

DIN 58943-32

ICS 07.100.10

Ersatz für
DIN 58943-32:1995-01

**Medizinische Mikrobiologie –
Tuberkulosedagnostik –
Teil 32: Mikroskopische Methoden zum Nachweis von Mykobakterien;
Text Deutsch und Englisch**

Medical microbiology –
Diagnosis of tuberculosis –
Part 32: Detection of mycobacteria by microscopic methods;
Text in German and English

Microbiologie médicale –
Diagnostic de la tuberculose –
Partie 32: Méthodes microscopiques pour la détection des mycobactéries;
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 22 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	7
4 Anforderungen an die Arbeitssicherheit	8
5 Untersuchungsgut und Anzahl der Primärproben	9
5.1 Auswahl, Menge und Gewinnung von Untersuchungsgut	9
5.2 Untersuchungsauftrag	9
5.2 Request form	9
5.3 Behandlungskontrolle	9
6 Mikroskopische Ausrüstung	9
7 Reagenzien	10
7.1 Karbolfuchsinlösung	10
7.2 Salzsäure-Alkohol	10
7.3 Methylenblaulösung nach Löffler	10
7.4 Phenol-Auramin-Lösung	11
8 Anfertigung und Färbung der mikroskopischen Präparate	11
8.1 Allgemeines	11
8.2 Herstellung der Ausstriche	11
8.3 Fixation	11
8.4 Färbung	12
8.4.1 Auswahl der Methode, allgemeine Hinweise	12
8.4.2 Hellfeldverfahren	12
8.4.3 Fluoreszenzverfahren	13
9 Durchführung der Mikroskopie	13
9.1 Allgemeine Angaben	13
9.2 Hellfeldverfahren	14
9.3 Fluoreszenzverfahren	14
10 Beurteilung	14
11 Befundmitteilung	15
12 Qualitätssicherung	16
12.1 Ziel der Qualitätssicherung	16
12.2 Laborinterne Qualitätskontrollen	18
12.2.1 Reagenzien und Färbequalität	18
12.2.2 Gerätefunktion	19
12.2.3 Plausibilitätskontrolle	19
12.3 Aufbewahrung positiver Präparate	19
12.4 Externe Qualitätskontrolle	19
Literaturhinweise	22

Contents

	Page
Foreword	3
1 Scope	6
2 Normative references	6
3 Terms and definitions	7
4 Occupational health and safety requirements	8
5 Specimens and number of primary samples	9
5.1 Selection, number and extraction of specimens	9
5.2 Request form	9
5.3 Treatment control	9
6 Microscopic equipment	9
7 Reagents	10
7.1 Carbol fuchsin solution	10
7.2 Hydrochloric acid/alcohol	10
7.3 Methylene blue solution according to Loeffler	10
7.4 Phenol auramine solution	11
8 Preparation and staining of the microscopic specimens	11
8.1 General	11
8.2 Preparation of the smears	11
8.3 Fixation	11
8.4 Staining	12
8.4.1 Selection of the method, general information	12
8.4.2 Bright light technique	12
8.4.3 Fluorescence technique	13
9 Microscopic procedure	13
9.1 General information	13
9.2 Bright light technique	14
9.3 Fluorescence technique	14
10 Assessment	14
11 Reporting	15
12 Quality assurance	16
12.1 Objective of the quality assurance	16
12.2 Intra-laboratory quality controls	18
12.2.1 Reagents and staining quality	18
12.2.2 Functioning of the equipment	19
12.2.3 Plausibility control	19
12.3 Storage of positive specimens	19
12.4 External quality control	19
Bibliography	22

Vorwort

Die Norm wurde vom Arbeitsausschuss NA 063-05-03 AA „Tuberkulose- und Mykobakteriendiagnostik“ des Normenausschusses Medizin im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Mykobakterien (AKM) erarbeitet. Der AKM ist ein Expertengremium aus dem deutschsprachigen Raum, das u. a. Studien zur mykobakteriologischen Diagnostik koordiniert.

