

DIN 58943-32

ICS 07.100.10

Ersatz für
DIN 58943-32:2011-03

**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 25 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung	5
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
5.3 Behandlungskontrolle	9
6 Mikroskopische Ausrüstung	10
7 Reagenzien	10
7.1 Karbolfuchsinlösung	10
7.2 Salzsäure-Alkohol	11
7.3 Methylenblaulösung nach Löffler	11
7.4 Phenol-Auramin-Lösung	11
8 Anfertigung und Färbung der mikroskopischen Präparate	11
8.1 Allgemeines	11
8.2 Herstellung der Ausstriche	12
8.3 Fixation	12
8.4 Färbung	12
8.4.1 Auswahl der Methode, allgemeine Hinweise	12
8.4.2 Hellfeldverfahren	13
8.4.3 Fluoreszenzverfahren	13
9 Durchführung der Mikroskopie	14
9.1 Allgemeine Angaben	14
9.2 Hellfeldverfahren	14
9.3 Fluoreszenzverfahren	14
10 Beurteilung	14
11 Befundmitteilung	15
12 Qualitätssicherung	17
12.1 Ziel der Qualitätssicherung	17
12.2 Laborinterne Qualitätskontrollen	19
12.2.1 Reagenzien und Färbequalität	19
12.2.2 Gerätefunktion	20
12.2.3 Plausibilitätskontrolle	21
12.3 Aufbewahrung positiver Präparate	21
12.4 Externe Qualitätskontrolle	21
Anhang A (informativ) Hinweise zur Sensitivität der Mikroskopie	22
Literaturhinweise	25

Contents

	Page
Foreword	3
Introduction	5
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	10
7 Reagents	10
7.1 Carbol fuchsin solution	10
7.2 Hydrochloric acid/alcohol	11
7.3 Methylene blue solution according to Loeffler	11
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	12
8.3 Fixation	12
8.4 Staining	12
8.4.1 Selection of the method, general information	12
8.4.2 Bright-field technique	13
8.4.3 Fluorescence technique	13
9 Microscopic procedure	14
9.1 General information	14
9.2 Bright-field technique	14
9.3 Fluorescence technique	14
10 Assessment	14
11 Reporting	15
12 Quality assurance	15
12.1 Objective of the quality assurance	17
12.2 Intra-laboratory quality controls	19
12.2.1 Reagents and staining quality	19
12.2.2 Functioning of the equipment	20
12.2.3 Plausibility control	21
12.3 Storage of positive specimens	21
12.4 External quality control	21
Annex A (informative) Information regarding the sensitivity of microscopy	22
Bibliography	25

Vorwort

Die Norm wurde vom Arbeitsausschuss NA 063-05-03 AA „Tuberkulose- und Mykobakteriendiagnostik“ des DIN-Normenausschusses Medizin 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.

Diese Norm enthält sicherheitstechnische Anforderungen in Abschnitt 4.

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 Mykobakteriosediagnostik — 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 DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed) (Medical Standards Committee (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.

This standard specifies safety regulations in clause 4.

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 58943-32:2011-03 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die redaktionelle Überarbeitung;
- b) die zeitlichen Abstände für Behandlungskontrollen in 5.3 wurden aktualisiert;
- c) die allgemeinen Anforderungen sowie die zur Herstellung von Ausstrichen wurden in Abschnitt 8 angepasst;
- d) Abschnitt 10 wurde hinsichtlich der Empfehlung zur Anwendung von molekulargenetischen Techniken bei erstmaligem Nachweis von säurefesten Stäbchen bei einem Patienten bzw. bei morphologisch/färberisch zweifelhaften Ergebnissen überarbeitet;
- e) die Aktualisierung von Tabelle 1;
- f) die Anpassung von Abschnitt 11 und Abschnitt 12 sowie Anhang A an den Stand der Technik und Wissenschaft.

Amendments

In comparison to DIN 58943-32:2011-03, the following amendments have been made:

- a) the editorial revision;
- b) the time intervals for treatment controls in 5.3 were updated;
- c) the general requirements and those for the preparation of smears in clause 8 were revised;
- d) clause 10 was worked over in regards to the recommendation for the use of molecular-biological techniques in case of first time detection of acid-fast rods related to a patient, but also in regards to questionable results of the morphology assessment by means of staining;
- e) the update of table 1;
- f) the adaption of clause 11 and clause 12 as well as annex A with regards to the current state of science and technology.

Frühere Ausgaben

DIN 54893-32: 1982-02, 1986-08, 1995-01, 2011-03

Previous editions

DIN 54893-32: 1982-02, 1986-08, 1995-01, 2011-03

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 hochinfektöser 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 recognizing, 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 Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, 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 58943-4, *Medizinische Mikrobiologie — Tuberkulosedagnostik — Teil 4: Primärproben zur Tuberkulose- und Mykobakteriosediagnostik — Qualitative und quantitative Anforderungen, Gewinnung, Transport und Aufbewahrung*

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 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 documents, in whole or in part, are normatively referenced in this document and are indispensable for its application. 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 58943-4, *Medical microbiology — Diagnosis of tuberculosis — Part 4: Primary samples for the diagnosis of tuberculosis and mycobacteria — Qualitative and quantitative requirements, extraction, transport and storage*

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

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

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)¹⁾

Gefahrgutverordnung Straße und Eisenbahn — GGVSE, Verordnung über die innerstaatliche und grenzüberschreitende Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße und mit der Eisenbahn ¹⁾

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

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

3.2

Fluoreszenzverfahren

Fluoreszenzmikroskopisches Auflichtverfahren

3.3

Begleitkeim

im Untersuchungsgut neben den Mykobakterien vorhandener Mikroorganismus

3.4

Gesichtsfeld

Sehfeld, Dingfeld

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

Anmerkung 1 zum Begriff: 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.

