

DIN 58943-5**DIN**

ICS 07.100.10

**Medizinische Mikrobiologie –
Tuberkulosedagnostik –
Teil 5: Molekularbiologische Identifizierung und Differenzierung von
Tuberkulosebakterien;
Text Deutsch und Englisch**

Medical microbiology –
Diagnosis of tuberculosis –
Part 5: Molecularbiologica
Text in German and English

Microbiologie médicale –
Diagnostic de tuberculose –
Partie 5: Identification molecularbiologique et la différenciation des bacilles tuberculeux;
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 13 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen.....	6
3 Begriffe	6
4 Abkürzungen.....	7
5 Anforderungen an die biologische Sicherheit	7
6 Voraussetzungen für die Differenzierung von Tuberkulosebakterien.....	7
7 Referenzmethoden	8
7.1 Allgemeines.....	8
7.2 SNP-Analyse des <i>gyrB</i> -Gens.....	8
7.2.1 Qualitätsbeurteilung der Sequenzierung ...	9
7.2.2 Grenzen der <i>gyrB</i> -SNP-Analyse.....	10
7.3 Nachweis der RD1-Deletion bei <i>M. bovis</i> BCG	10
8 Qualitätskontrolle	11
8.1 Interne Qualitätskontrolle	11
8.2 Externe Qualitätskontrolle.....	11
Literaturhinweise	12

Contents

	Page
Foreword	3
1 Scope.....	6
2 Normative references	6
3 Terms and definitions	6
4 Abbreviations	7
5 Requirements for biological safety	7
6 Pre-requisites for the differentiation of tubercle bacilli	7
7 Reference methods	8
7.1 General	8
7.2 SNP analysis of the <i>gyrB</i> gen	8
7.2.1 Quality assessment of sequencing	9
7.2.2 Limits of the <i>gyrB</i> SNP analysis	10
7.3 Detection of the RD1 deletion in the case of <i>M. bovis</i> BCG	10
8 Quality control	11
8.1 Internal quality control	11
8.2 External quality control	11
Bibliography.....	12

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 diagnostics 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

Einleitung

Das klinische Bild einer Tuberkulose kann von mehreren, genetisch eng verwandten Mykobakterien-Arten hervorgerufen werden. Sie werden zu den Tuberkulosebakterien (*Mycobacterium tuberculosis*-Komplex) zusammengefasst. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Norm zählten folgende Arten zu den Tuberkulose-bakterien. *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis* (Synonym: *M. bovis*), *M. bovis* subsp. *caprae* (Synonym: *M. caprae*), *M. microti*, *M. pinnipedii*. „*M. canettii*“ wird als Variante von *M. tuberculosis* angesehen. *M. tuberculosis* kommt weltweit vor und ist in Europa der am häufigsten isolierte Erreger der Tuberkulose. *M. africanum* ist endemisch auf Afrika beschränkt und kann dort zu einem erheblichen Prozentsatz von TB-Patienten isoliert werden. Infektionen mit *M. bovis* (beide Subspezies) werden im deutschsprachigen Raum selten beobachtet (ca. 1 % bis 2 % der Tuberkulose-Fälle [11]). Über Infektionen mit *M. microti* oder *M. pinnipedii* wurde bislang nur in Einzelfällen berichtet.

Während *M. tuberculosis* und *M. africanum* fast ausschließlich Infektionen beim Menschen verursachen, werden die anderen Arten der Tuberkulosebakterien auch bei Tieren gefunden. Die *M. bovis* BCG Stämme sind attenuierte *M. bovis* Stämme und werden zur Impfung eingesetzt. Beim Blasenkarzinom dienen sie als Immuntherapeutikum, weshalb sie aus dem Urin entsprechender Patienten isoliert werden können. Ihre Pathogenität ist gering.

Die Regeln für die Beschreibung einer Bakterienart werden vom *International Committee on Systematics of Prokaryotes* festgelegt und sehen folgende Kriterien vor [1], [2]:

- 1) Genetische Divergenz: mindestens 30 % genetische Differenz in DNA-DNA-Hybridisierungsversuchen oder mindestens 3 % Sequenzunterschied im kompletten 16S-rRNA-Gen von allen anderen Arten derselben Gattung.
- 2) Phänotypische Divergenz: mindestens ein phänotypisches Merkmal muss eine eindeutige Differenzierung gegenüber den anderen Arten derselben Gattung ermöglichen.

Diese Kriterien wurden bei den Tuberkulosebakterien verlassen. Das 16S-rRNA-Gen ist bei allen Arten der Tuberkulosebakterien identisch. DNA-DNA-Hybridisierungsversuche wurden bei den Art-Beschreibungen unterlassen. Phänotypische Methoden ermöglichen keine eindeutige Differenzierung aller Arten. Die phänotypischen Beschreibungen der neueren Taxa *M. bovis* subsp. *caprae* (Synonym *M. caprae*), *M. microti* und *M. pinnipedii* basierten zum Teil nur auf wenigen Isolaten.

Introduction

The clinical picture of tuberculosis can be caused by several genetically closely related mycobacteria species. These species are summarized as tubercle bacilli (*Mycobacterium tuberculosis* complex). At the time of the preparation of this standard, the following species were regarded as tubercle bacilli: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis* (synonym: *M. bovis*), *M. bovis* subsp. *caprae* (synonym: *M. caprae*), *M. microti*, *M. pinnipedii*. „*M. canettii*“ is regarded as a variant of *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* occurs worldwide and is the tuberculosis pathogen isolated most often in Europe. *M. africanum* is endemically limited to Africa and a high percentage can be isolated there from TB patients. Infections with *M. bovis* (both subspecies) are rarely encountered in the German-speaking region (approximately 1 % to 2 % of the tuberculosis cases) [11]. Infections with *M. microti* or *M. pinnipedii* have, so far, only been reported in individual cases.

While *M. tuberculosis* and *M. africanum* cause infections almost exclusively in humans, the other species of tubercle bacilli are also found in animals. The *M. bovis* BCG type strains are attenuated *M. bovis* strains and are used for vaccinations. They are also used as an immunotherapeutic agent for the treatment of bladder cancer, which is why they can be isolated from the urine of affected patients. Their pathogenicity is low.

The rules for describing a bacterial species are specified by the *International Committee on Systematics of Prokaryotes* and include the following criteria [1], [2]:

- 1) genetic divergence: a genetic difference of at least 30 % in DNA-DNA hybridization assays or a sequence difference of at least 3 % in the complete 16S-rRNA gene when compared to all the other species of the same genus.
- 2) phenotypic divergence: at least one phenotypic characteristic shall enable an unambiguous differentiation with regard to the other species of the same genus.

These criteria have been abandoned in the case of tubercle bacilli. The 16S-rRNA gene is identical in all tubercle bacilli species. The DNA-DNA hybridization tests were omitted in the descriptions of the species. Phenotypic methods do not enable an unambiguous differentiation of all species. The phenotypic descriptions of the more recent taxa *M. bovis* subsp. *caprae* (synonym *M. caprae*), *M. microti* and *M. pinnipedii* were partly based on only few isolates.