

10.4 Checkliste Mikrobiologie und Hygiene – Mykologie

*G. Haase, M. Abele-Horn, H. Blenk, H.-J. Boltze, L. Drath, B. Ganster,
H. K. Geiss, U. Göbel, E. Heintschel von Heinegg, K. Janitschke, R. Küchler,
E. Kühnen, W. Mathys, R. Rüchel, C. Schoerner, K. Tintelnot, S. Ziesing*

Anwendungsbereich	3
Räumlichkeiten	4
Laboratoriumsausrüstungen	5
Untersuchungsverfahren	5
Sicherung der Qualität von Untersuchungsverfahren	8
Nährmedien	8
Färbungs-, Differenzierungsverfahren, Empfindlichkeitstestung	9

4.1	Anwendungsbereich			
------------	--------------------------	--	--	--

Der Leistungsumfang in diesem Gebiet variiert erheblich von einem Laboratorium zum anderen. Die Verfahrensweisen und -vorschriften sollen den angebotenen Leistungsumfang widerspiegeln. Sicherheitsvorkehrungen, vor allem die Notwendigkeit biologischer Sicherheitswerkbänke, sollen vom Begutachter sorgfältig beurteilt werden.

Siehe auch Checklisten für Medizinische Laboratorien
 Checkliste Mikrobiologie und Hygiene – Allgemeine Anforderungen

		U	O	Bemerkungen
4.1.1	<input type="checkbox"/> <i>Direkte mikroskopische Untersuchung von Proben?</i> <input type="checkbox"/> <i>Isolierung von Pilzen durch Anzucht, die Identifizierung wird nicht selbst durchgeführt?</i>			(geändert)
4.1.2	<i>Zusätzlich Identifizierung bestimmter Pilzgruppen:</i> <input type="checkbox"/> <i>Sprossspitze bzw. hefeartig wachsende Pilze?</i> <input type="checkbox"/> <i>mit Empfindlichkeitstestung gegenüber systemisch einsetzbaren Chemotherapeutika?</i> <input type="checkbox"/> <i>Hyphomyzeten (d.h. vorzugsweise hyphenartig wachsende Erreger von Organ- bzw. Systemmykosen)?</i> <input type="checkbox"/> <i>mit Empfindlichkeitstestung gegenüber systemisch einsetzbaren Chemotherapeutika?</i> <input type="checkbox"/> <i>Dermatophyten?</i> <input type="checkbox"/> <i>Umweltisolate?</i>			(geändert)
4.1.3	<i>Werden serologische Nachweisverfahren eingesetzt</i> <input type="checkbox"/> <i>zur Identifizierung von Pilzen (z.B. mit spezies-spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern)?</i> <input type="checkbox"/> <i>zum Nachweis von Pneumocystis jiroveci (carinii) (DIFT)?</i> <input type="checkbox"/> <i>zum Nachweis von Pilzantigenen in Patientenproben bei V.a. invasive Mykose?</i> <input type="checkbox"/> <i>zum Nachweis von Pilzantikörpern?¹</i>			(neu)
4.1.4	<i>Werden in der Diagnostik invasiver Mykosen Nachweisverfahren für pilzspezifische Produkte durchgeführt (z.B. D-Arabinitol, (1,3)-beta-D-Glucan)</i>			(neu)

¹ Wenn "JA", siehe ggf. auch *Checkliste Mikrobiologie und Hygiene – Infektionsserologie*.

