

10.6 Checkliste Mikrobiologie und Hygiene – Virologie

*H. F. Rabenau, B. Fleckenstein, O. Habermehl, G. Jahn, W. Jilg, K. Korn,
D. Krüger, R. Laufs, G. Maass, T. Mertens, D. Neumann-Haefelin, C. Schoerner,
H. Zeichhardt*

Anwendungsbereich	3
Laboratoriumsausrüstungen	3
Präanalytische Maßnahmen	3
Untersuchungsverfahren	4
Elektronenmikroskopie (EM)	4
Virusisolierung/Virustypisierung	4
Neutralisationstest	6
Sicherstellung der Qualität der Untersuchungsverfahren	6
Viren und Zellkulturen	6
Nährmedien	7
Antikörper/Antiseren	8

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

Die virologischen Untersuchungen erfordern den Umgang mit Zellkulturen und ggf. embryonierten Hühnereiern und Versuchstieren. Die Probenvorbereitung und -aufarbeitung ist nach allgemein akzeptierten Verfahren vorzunehmen. Es ist Sorge zu tragen, dass eventuell in der Probe vorhandene Mikroorganismen (z. B. Bakterien im Stuhl) den Virusnachweis nicht beeinflussen. Beim Einsatz von Antibiotika ist zu kontrollieren, dass die Wirtszellen und Organismen in ihrer Funktion und Morphologie für die Virusanzucht unbeeinflusst bleiben. Bei der Virustypisierung mit spezifischen Antikörpern sind Kontrolluntersuchungen durchzuführen und, wenn möglich, internationale Typisierungspanels zu benutzen.

Für den Nachweis von Virusgenom ist zu beachten, dass keine Genomdegradation in der Untersuchungssprobe auftritt.

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

		U	O	Bemerkungen
4.1.1	Gehören zum Leistungsumfang <input type="checkbox"/> Virusisolierung und Zellkultur <input type="checkbox"/> Elektronenmikroskopische Virusdiagnostik <input type="checkbox"/> Virus-Antigennachweis <input type="checkbox"/> Virus-Nukleinsäurenachweis ¹ <input type="checkbox"/> Virus-Serologie (Antigene oder Antikörper)? ²			

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

		U	O	Bemerkungen
5.3.1	Ist eine biologische Sicherheitswerkbank vorhanden und erfüllt sie die Mindestanforderungen für virologische Arbeiten?			(geändert)

5.4	Präanalytische Maßnahmen			
------------	---------------------------------	--	--	--

		U	O	Bemerkungen
5.4.1	Bestehen geeignete Maßnahmen, die einen erfolgreichen Virusnachweis aus dem Untersuchungsgut erlauben (Gebrauch von Transportmedien, Probenkühlung usw.)?			

¹ Wenn "JA", siehe Checkliste Mikrobiologie und Hygiene – Molekularbiologie in der Infektionsdiagnostik.

² Wenn "JA", siehe auch Checkliste Mikrobiologie und Hygiene – Infektionsserologie.

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

Aktuelle Verfahrensrichtlinien, insbesondere die GfV-Leitlinien zur Diagnostik und Therapie von Virusinfektionen, sind zu berücksichtigen.

		U	O	Bemerkungen
5.5.1	Elektronenmikroskopie (EM)			
5.5.1.1	Werden Viren aus Untersuchungsmaterialien mittels Negativkontrastierung nachgewiesen?			
5.5.1.2	Wird die Qualität der elektronenmikroskopischen Netze kontrolliert?			
5.5.1.3	<i>Werden zur Virusanreicherung physikalische Verfahren angewandt (z.B. Anreicherung in der Airfuge)?</i>			
5.5.1.4	<i>Werden immunelektronenmikroskopische Verfahren zur Virusanreicherung und Typisierung verwendet?</i>			

		U	O	Bemerkungen
5.5.2	Virusergänzung/Virustypisierung			
5.5.2.1	Sind Zelllinien vorhanden, die die Isolierung der wichtigsten humanmedizinisch relevanten kultivierbaren Viren (Adenoviren, Enteroviren, Herpesviren [CMV, HSV, VZV], Influenzavirus A und B, Paramyxoviren [Masernvirus, Mumpsvirus, RSV], Reoviren, Rubellavirus) gestatten?			
5.5.2.2	Werden zur Virusergänzung mindestens zwei verschiedene Zelllinien beimpft (z.B. Affenienzelllinien, diploide humane Fibroblasten, permanente (heteroploide) humane Zelllinien)?			(geändert)
5.5.2.3	Werden positive Kontrollen (Referenzstämme, eigene Patientenisolat) bei jedem Probenansatztag, mindestens jedoch wöchentlich, sowie zur Überprüfung neuer Zelllinien oder Zellchargen, oder bei Schwierigkeiten in der Virusergänzung (niedrige Isolierungsrate) eingesetzt?			(geändert)
5.5.2.4	Werden die inokulierten Zellkulturen mindestens jeden zweiten Arbeitstag auf das Auftreten zytopathischer Effekte untersucht?			
5.5.2.5	<i>Werden Zellkulturblindpassagen (z.B. bei V.a. Vorliegen von Adenoviren) durchgeführt?</i>			(neu)
5.5.2.6	Werden bei allen Isolierungsversuchen negative Kontrollen (unbeimpfte Zellkulturröhrchen) mitgeführt?			

