

ICS 07.100.10

Medical microbiology – Diagnostics 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)

Microbiologie médicale – Diagnose des maladies infectieuses en sérologie et biologie moléculaire – Partie 62: Réaction en chaîne polymérase (RCP); Exigences spéciales de la détection des séquences d'acide nucléique du complexe tuberculose

Vorwort

Diese Norm wurde vom Arbeitskreis E 3/E 9 „Molekularbiologischer Nachweis von Mykobakterien“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. erarbeitet.

DIN 58969 *Medizinische Mikrobiologie – Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten* besteht aus:

- Teil 10: *Komplementbindungsreaktion (KBR)* (zz. Entwurf)
- Teil 41: *Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Antikörpern gegen Human-Immunschwäche-Virus HIV-1 oder HIV-2*
- Teil 42: *Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen an den Nachweis von Antikörpern gegen Helicobacter pylori* (zz. in Vorbereitung)
- Teil 43: *Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen an den Nachweis von Antikörpern gegen Yersinia* (zz. in Vorbereitung)
- Teil 44: *Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen an den Nachweis von Antikörpern gegen Borrelia* (zz. in Vorbereitung)
- Teil 61: *Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen der Human-Immunschwäche-Viren HIV-1 oder HIV-2*
- Teil 62: *Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen des Mycobacterium-tuberculosis-Komplexes (MTC)*

Foreword

This standard was drafted by the working party E 3/E 9 “Molecular detection of mycobacteria” of the Medical Standards Committee (Normenausschuss Medizin; NAMed) at the German Institute for Standardization (DIN Deutsches Institut für Normung e. V.).

DIN 58969 *Medical microbiology – Diagnosis of infectious diseases in serology and molecular biology* includes:

- Part 10: *Complement fixation reaction (CFR)* (presently draft).
- Part 41: *Immunoblot (IB); Special requirements for the detection of antibodies against Human Immunodeficiency Virus HIV-1 or HIV-2.*
- Part 42: *Immunoblot (IB); Special requirements for the detection of antibodies against Helicobacter pylori* (presently in preparation).
- Part 43: *Immunoblot (IB); Special requirements for the detection of antibodies against Yersinia* (presently in preparation).
- Part 44: *Immunoblot (IB); Special requirements for the detection of antibodies against Borrelia* (presently in preparation).
- Part 61: *Polymerase chain reaction (PCR); Special requirements for the detection of nucleic acid sequences of the Human Immunodeficiency Viruses HIV-1 and HIV-2.*
- Part 62: *Polymerase chain reaction (PCR); Special requirements for the detection of nucleic acid sequences of the mycobacterium tuberculosis complex (MTC).*

Fortsetzung Seite 2 bis 14

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

- Teil 64: *Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Genotypisierung von Hepatitis-C-Virus (HCV)* (zz. in Vorbereitung).

Diese Norm berührt Schutzrechte. Auskunft erteilt der Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., 10772 Berlin.

Einleitung

Zur Darstellung der Problematik des Nukleinsäurenachweises von Tuberkulosebakterien wird auf Folgendes hingewiesen:

Die Tuberkulose ist weltweit weiterhin eine der häufigsten Todesursachen bei Infektionskrankheiten im Erwachsenenalter. Die Tuberkulose ist eine in Deutschland nach § 6 und § 7 Infektionsschutzgesetz meldepflichtige Krankheit. Eine möglichst frühzeitige Diagnose der Tuberkulose ist wünschenswert, da sie die Behandlungserfolge verbessert und dadurch Infektketten vermeidet bzw. unterbricht.

Der mikroskopische Nachweis säurefester Stäbchen ist schnell, aber mit dem Problem mangelnder Sensitivität und Spezifität behaftet. Der kulturelle Nachweis liefert häufig erst Tage bis Wochen nach Probenverarbeitung Ergebnisse. Beide Nachweismethoden können jedoch durch molekularbiologische Nachweismethoden nicht ersetzt werden; die Mikroskopie und die Kultur gelten weiterhin als Standardmethoden, die parallel zur Amplifikation durchgeführt werden. Einzelheiten zum differenzierten Einsatz der Nachweismethode siehe [1].

Der Nachweis von Tuberkulosebakterien erfordert technische Voraussetzungen für den sicheren Umgang mit Mykobakterien (siehe Normen der Reihe DIN 58943 und DIN EN 12128).

Diese Norm ist auf den Nachweis des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC) beschränkt. Technisch ist der Nachweis anderer Mykobakterien mit vergleichbaren Methoden möglich. Der molekularbiologische Nachweis des MTC kann die konventionellen Methoden ergänzen auf Grund seiner Sensitivität und Spezifität und der geringen Verzugszeit zwischen Probenentnahme und Ergebnisstellung. Die Aussagekraft (positiv prädiktiver Wert) des Nukleinsäurenachweises für MTC ist zwischen 65 % und 95 % abhängig von den Mykobakterien und vom Untersuchungsgut.