		U	O	Bemerkungen
4.1.5	Werden im mykologischen Laboratorium physikochemische Untersuchungsverfahren (z.B. Gaschromatographie, FT-IR-Spektroskopie, Massenspektroskopie) eingesetzt? ²			(neu)
4.1.6	Werden im mykologischen Laboratorium molekulargenetische Techniken und Untersuchungsverfahren eingesetzt (z.B. Gensondenhybridisierung, Signatursequenzermittlung, Nukleinsäureamplifikationsverfahren)? ³			(geändert)

5.2	Räumlichkeiten			
------------	-----------------------	--	--	--

		U	O	Bemerkungen
5.2.1	Werden bei stark sporulierenden Pilzen⁴ geeignete Sicherheitsvorkehrungen getroffen, damit z.B. ein Plattennährboden nicht versehentlich geöffnet werden kann bzw. die Freisetzung von Sporen tunlichst vermieden wird (z.B. Sicherung der Plattendeckel mit Klebeband oder andere geeignete Maßnahmen)?			(geändert)
5.2.2	Ist eine biologische Sicherheitswerkbank für den Umgang mit Pilzen (insbesondere bewachsene Kulturen) vorhanden, die als hochgradig infektiös bei Inhalation von entsprechenden Pilzelementen gelten?			(geändert)
5.2.3	<i>Ist das Personal im Erkennen von den in Deutschland selten isolierten hochpathogenen Pilzen⁴ geschult?</i>			(neu)
5.2.4	Erfolgen beim Verdacht auf Vorliegen hochpathogener Pilzkulturen⁴ mit myzelialem Wachstum bzw. stark sporulierender Pilze entsprechende Arbeiten ausschließlich in der biologischen Sicherheitswerkbank?			(geändert)
5.2.5	Wird die Effektivität der Reinigung und Desinfektion von Arbeitsflächen (u.a. des Arbeitsraums der Sicherheitswerkbank) durch entsprechende Maßnahmen regelmäßig überprüft (z.B. Abklatsch-, Luftkeimuntersuchungen)?			(neu)

² Wenn "JA", siehe ggf. auch *Checkliste für Medizinische Laboratorien – Untersuchungsverfahren und Hilfsmittel*.

³ Wenn "JA", siehe auch *Checkliste Mikrobiologie und Hygiene – Molekularbiologie in der Infektionsdiagnostik*.

⁴ z.B. *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides spp.*, *Cladophialophora spp.*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii*

5.3	Laboratoriumsausrüstungen			
------------	----------------------------------	--	--	--

		U	O	Bemerkungen
5.3.1	Sind geeignete Referenzpilzkulturen entsprechend dem diagnostischen Leistungsumfang vorhanden?			(geändert)
5.3.2	Werden Referenzkontrollorganismen zur Kontrolle von Medien, Farbstoffen, Reagenzien und Empfindlichkeitstestmethoden je nach Erfordernis eingesetzt?			(neu)
5.3.3	Stehen Referenz- und Informationsmaterial, wie z.B. Dauerpräparate, Schautafeln oder Atlanten, am Arbeitsplatz zur Verfügung?			

5.5	Untersuchungsverfahren			
------------	-------------------------------	--	--	--

Die folgenden Fragen dienen der Abklärung, ob ausreichend unterschiedliche Nährmedien und Wachstumsbedingungen angewandt werden, um die potentiellen Mykoseerreger sensitiv, zeitnah und möglichst unbeeinträchtigt durch Kontaminationen zu isolieren.

		U	O	Bemerkungen
5.5.1	Werden - falls erforderlich - zur schnellen Diagnostik einer Mykose von entsprechendem Untersuchungsgut zeitnah mikroskopische Präparate angefertigt (z.B. Aufbereitung unter Verwendung von KOH oder Tusche, Färbung nach Grocott oder mit Stilbenfarbstoffen [z.B. Blankophor [®]]) und positive Ergebnisse unmittelbar mitgeteilt?			(geändert)
5.5.2	Wird pro Kulturmedium (Platte, Röhrchen) nur ein Untersuchungsmaterial angeimpft, um Kreuzkontaminationen sicher zu vermeiden?			(neu)
5.5.3	Werden geeignete Selektiv- bzw. Indikator-nährmedien für die Anzucht und Isolierung von Hefen bzw. hefeartigen Pilzen und/oder vorzugsweise hyphenartig wachsenden Erregern von Organ- bzw. Systemmykosen, Dermatophyten und Umweltisolaten verwendet?			(geändert)
5.5.4	Werden ggf. Medien mit antimikrobiellen Zusätzen eingesetzt, um das Wachstum von Kontaminanten zu unterdrücken? ⁵			

