

DIN 58943-5**DIN**

ICS 07.100.10

Einsprüche bis 2008-09-14

Entwurf

**Medizinische Mikrobiologie –
Tuberkulosedagnostik –
Teil 5: Molekularbiologische Identifizierung und Differenzierung von
Tuberkulosebakterien**

Medical microbiology –
Diagnosis of tuberculosis –
Part 5: Molecular identification and differentiation of tubercle bacilli

Microbiologie médicale –
Diagnostic de tuberculose –
Partie 5:

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2008-05-14 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise als Datei per E-Mail an named@din.de in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den Normenausschuss Medizin (NAMED) im DIN, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevante Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 8 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMED) im DIN

Vorwort

Der Norm-Entwurf wurde vom Arbeitsausschuss NA 063-05-03 AA "Tuberkulosedagnostik" 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 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

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 Tuberkulosebakterien. *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 beschränkt auf Afrika 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 TB-Fälle; RKI-Bericht). Infektionen mit *M. microti* und *M. pinnipedii* wurden 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-Hybridisierungs-Versuchen oder mindestens 3 % Sequenzunterschied in der kompletten 16S-rDNA 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. Die 16S-rDNA ist bei allen Arten der Tuberkulosebakterien identisch. DNA-DNA-Hybridisierungsversuche wurden bei den Art-Beschreibungen unterlassen. Phänotypische Methoden ermöglichen keine eindeutige Identifizierung aller Arten der Tuberkulosebakterien. Die phänotypischen Beschreibungen der neueren Taxa *M. bovis* subsp. *caprae* (Synonym *M. caprae*), *M. bovis* subsp. *bovis* (Synonym *M. bovis*), *M. microti* und *M. pinnipedii* basierten zum Teil nur auf wenigen Isolaten.

Die Taxonomie der Tuberkulosebakterien folgt somit eigenen, nicht standardisierten und zum Teil noch unklaren Regeln. Die Systematik ist nicht ausgereift und entwickelt sich rasch weiter. Die vorliegende Norm kann in die bestehenden Unschärfen keine Klarheit bringen, noch kann sie Einfluss auf die Entwicklung der Systematik der Tuberkulosebakterien nehmen. Sie soll aber standardisieren, wie die für die Humanmedizin bedeutsamsten Arten der Tuberkulosebakterien mit genetischen Tests zu identifizieren und gegeneinander abzugrenzen sind. Zu diesen Arten gehörten zur Zeit der Erstellung dieser Norm *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* und *M. microti* mit ihren jeweiligen Unterarten und Varianten.

Wegen ihrer genetischen Nähe gibt es nur wenige Methoden, die geeignet sind, alle Arten der Tuberkulosebakterien gleichzeitig zu identifizieren. Die SNP (*single nucleotide polymorphism*) Analyse des *gyrB* Gens ermöglicht es, *M. tuberculosis*, *M. bovis bovis*, *M. bovis caprae* und *M. microti* eindeutig zu erkennen [3]. Die SNP können mittels Sequenz-, RFLP (*restriction fragment length polymorphism*)-Analyse oder Hybridisierungs-Assays nachgewiesen werden. Das *gyrB* der *M. bovis* BCG-Stämme ist identisch mit dem anderer *M. bovis bovis* Stämme. Zur Abgrenzung eines Impfstamms gegen virulente *M. bovis bovis* Stämme eignet sich der Nachweis der RD1 (*region of difference 1*), die bei allen Arten der Tuberkulosebakterien vorhanden ist und nur *M. bovis* BCG-Stämmen fehlt. Ein PCR basierter Nachweis der RD1 wurde in einer publizierten Studie validiert [4]. In der vorliegenden Norm werden die genannten Methoden zu einem Algorithmus kombiniert. Es dürfen auch andere Methoden angewendet werden, sofern sie nachweislich zu gleichwertigen Ergebnissen führen (z. B. Restriktionsanalyse oder Hybridisierung zur *gyrB*-Mutationsanalyse; Deletionsanalysen der RD-Regionen).

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für die molekularbiologische Differenzierung von Kulturen von Tuberkulosebakterien (*M. tuberculosis*-Komplex). Sie gilt nicht für die Anwendung auf Direktmaterial.

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 58943-9, *Medizinische Mikrobiologie - Tuberkulosedagnostik - Teil 9: Phänotypische Differenzierung von Tuberkulosebakterien; Text Deutsch und Englisch*

DIN EN 12128:1998-05, *Biotechnik — Laboratorien für Forschung, Entwicklung und Analyse — Sicherheitsstufen mikrobiologischer Laboratorien, Gefahrenbereich, Räumlichkeiten und technische Sicherheitsanforderungen*