Der Nukleinsäurenachweis von MTC korreliert nicht notwendigerweise mit Infektiosität und Lebensfähigkeit der Erreger. Deshalb ist der Nukleinsäurenachweis von MTC für eine Therapiekontrolle zurzeit nicht geeignet.

- Part 64: *Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Genotypisierung von Hepatitis-C-Virus (HCV)* (presently in preparation).

This standard concerns patent rights. Details can be obtained from Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. 10772 Berlin, Germany.

Introduction

The following notes describe the problematic nature of the detection of nucleic acid of tuberculosis bacteria:

Tuberculosis still being world-wide for adults one of the most frequent causes of death with infectious diseases. In Germany, tuberculosis is a disease obliged to be registered according to § 6 and § 7 of the Protection against Infection Act (Infektionsschutzgesetz). A diagnosis of tuberculosis as early as possible is desirable as it may help to improve the success of treatment and thus to avoid or to interrupt respectively chains of transmission.

The microscopic detection of acid-fast rods is quick but is unfortunately afflicted with the lack of sensitivity and specificity. After sample processing the detection by culturing often delivers results only after days to weeks. However, both detection methods cannot be replaced by molecular biological detection methods; both methods, microscopy and culturing, still apply as standard methods which are carried out in parallel to amplification. For details for the differentiated use of the detection method see [1].

The detection of tuberculosis bacteria requests technical requirements for the handling of mycobacteria (see standards of the series DIN 58943 and DIN EN 12128).

This standard only applies to the detection of the *mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). The detection of other mycobacteria by means of comparable methods is technically possible. Because of its sensitivity and specificity and the short time period between sample taking and reporting of result, the molecular biological detection of MTC may supplement conventional methods. The precision of the statements (positive predicative value) of the detection of nucleic acids of the MTC ranges between 65 % and 95 % depending on the mycobacteria and the test material.

The detection of nucleic acids of the MTC does not necessarily correlate with infectiousness and viability of the pathogen. This is why the detection of nucleic acid of MTC actually is not suitable as an appropriate instrument for therapy control.

Spezifikationen zum Einsatz der Nukleinsäureamplifikate von MTC sind aufgeführt in [1], [5], [6] und in DIN 58943 Bbl 1 (zz. in Vorbereitung).

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für den Direktnachweis von Nukleinsäuren des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC) aus menschlichem Untersuchungsgut über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach DIN 58967-60 und andere äquivalente Nukleinsäurenachweis-Verfahren. Sie legt die methodenspezifischen Anforderungen an den qualitativen und quantitativen Nachweis der Nukleinsäuren über Nukleinsäureamplifikation und/oder Nukleinsäurehybridisierung fest.

Die Festlegungen dieser Norm gelten analog auch für weitere Amplifikationsverfahren zum Direktnachweis von Nukleinsäuren des MTC, sofern diese Verfahren zu einem Ergebnis mit einer mindestens gleichwertigen diagnostischen Aussage führen. Voraussetzung für den Direktnachweis von MTC mit dem gewählten Nukleinsäurenachweis-Verfahren ist die Erfüllung der in Abschnitt 10 getroffenen Festlegungen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität.

Derzeitige Indikationen für die Durchführung der Nukleinsäureamplifikation und Nukleinsäurehybridisierung für MTC setzen den begründeten Verdacht auf das Vorliegen einer Tuberkulose voraus. Unter diesen Voraussetzungen gehören dazu

- Abklärung fraglicher Befunde nach mikroskopischer Untersuchung;
- Abklärung verdächtiger klinischer und röntgenologischer Befunde;
- Proben von Patienten mit besonderer Disposition, z. B. Immunsuppression, verdächtige Krankheitszeichen nach Aufenthalt in Endemiegebieten;
- Differenzierung zwischen Spezies des MTC und ubiquitär vorkommender Mykobakterien.

Diese Norm gilt nur für die zum MTC gehörenden Mykobakterien. Sie gilt nicht für andere Mykobakterien wie z. B. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium kansasii* und *Mycobacterium abscessus*.

Ziel dieser Norm ist es, bei der Durchführung des Nukleinsäurenachweises, am Beispiel der PCR, für die Diagnostik der Tuberkulose von Laboratorium zu Laboratorium reproduzierbare und vergleichbare Untersuchungsergebnisse zu ermöglichen.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte und undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publi-

Specifications for the use of nucleic acid amplificates of MTC are listed in [1], [5], [6] and in Supplement 1 to DIN 58943 (currently under preparation).