⁵ Antimikrobielle Zusätze können das Wachstum bestimmter Hefepilze und die Hefeform von dimorphen Pilzen hemmen. Deshalb sollten Medien mit und ohne antimikrobielle/n Zusätze/n verfügbar sein und verwendet werden, wenn dies erforderlich ist.

		U	O	Bemerkungen
5.5.5	<p>Sind die Inkubationstemperaturen und -zeiten für die Anzucht und Isolierung der unten aufgeführten Pilzgruppen definiert, d.h. im Sinne der Anforderung ausreichend und sinnvoll, und werden diese Vorgaben (u.a. Maßnahmen gegen die Austrocknung der Nährmedien) durchgängig eingehalten:</p> <p><input type="checkbox"/> bei Hefen bzw. hefeartig wachsenden Pilzen?</p> <p><input type="checkbox"/> vorzugsweise hyphenartig wachsenden Erregern von Organ- bzw. Systemmykosen?</p> <p><input type="checkbox"/> Dermatophyten?</p> <p><input type="checkbox"/> Umweltisolaten?</p>			(geändert)
5.5.6	<p>Wird bei Inkubation von Kulturen bei Raumtemperatur die tatsächliche Umgebungstemperatur (22 - 26 °C) täglich kontrolliert (z.B. Minimum-Maximum-Thermometer), um festzustellen, ob die erforderlichen Wachstumsbedingungen eingehalten werden?</p>			(geändert)
5.5.7	<p>Sind die verwendeten Verfahren zur Identifizierung von</p> <p><input type="checkbox"/> Hefen bzw. hefeartig wachsenden Pilzen</p> <p><input type="checkbox"/> vorzugsweise hyphenartig wachsenden Erregern von Organmykosen bzw. Systemmykosen</p> <p><input type="checkbox"/> Dermatophyten</p> <p><input type="checkbox"/> Umweltisolaten</p> <p>für die Erfordernisse des Laboratoriums angemessen, ausreichend in entsprechenden Arbeitsanweisungen dargestellt, und werden diese auch eingehalten?⁶</p>			(geändert)

⁶ Hierbei ist eine individuelle Beurteilung notwendig. Laboratorien, die einen vollen Identifizierungsumfang anbieten, müssen zu diesem Zweck über genügend Verfahren verfügen. Kleinere Laboratorien mit eingeschränktem Leistungsumfang sollten eine Vereinbarung mit einem spezialisierten Laboratorium bezüglich der Übernahme vollständiger Identifizierungen von mykologischen Proben haben.

		U	O	Bemerkungen
5.5.8	<p>Beinhalten die Identifizierungsverfahren folgende Untersuchungen</p> <p>- bei Hefen bzw. hefeartig wachsenden Pilzen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Keimschlauch(Germ Tube)-Test und/oder Latexagglutinationstest zur Schnelldifferenzierung von <i>Candida albicans</i> nach Anzucht aus relevanten Materialien (z.B. Blutkulturen)? <input type="checkbox"/> mikromorphologische Untersuchung auf Bildung von Chlamydosporen und/oder Pseudomyzel (z.B. Maismehl- oder Reisagar)? <input type="checkbox"/> biochemische Teste (z.B. Assimilation und/oder Fermentation von Kohlenhydraten, Assimilation von Stickstoffverbindungen, Urease)? <p>- bei myzelbildenden Pilzen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> makroskopische Untersuchungen (Kulturmorphologie, ggf. auf verschiedenen Nährmedien) und Untersuchung zum Wachstumsverhalten (z.B. Temperaturtoleranz, Verhalten gegenüber Hemmsubstanzen [z.B. Cycloheximid]) ,? <input type="checkbox"/> mikromorphologische Untersuchungen zur Beurteilung der Konidiogenese (ggf. auch mit Objektträgerkultur [Agarblockkultur])? <input type="checkbox"/> Werden bei der Herstellung von Zupf- oder Zellophanklebestreifen("Tesafilm[®]")-Präparaten Pilzelemente immer in etwas Flüssigkeit (wie z.B. Lactophenolblau) eingebracht? <input type="checkbox"/> ggf. biochemisches Leistungsvermögen (z.B. Vitaminbedarf)? 			(geändert)