1) 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) ¹⁾

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) ¹⁾

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) ¹⁾

3 Terms and definitions

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

3.1

bright-field technique

light-microscopic technique using transmitted light

3.2

fluorescence technique

fluorescence-microscopic technique using incident light

3.3

concomitant flora

microorganisms present in the specimen in addition to the mycobacteria

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

Note 1 to entry: 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.

1) Source of supply Beuth Verlag GmbH.

3.5 Objektivvergrößerung

Abbildungsmaßstab oder die Maßstabszahl des Objektivs

3.6
aq. dest.
aqua destillata, destilliertes Wasser

4 Anforderungen an die Arbeitssicherheit

Bei den in dieser Norm empfohlenen Untersuchungsmethoden müssen die Betriebssicherheitsverordnung mit den entsprechenden TRBS (Technische Regeln für Betriebssicherheit), die Gefahrstoffverordnung mit den entsprechenden TRGS (Technische Regeln für Gefahrstoffe) und die Biostoffverordnung (BioStoffV) mit den entsprechenden TRBA (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe) eingehalten werden. Außerdem sind die Anforderungen an Räumlichkeiten und technische Ausstattung nach DIN 58959-4 zu beachten.

Die in dieser Norm empfohlenen Methoden zur Untersuchung von humanem Untersuchungsgut sind nach der Biostoffverordnung als nicht gezielte Tätigkeiten zur Tuberkulosedagnostik anzusehen. Sie sind demnach in medizinisch-mikrobiologischen Laboratorien mindestens der Sicherheitsstufe 2 nach DIN EN 12128 bzw. Schutzstufe 2 nach Biostoffverordnung durchzuführen.

Werden die in dieser Norm genannten Färbe- und Mikroskopieverfahren auch auf Kulturen von Tuberkulosebakterien angewandt, müssen die Vorgaben für Schutzstufe 3 eingehalten werden.

Die in dieser Norm genannten Chemikalien (siehe Abschnitt 7) sind zum Teil potentiell gesundheitsschädlich (Karbolfuchsin, Methylblau), toxisch (Auramine O, Phenol), krebserregend (Phenol) oder ätzend (Phenol, Salzsäure). Bei der Handhabung dieser Stoffe müssen die jeweiligen sicherheitsbezogenen Informationen (Sicherheitsdatenblätter) beachtet werden, um einen sicheren Umgang, insbesondere bei der Herstellung von Färbereagenzien, zu garantieren.

Bei der Ziehl-Neelsen Färbung werden mit Karbolfuchsin beschichtete Objektträger bis zur Dampfbildung erhitzt. Dabei entstehen potentiell toxische

3.5
objective magnification
objective enlargement
the objective's scale of reproduction

3.6
aq. dest.
aqua destillata, distilled water

4 Occupational health and safety requirements

When performing the examination methods recommended in this standard, the *Betriebssicherheitsverordnung* (Ordinance on Industrial Safety and Health) with its respective *TRBS* (Technical Rules for Industrial Safety and Health), the *Gefahrstoffverordnung* (Hazardous Substances Ordinance) with its respective *TRGS* (Technical Rules for Hazardous Substances) and the *Biostoffverordnung* (Ordinance on Safety and Health Protection at Workplaces Involving Biological Agents, BioStoffV) with its respective *TRBA* (Technical Rules for Biological Agents) shall be complied with. Furthermore, the requirements for the work place and technical equipment in accordance with DIN 58959-4 shall be taken into consideration.

The methods for the examination of human specimens recommended in this standard are regarded as unspecific work for the purposes of the diagnosis of tuberculosis in accordance with the *Biostoffverordnung*. They shall, therefore, be performed in medical-microbiological laboratories of at least containment level 2 in accordance with DIN EN 12128 or biosafety level 2 in accordance with the *Biostoffverordnung*.

If the staining procedures and microscopy methods according to this standard are applied to specimens of tubercle bacilli cultures, the provisions for biosafety level 3 shall be complied with.

The chemicals listed in this standard (see clause 7) are partly potentially harmful (Carbol-Fuchsin, Methylene blue), toxic (Auramine O, Phenol), carcinogenic (Phenol) or caustic (Phenol, Hydrochloric acid). When handling these substances, the relevant safety-related information (safety data sheets) shall be considered in order to ensure the safe handling, particularly in the manufacture of staining reagents.

When using Ziehl-Neelsen staining, microscope slides coated with Carbol fuchsin are heated until the formation of vapour. This process potentially