1 Scope

This standard applies to the direct detection of nucleic acids of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) from human test material by means of the polymerase chain reaction (PCR) according to DIN 58967-60 as well as to other equivalent methods for the detection of nucleic acids. It establishes the method-specific requirements for the qualitative and quantitative detection of nucleic acids by means of nucleic acid amplification and/or nucleic acid hybridisation.

The specifications of this standard also apply analogously to other amplification methods for the direct detection of nucleic acids of MTC, as far as these methods ensure results with at least equivalent diagnostic statements. Prerequisite for the direct detection of MTC with the chosen method of detection of nucleic acid is that all specifications made under clause 10 are fulfilled with regards to sensitivity and specificity.

Present indications for the performance of nucleic acid amplification and nucleic acid hybridisation for MTC assume the well-founded suspicion of the presence of tuberculosis. Under these circumstances this includes:

- Verification of questionable results after microscopic examination;
- Verification of suspicious clinical and X-ray results;
- Samples of patients with special disposition, e.g. immunosuppression, suspicious symptoms after travelling in endemic areas;
- Differentiation between species of MTC and ubiquitous mycobacteria in the environment.

This standard is only valid for mycobacteria belonging to MTC. It does not apply for other mycobacteria, such as *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium abscessus*.

The purpose of this standard is to enable with the performance of the nucleic acid detection procedure, by way of example of PCR, comparable and reproducible test results among various laboratories for the diagnosis of tuberculosis.

2 Normative references

This standard incorporates by dated or undated references, provisions from other publications.

kationen. Die normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

DIN 58936-1, *Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin – Teil 1: Grundbegriffe*.

DIN 58936-2, *Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin – Teil 2: Begriffe zur Qualität und Anwendung von Klassierungs-, Zähl- und Messsystemen*.

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

DIN 58943-7, *Medizinische Mikrobiologie – Tuberkulosedagnostik – Teil 7: Modifiziertes Löwenstein-Jensen-Kulturmedium zur Anzucht von Mykobakterien*.

DIN 58943-8, *Medizinische Mikrobiologie – Tuberkulosedagnostik – Teil 8: Empfindlichkeitsprüfungen von Tuberkulosebakterien gegen Chemotherapeutika*.

E DIN 58943-9, *Medizinische Mikrobiologie – Tuberkulosedagnostik – Teil 9: Mindestanforderungen zur Identifizierung von Tuberkulosebakterien*.

DIN 58943-32, *Medizinische Mikrobiologie – Tuberkulosedagnostik – Teil 32: Mikroskopische Methoden zum Nachweis von Mykobakterien*.

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

DIN 58967-10, *Serodiagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten – Teil 10: Begriffe, allgemeine Anforderungen*.

DIN 58967-30, *Serodiagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten – Teil 30: ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay); Begriffe, allgemeine methodenspezifische Anforderungen*.

DIN 58967-60, *Serodiagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten – Teil 60: Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Begriffe, allgemeine methodenspezifische Anforderungen*.

DIN EN 12128, *Biotechnologie – Laboratorien für Forschung, Entwicklung und Analyse – Sicherheitsstufen mikrobiologischer Laboratorien, Gefahrenbereiche, Räumlichkeiten und technische Sicherheitsanforderungen; Deutsche Fassung EN 12128:1998*.

[1] Kirschner, P. et al.: *Diagnosis of Mycobacterial Infections by Nucleic Acid Amplification: 18-Month Prospective Study*, J. Clin. Microbiol. (1996) 34, 304–312

These normative references are cited at the appropriate places in the text and the publications are listed hereafter. For dated references, subsequent amendments to or revisions of any of these publications apply to this standard only when incorporated in it by amendment or revision. For undated references the latest edition of the publication referred to applies.

DIN 58936-1, *Quality assurance in laboratory medicine – Part 1: Basic terminology*.

DIN 58936-2, *Quality assurance in laboratory medicine – Part 2: Terminology for quality and application of classification, counting and measuring systems*.

DIN 58943-3, *Medical Microbiology – Diagnosis of tuberculosis – Part 3: Culturing methods for the detection of mycobacteria*.

DIN 58943-7, *Medical Microbiology – Diagnosis of tuberculosis – Part 7: Modified Löwenstein-Jensen-culture medium for the growth of mycobacteria*.

DIN 58943-8, *Medical Microbiology – Diagnosis of tuberculosis – Part 8: Susceptibility testing of tuberculosis bacteria to antimicrobial agents*.

E DIN 58943-9, *Medical Microbiology – Diagnosis of tuberculosis – Part 9: Minimum requirements to the identification of tuberculosis bacteria*.