DIN 58943 *Medizinische Mikrobiologie — Tuberkulosedagnostik* besteht aus (Beiblätter werden nicht aufgeführt):

- Teil 3: Kulturelle Methoden zum Nachweis von Mykobakterien
- Teil 4: Primärproben zur Tuberkulose- und Mykobakteriendiagnostik, qualitative und quantitative Anforderungen, Gewinnung, Transport und Aufbewahrung
- Teil 5: Molekularbiologische Identifizierung und Differenzierung von Tuberkulosebakterien
- Teil 7: Modifiziertes Löwenstein-Jensen-Kulturmedium zur Anzucht von Mykobakterien
- Teil 8: Empfindlichkeitsprüfung von Tuberkulosebakterien gegen Chemotherapeutika
- Teil 9: Phänotypische Differenzierung von Tuberkulosebakterien
- Teil 32: Mikroskopische Methoden zum Nachweis von Mykobakterien
- Teil 40: Bewertungskriterien für kulturelle Schnellverfahren zum Nachweis von Mykobakterien

Foreword

This standard has been prepared by *Arbeitsausschuss* (Working Committee) NA 063-05-03 AA “*Tuberkulose- und Mykobakteriendiagnostik*” (Diagnosis of Tuberculosis and Mycobacteria) of *Normenausschuss Medizin (NAMed)* (Medical Standards Committee) in the *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.* (German Institute for Standardization) in cooperation with *Arbeitskreis Mykobakterien (AKM)* (Working Group on Mycobacteria). The AKM is a panel of experts based in the German-speaking area which, among other things, coordinates studies regarding mycobacteriological diagnostics.

DIN 58943, *Medical microbiology — Diagnosis of tuberculosis* consists of (supplements are not listed):

- Part 3: Detection of mycobacteria by culture methods
- Part 4: Primary samples for the diagnosis of tuberculosis and mycobacteria — Qualitative and quantitative requirements, extraction, transport and storage
- Part 5: Molecular identification and differentiation of tubercle bacilli
- Part 7: Modified Löwenstein-Jensen medium for the growth of mycobacteria
- Part 8: Methods for the determination of susceptibility of tubercle bacilli to chemotherapeutic agents
- Part 9: Phenotypic differentiation of tubercle bacilli
- Part 32: Detection of mycobacteria by microscopic methods
- Part 40: Evaluation criteria for fast culture procedures for the detection of mycobacteria

Änderungen

Gegenüber DIN 58943-32:1995-01 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) redaktionelle Überarbeitung;
- b) beispielhafte Beschreibung von nur noch je einem Hellfeld- und Fluoreszenzverfahren;
- c) Angaben zu Herstellung und Haltbarkeit der beschriebenen Färbelösungen;
- d) Erläuterungen zur benötigten Mindestkeimzahl für den mikroskopischen Erregernachweis;
- e) Überarbeitung des Beurteilungsschemas;
- f) Erläuterungen zur betrachteten absoluten und relativen Objektfläche mit Auflicht- und Fluoreszenzverfahren;
- g) Erwähnung weiterer UV-Emissionstechniken neben der Quecksilberdampflampe;
- h) Erweiterung der Hinweise zur Arbeitssicherheit;
- i) Einführung eines Abschnitts Qualitätssicherung.

Frühere Ausgaben

DIN 58943-32: 1982-08, 1986-08, 1995-01

Amendments

In comparison to DIN 58943-32:1995-01, the following amendments have been made:

- a) editorial revision;
- b) description by means of the examples of just one bright field and one fluorescence technique;
- c) information on the preparation and shelf-life of the described staining solutions;
- d) explanations regarding the minimum bacterial count required for the microscopic detection of pathogens;
- e) revision of the assessment scheme;
- f) explanations regarding the examined absolute and relative object areas when applying the incident light and the fluorescence techniques;
- g) mention of further UV emission techniques in addition to the mercury vapour lamp;
- h) extension of the information regarding occupational health;
- i) introduction of a clause on quality assurance.

Previous editions

DIN 58943-32: 1982-08, 1986-08, 1995-01

Einleitung

Auf Grund ihres Zellwandaufbaus sind Mykobakterien nach Anfärbung mit speziellen Farbstoffen im Gegensatz zu anderen Bakterien selbst mit einem Salzsäure-Alkohol-Gemisch nur sehr schwer zu entfärben. Der mikroskopische Nachweis von so genannten säurefesten Stäbchenbakterien (im Folgenden nur noch „säurefeste Stäbchen“ genannt) ist folglich mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Nachweis von Mykobakterien gleichzusetzen.

