizylsäure ¹⁾	200 g
Destilliertes Wasser	1 l

8.2 Ziehl-Neelsen-Färbung

8.2.1 Karbolfuchsinlösung¹⁾

Fuchsin basisch	1 g
Ethanol, Volumenkonzentration (96 ± 1) %	10 ml
Phenolum liquefactum, 5 %ige wäßrige Lösung	100 ml

*) Z. Z. Entwurf

¹⁾ Über die Bezugsquelle gibt Auskunft: Normenausschuß Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin.

Bei der Herstellung der Lösung ist jeglicher Hautkontakt mit den Substanzen oder der Lösung zu vermeiden. Soweit im Handel erhältlich, sollte eine gebrauchsfertige Farbstofflösung verwendet werden.

8.2.2 Salzsäure-Alkohol

Salzsäure rauchend, Massenanteil (34 ± 2) %	3 ml
Ethanol, Volumenkonzentration (96 ± 1) %	97 ml

8.2.3 Methylenblaulösung nach Löffler¹⁾

Methylenblau basisch	0,5 g
Ethanol, Volumenkonzentration (96 ± 1) %	30 ml
Kalilauge, Massenanteil 0,01 %	100 ml

8.3 Auramin-Färbung

8.3.1 Auramin-Lösung

Auramin O ¹⁾	0,1 g
Destilliertes Wasser	100,0 ml
Phenolum liquefactum	5,0 ml

Die Lösung ist in dunkler Flasche aufzubewahren; sie ist nur 1 Woche haltbar.

8.3.2 Methylenblaulösung nach Löffler¹⁾

Nach Abschnitt 8.2.3

8.4 Acridinorange-Färbung

8.4.1 Acridinorange-Gebrauchslösung

8.4.1.1 Acridinorange-Stammlösung

Acridinorange	1 g
Destilliertes Wasser	100 ml

8.4.1.2 Benzalkoniumchloridlösung,

Volumenkonzentration 50 % ¹⁾	3 ml
---	------

8.4.1.3 Barbitalnatriumpuffer

5,5 Diäthyl-Barbitursäure-Natrium	5,2 g
Na ₂ CO ₃ × 10 H ₂ O	7,25 g
HCl 0,1 n	117 ml
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
pH-Wert 8,75 ± 0,25	

8.4.1.4 Herstellung der Acridinorange-Gebrauchslösung
Mischen von: 25 ml Acridinorange-Stammlösung, 3 ml Benzalkoniumchloridlösung und 472 ml Barbitalnatriumpuffer.

Die Acridinorange-Gebrauchslösung ist vor Licht geschützt aufzubewahren und so 14 Tage haltbar.

8.4.2 Schwefelsäure, Volumenkonzentration 6 %¹⁾

9 Vorbehandlung des Untersuchungsgutes

9.1 Allgemeines

Für die Herstellung der mikroskopischen Präparate dürfen nur neue, gereinigte und entfettete Objektträger verwendet werden. Zur Anreicherung sollten nur Einmalzentrifugenröhrchen nach DIN 58970-2 benutzt werden, da bei Wiederverwendung gereinigter Röhrchen die Verschleppung von Mykobakterien und damit falsch-positive Befunde nicht sicher ausgeschlossen werden können.

9.2 Verarbeitung

9.2.1 Sputum

a) Direktausstrich: Hierfür müssen ausgesuchte Schleim- oder Eiter-Flocken auf dem Objektträger ausgebreitet werden.

b) Verflüssigung und Anreicherung: Wird Sputum oder anderes, nichtflüssiges Untersuchungsgut auch im Kulturverfahren untersucht, so kann das nach DIN 58943-3 vorbehandelte Untersuchungsgut auch für die Anfertigung mikroskopischer Präparate verwendet werden.

9.2.2 Flüssiges bzw. verflüssigtes Untersuchungsgut

Die Mykobakterien werden durch Zentrifugieren (mindestens 20 min) mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von RZB = 3 000²⁾ im Sediment angereichert. Der Überstand wird verworfen.

Durch Fällungsmethoden, z. B. Sulfosalizylsäure, mit einer Massenkonzentration von 200 g/l, nach Abschnitt 8.1, kann bei eiweißhaltigem Untersuchungsgut der Anreicherungseffekt verbessert werden; bei Urin nach vorheriger Zugabe von etwas Eiweiß (z. B. 1 ml Serum oder Plasma auf 100 ml Flüssigkeit).

Bei eiweißfreiem, flüssigen Untersuchungsgut kann die Anreicherung der Mykobakterien bei Zentrifugation durch Zusatz von 2 bis 3 Tropfen einer 5%igen Tween-80-Lösung nach Ph. Eur. I³⁾ unterstützt werden.

9.2.3 Festes Untersuchungsgut, Eiter und Abstriche

Tuberkulöser Käse, Eiter und Abstrichmaterial können direkt auf den Objektträger gebracht werden. Bei festen Gewebsbröckeln kann man Abstriche oder Tupfpräparate von der Oberfläche herstellen oder feines Geschabsel zwischen zwei Objektträgern zerquetschen.

Gebrauchte Mörser dürfen zum Zerkleinern von Untersuchungsgut für die Mikroskopie nicht verwendet werden.

9.3 Fixation

Die Ausstriche werden 20 min bei 110 °C in einem Trockenschrank fixiert.

Die Bedingungen müssen eingehalten werden. Bei intensiverer Wärmeeinwirkung muß mit einer Beeinträchtigung der Färbbarkeit und bei geringerer Wärmeeinwirkung mit Infektiosität gerechnet werden.

Für Einzelpräparate ist die Hitze-fixation mit dem Laborbrenner (Bunsenbrenner) bedingt geeignet.

9.4 Färbung

9.4.1 Auswahl der Methode

Die Färbemethoden richten sich nach der Art der mikroskopischen Methode.

Grundsätzlich gilt, daß die fluoreszenzmikroskopische Methode für die **Suche** nach Mykobakterien in klinischem Untersuchungsgut besonders geeignet ist.

Für die Beurteilung der Morphologie von Mykobakterien ist die Hellfeld-Methode vorzuziehen.

Der Vorteil der Fluoreszenz-Methode besteht darin, daß mit geringerer Objektvergrößerung und Trockenobjektiven gearbeitet werden kann. Dadurch vergrößert sich das Gesichtsfeld bei zunehmender Tiefenschärfe.

Das Durchmustern der Präparate benötigt infolgedessen kürzere Zeit.

Die aufwendigere Ausrüstung läßt fluoreszenzmikroskopische Methoden gegenüber der Ziehl-Neelsen-Färbung erst bei einem Anfall von 30 bis 40 Proben/Tag lohnend erscheinen. Darüber hinaus ist größere Erfahrung des Laborpersonals erforderlich, da häufig unspezifische Fluoreszenzerscheinungen die Beurteilung erschweren,

¹⁾ Siehe Seite 2

²⁾ Relative Zentrifugalbeschleunigung siehe DIN 58970-1

³⁾ Nach Ph. Eur. I: Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch) Band I