DIN 58943-32, *Medical Microbiology – Diagnosis of tuberculosis – Part 32: Microscopic methods for the detection of mycobacteria*.

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

DIN 58967-10, *Serodiagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system – Part 10: Terminology, general requirements*.

DIN 58967-30, *Serodiagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system – Part 30: ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay), Terminology, general method-specific requirements*.

DIN 58967-60, *Serodiagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system – Part 60: Polymerase-chain reaction (PCR), Terminology, general method-specific requirements*.

DIN EN 12128, *Biotechnology – Laboratories for research, development and analysis – Safety categories for microbiological laboratories, areas of risk, localities and technical safety requirements; German edition EN 12128:1998*.

[1] Kirschner, P. et al.: *Diagnosis of Mycobacterial Infections by Nucleic Acid Amplification: 18-Month Prospective Study*, J. Clin. Microbiol. (1996) 34, 304–312

- [2] Böddinghaus, B. et al.: Detection and Identification of Mycobacteria by Amplification of rRNA, J. Clin. Microbiol. (1990) 28, 1751–1759
- [3] Eisenach, K. D. et al.: Polymerase Chain Reaction Amplification of a Repetitive DNA Sequence Specific for Mycobacterium tuberculosis, J. Infect. Dis. (1990) 161, 977–981
- [4] Tevere, V. J. et al.: Detection of Mycobacterium tuberculosis by PCR Amplification with Pan-Mycobacterium Primers and Hybridization to an M. tuberculosis-Specific Probe, J. Clin. Microbiol. (1996) 34, 918–923

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die Begriffe nach

- DIN 58967-10 für die Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten;
- DIN 58936-1 und DIN 58936-2 für die Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin;
- den Normen der Reihe DIN 58943, insbesondere DIN 58943-3, DIN 58943-7, DIN 58943-8, E DIN 58943-9 und DIN 58943-32 für die Tuberkulosedagnostik;
- DIN 58967-60 für die PCR

zusammen mit folgenden:

3.1

analytische Sensitivität der PCR von MTC

berechnete analytische Empfindlichkeit des Nukleinsäurenachweises, wobei die Bewertung des Ergebnisses der Probe als richtig-positiv und falsch-negativ anhand des kulturellen Mykobakterien-Nachweises derselben Probe nach DIN 58943-3 vorgenommen wird

3.2

diagnostische Sensitivität der PCR von MTC

berechnete diagnostische Empfindlichkeit des Nukleinsäurenachweises, wobei die Bewertung des Ergebnisses als richtig-positiv und falsch-negativ durch die klinische Diagnose der Tuberkulose gegeben wird

3.3

analytische Spezifität der PCR von MTC

berechnete Spezifität des Nukleinsäurenachweises, wobei die Bewertung der Ergebnisse als richtig-negativ oder falsch-positiv anhand des kulturellen Mykobakterien-Nachweises derselben Probe nach DIN 58943-3 vorgenommen wird

- [2] Böddinghaus, B. et al.: Detection and Identification of Mycobacteria by Amplification of rRNA, J. Clin. Microbiol. (1990) 28, 1751–1759
- [3] Eisenach, K. D. et al.: Polymerase Chain Reaction Amplification of a Repetitive DNA Sequence Specific for Mycobacterium tuberculosis, J. Infect. Dis. (1990) 161, 977–981
- [4] Tevere, V. J. et al.: Detection of Mycobacterium tuberculosis by PCR Amplification with Pan-Mycobacterium Primers and Hybridization to an M. tuberculosis-Specific Probe, J. Clin. Microbiol. (1996) 34, 918–923

3 Definitions

For the use of this standard the definitions apply according to

- DIN 58967-10 for the diagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system;
- DIN 58936-1 and DIN 58936-2 for the quality assurance in laboratory medicine;
- the standard of the series DIN 58943, especially DIN 58943-3, DIN 58943-7, DIN 58943-8, E DIN 58943-9 and DIN 58943-32 for the diagnosis of tuberculosis;
- DIN 58967-60 for PCR

together with the following:

3.1

analytical sensitivity of PCR of MTC

related analytical sensitivity of the detection of nucleic acid, where the assessment of the result of the sample as true-positive and false-negative is linked to the cultural detection of mycobacteria of the same sample according to DIN 58943-3

3.2

diagnostic sensitivity of PCR of MTC

calculated diagnostic sensitivity of the detection of nucleic acid, where the assessment of the result of the sample as true-positive and false-negative is related to the clinical diagnosis of tuberculosis

3.3

analytical specificity of PCR of MTC

calculated specificity of the detection of nucleic acid, where the assessment of the results as true-negative or false-positive are related to the cultural detection of mycobacteria of the same sample according to DIN 58943-3