Vorteile der Mikroskopie: Die Mikroskopie ist eine schnelle und kostengünstige Methode. Sie erlaubt mit einer hohen Spezifität die Erkennung isolierungsbedürftiger hochinfektiöser Patienten mit Lungentuberkulose.

Nachteile der Mikroskopie: Die Mikroskopie ist ungeeignet für den diagnostischen Ausschluss einer Tuberkulose, da nur bei etwa der Hälfte der Patienten mit Lungentuberkulose und bei weniger als einem Drittel der extrapulmonalen Tuberkulosen die Verdachtsdiagnose mikroskopisch erhärtet werden kann. Die mikroskopischen Methoden nach dieser Norm lassen keine Differenzierung zwischen Tuberkulosebakterien und nichttuberkulösen Mykobakterien zu.

Die Mikroskopie erlaubt keine Aussage über die Vermehrungsfähigkeit der Mykobakterien.

Introduction

Unlike with other bacteria, with mycobacteria it is very hard, even by applying a mixture of hydrochloric acid and alcohol, to de-stain them after they have been stained with special dyes; this is due to the bacteria's cell wall structure. The microscopic detection of so-called acid-fast rod-shaped bacteria (in the following referred to as "acid-fast bacilli") can, therefore, very likely be equated with the detection of mycobacteria.

Advantages of microscopy: Microscopy is a fast and cost-effective method. It allows to recognize, with a high specificity, highly infectious patients suffering from lung tuberculosis and requiring isolation.

Disadvantages of microscopy: Microscopy is unsuitable for the diagnostic ruling-out of tuberculosis, as only with approximately half the patients suffering from lung tuberculosis and with less than one third of the cases of extrapulmonary tuberculosis, the tentative diagnosis can be substantiated microscopically. The microscopic methods described in this standard do not allow a differentiation to be made between tubercle bacilli and non-tuberculous mycobacteria.

Microscopy does not allow any statements to be made regarding the multiplication capacity of mycobacteria.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für mikroskopische Untersuchungen zum Nachweis von Mykobakterien aus humanem Untersuchungsgut.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

DIN 58943-3, *Medizinische Mikrobiologie — Tuberkulosedagnostik — Teil 3: Kulturelle Methoden zum Nachweis von Mykobakterien*

DIN 58959-3, *Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 3: Anforderungen an Untersuchungsauftrag und Befundbericht*

DIN 58959-4, *Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 4: Anforderungen an lichtmikroskopische Untersuchungen*

DIN 58969-62, *Medizinische Mikrobiologie — Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten — Teil 62: Polymerase-Kettenreaktion (PCR) — Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen des Mycobacterium tuberculosis Komplexes (MTC)*

DIN EN 12128, *Biotechnik — Laboratorien für Forschung, Entwicklung und Analyse — Sicherheitsstufen mikrobiologischer Laboratorien, Gefahrenbereich, Räumlichkeiten und technische Sicherheitsanforderungen*

DIN EN ISO 15189, *Medizinische Laboratorien — Besondere Anforderungen an die Qualität und Kompetenz*

MiQ, *Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik*. Mauch, H. (Hrsg.); Podbielski, A. (Hrsg.); Herrmann, M. (Hrsg.); Kniehl, E. (Hrsg.). MiQ 5: Tuberkulose, Mykobakteriose. Küchler, R., G. E. Pfyffer, S. Rüscher-Gerdes, J. Beer, H. Mauch (1998), bzw. in der jeweils aktuellen Ausgabe.

Deutsche Post: Regelungen für die Beförderung von gefährlichen Stoffen und Gegenständen Teil 1: Brief National (gültig ab 01.08.2009)

1 Scope

This standard applies to microscopic examinations for the purposes of detecting mycobacteria in human specimens.