		U	O	Bemerkungen
5.5.9	<p>Werden zur Identifizierung noch andere Verfahren herangezogen (s. 4.1.3 – 4.1.5):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Serologische Techniken (z.B. Bindung von markierten, speziesspezifischen Antikörpern)? <input type="checkbox"/> Physikochemische Untersuchungsverfahren (z.B. Fettsäureanalyse mittel GC, FT-IR-Spektroskopie) <input type="checkbox"/> Gensondenhybridisierung? <input type="checkbox"/> Signatursequenzermittlung? <p>Wenn "JA": Wurden diese Verfahren hinreichend für diesen Zweck validiert?</p>			(neu)
5.5.10	<p>Wird die Resistenztestung von aetiologisch relevanten Pilzisolaten gegenüber systemisch wirksamen Antimykotika mit validierten Untersuchungsverfahren⁷ durchgeführt?</p>			(neu)

5.6	Sicherung der Qualität von Untersuchungsverfahren			
------------	--	--	--	--

5.6.1	Nährmedien			
--------------	-------------------	--	--	--

Zur guten Laborpraxis gehört die Kontrolle aller verwendeten Nährmedien (vgl. auch Checkliste Mikrobiologie und Hygiene – Bakteriologie, Abschnitt 5.6.1).

		U	O	Bemerkungen
5.6.1.1	<p>Wird eine geeignete Stichprobe aller vom Laboratorium selbst hergestellten Medien kontrolliert auf:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Sterilität (nach dem Zusatz von Additiven nach der Sterilisierung) <input type="checkbox"/> Fähigkeit der Wachstumsförderung anhand von Referenzkontrollkulturen und/oder paralleler Prüfung im Vergleich mit früheren Chargen <input type="checkbox"/> Ggf. biochemische Reaktivität <input type="checkbox"/> Ggf. Selektivität? 			

⁷ D.h. vergleichbar mit den Ergebnissen, die in den entsprechenden Verfahren gemäß DIN, EUCAST, NCCLS erzielt werden.

		U	O	Bemerkungen
5.6.1.2	Sind alle Medien nach Inaugenscheinnahme in einem zufrieden stellenden Zustand (mit Herstellungs- und Verfalldatum, richtige Farbe, ausreichend hydriert, nicht kontaminiert, in Röhrchen befindliche Medien von den Seiten her nicht eingetrocknet oder lose)?			

		U	O	Bemerkungen
5.6.2	Färbungs-, Differenzierungsverfahren, Empfindlichkeitstestung			
5.6.2.1	Werden alle Färbungen anhand von Positiv- und Negativkontrollen regelmäßig kontrolliert?			(geändert)
5.6.2.2	Wird die Nitrat-Assimilation jedes Mal mit einer Pepton-Kontrolle überprüft?			
5.6.2.3	Werden bei der Empfindlichkeitstestung geeignete Kontrollstämme mitgeführt (z.B. sensible und resistente Isolate), und werden die dafür publizierten Grenzbereiche eingehalten?			(geändert)
5.6.2.4	<i>Gibt eine statistische Auswertung der isolierten Pilzarten bezogen auf die untersuchten Proben, und wird diese zur Schwachstellenanalyse benutzt?</i>			(neu)