2 Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

DIN 58943-3, *Medical microbiology — Diagnosis of tuberculosis — Part 3: Detection of mycobacteria by culture methods*

DIN 58959-3, *Quality management in medical microbiology — Part 3: Requirements for request and report forms*

DIN 58959-4, *Quality management in medical microbiology — Part 4: Requirements for investigations using light microscopes*

DIN 58969-62, *Medical microbiology — Diagnosis of infectious diseases in serology and molecular biology — Part 62: Polymerase chain reaction (PCR) — Special requirements for the detection of nucleic acid sequences of the mycobacterium tuberculosis complex (MTC)*

DIN EN 12128, *Biotechnology — Laboratories for research, development and analysis — Containment levels of microbiology laboratories, areas of risk, localities and physical safety requirements*

DIN EN ISO 15189, *Medical laboratories — Particular requirements for quality and competence*

MiQ, *Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik*. Mauch, H. (ed.); Podbielski, A. (ed.); Herrmann, M. (ed.); Kniehl, E. (ed.). MiQ 5: Tuberkulose, Mykobakteriose. Küchler, R., G. E. Pfyffer, S. Rüscher-Gerdes, J. Beer, H. Mauch (1998), or the respectively actual edition.

Deutsche Post: *Regelungen für die Beförderung von gefährlichen Stoffen und Gegenständen, Teil 1: Brief National* (Regulations of the Deutsche Post for the transport of infectious substances and objects, Part 1: Letter, national) (valid as of 2009-08-01)

Europäisches Übereinkommen über die internationale Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße (ADR), Bezugsquelle Beuth Verlag GmbH

Europäisches Übereinkommen über die internationale Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße (ADR) (European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road), source of supply Beuth Verlag GmbH

Gefahrgutverordnung Straße und Eisenbahn — GGVSE, *Verordnung über die innerstaatliche und grenzüberschreitende Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße und mit der Eisenbahn*, Bezugsquelle Beuth Verlag GmbH

Gefahrgutverordnung Straße und Eisenbahn — GGVSE, Verordnung über die innerstaatliche und grenzüberschreitende Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße und mit der Eisenbahn (Ordinance on the intra- and interstate transport of dangerous goods by road and rail), source of supply Beuth Verlag GmbH

Infektionsschutzgesetz vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das zuletzt durch Artikel 2a des Gesetzes vom 17. Juli 2009 (BGBl. I S. 2091) geändert worden ist, Bezugsquelle Beuth Verlag GmbH

Infektionsschutzgesetz (German Protection against Infection Act) of 20 July 2000 (BGBl. I (Federal Law Gazette I), p. 1045), as last amended by Article 2a of the Act of 17 July 2009 (BGBl. I, p. 2091), source of supply Beuth Verlag GmbH

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach DIN 58943-3, DIN 58943-4, DIN EN 12128 und die folgenden Begriffe.

3.1

Hellfeldverfahren

Lichtmikroskopisches Durchlichtverfahren

3 Terms and definitions

For the purposes of this document, the terms and definitions given in DIN 58943-3, DIN 58943-4 and DIN EN 12128 and the following apply.

3.1

bright field technique

light-microscopic technique using transmitted light

3.2

Fluoreszenzverfahren

Fluoreszenzmikroskopisches Auflichtverfahren

3.2

fluorescence technique

fluorescence-microscopic technique using incident light

3.3

Begleitkeim

im Untersuchungsgut neben den Mykobakterien vorhandener Mikroorganismus

3.3

concomitant flora

microorganisms present in the specimen in addition to the mycobacteria

3.4

Gesichtsfeld

Sehfeld

Dingfeld

vom Mikroskopobjektiv entworfenes Zwischenbild, das in der so genannten Sehfeldblende des Okulars entsteht

3.4

field of vision

field of view

object field

intermediate image produced by the microscope objective and generated in the so-called field stop of the ocular

ANMERKUNG Der Durchmesser (in mm) der Sehfeldblende definiert die Sehfeldzahl eines Okulars. Die Sehfeldzahl bestimmt die Größe des Gesichtsfeldes für den Beobachter. Je größer ihr Wert ist, desto größer ist die Fläche, die der Beobachter vom Präparat überblickt. Die gängigsten Sehfeldzahlen sind 18 (z. B. Kursmikroskope), 20 und 22 (z. B. Labor- und Forschungsmikroskope). Für nähere Informationen siehe Anhang A.

NOTE The field of vision number of an ocular is defined by the diameter (in mm) of the ocular's field stop. The field of vision number in turn defines the size of the field of vision of the observer. The higher this value is, the larger is the area of the specimen the observer can survey. The most common field of vision numbers are 18 (e.g. student's microscope), 20 and 22 (e.g. laboratory and research microscopes). For more information see Annex A.