		U	O	Bemerkungen
5.5.2.7	Wird bei Verdacht auf Vorliegen eines hämadsorbierenden Virus (Influenza-, Parainfluenza- oder Mumpsvirus) nach 5 bis 7 Tagen ein Hämadsorptionstest durchgeführt (und bei negativem Ergebnis nach weiteren 5 bis 7 Tagen wiederholt)?			
5.5.2.8	Werden Kulturen (inokulierte Kulturen und negative Kontrollen) mindestens alle 7 Tage mit neuem Medium gefüttert?			(geändert)
5.5.2.9	Werden von Kulturen mit starker Zerstörung des Zellrasens Subpassagen durchgeführt?			
5.5.2.10	<i>Werden unbekannte Virusisolate durch Prüfung auf Chloroformstabilität auf Fehlen bzw. Vorhandensein einer Hülle untersucht?</i>			(nur noch Info-Frage)
5.5.2.11	<i>Erfolgt die Identifizierung der isolierten Viren durch immunologische Verfahren (Immunfluoreszenz, Immunperoxidasefärbung, Enzymimmunoassay), Neutralisationsteste oder molekularbiologische Verfahren (Hybridisierung, PCR, Sequenzierung)?</i> 			
5.5.2.12	<i>Werden Influenza-, Adeno- und Enteroviren zur weiteren Typisierung an Nationale Referenzzentren gesandt?</i>			(neu)
5.5.2.13	Wird zur Subtypisierung von Influenzaviren der Hämagglutinationshemmtest (unter Verwendung spezifischer Antiseren) eingesetzt?			
5.5.2.14	<i>Wird zur Differenzierung von Rhino- und Enteroviren der Säurelabilitätstest verwendet?</i>			
5.5.2.15	Wird zum Schnellaufweis von Viren (z.B. CMV, HSV, VZV, Influenzavirus) in der Zellkultur der „shell vial“-Assay eingesetzt? Werden bei jedem Ansatz entsprechende Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt? <i>Erfolgt eine semiquantitative Auswertung (z.B. bei CMV) und wird dazu eine semiquantitative Positivkontrolle mitgeführt?</i>			(neu) (neu)

		U	O	Bemerkungen
5.5.3	Neutralisationstest³			
5.5.3.1	Werden repräsentative Wildvirusstämme oder Impfstämme verwendet, und ist ihre Herkunft (z. B. ATCC) dokumentiert?			
5.5.3.2	Werden ausreichend sensitive Zellstämme/-linien verwendet, und ist die Herkunft (z. B. ATCC) dokumentiert?			
5.5.3.3	Werden Endpunkttitrationen oder Plaqueteste durchgeführt?			
5.5.3.4	Wird als Voraussetzung zur Durchführung eines Neutralisationstestes eine Virustitration durchgeführt (Endverdünnungsmethode oder Plaquetest)?			
5.5.3.5	Werden Neutralisationsteste nur in den Testviruskonzentrationsgrenzen 1000 TCID ₅₀ /ml +/- 0,5 log bzw. 1000 pfu/ml +/- 30 % validiert?			
5.5.3.6	Wird bei jedem Test eine Rücktitration des Testvirus durchgeführt?			
5.5.3.7	Werden bei Plaquetitrationen mindestens 2, bei Endpunkttitrationen mindestens 4 Parallelansätze getestet?			
5.5.3.8	Werden beim Neutralisationstest mindestens 2 bis 3 Parallelansätze getestet?			(neu)
5.5.3.9	Werden Kontrollen der Virusneutralisation mit bekannten Immunseren mitgeführt?			
5.5.3.10	Werden die Titrationen von Seren und Testvirus unter striktem Wechsel der Pipetten bei jedem Verdünnungsschritt durchgeführt?			
5.5.3.11	Ist die Testauswertung nach anerkannten statistischen Methoden auf der Basis von Literaturangaben (Kärber, Reed und Münch) dokumentiert?			

5.6	Sicherstellung der Qualität der Untersuchungsverfahren			
------------	---	--	--	--

		U	O	Bemerkungen
5.6.1	Viren und Zellkulturen			
5.6.1.1	Sind Referenzkontrollviren entsprechend dem diagnostischen Leistungsumfang vorhanden?			

³ Bei Verwendung von Zellkulturen

		U	O	Bemerkungen
5.6.1.2	Ist der Ursprung von Viren und Zellkulturen dokumentiert?			
5.6.1.3	Werden Viren und Zellkulturen von anerkannten Referenzinstitutionen oder Herstellern bezogen (American Type Culture Collection, nationale oder internationale Referenzzentren, Firmen)?			
5.6.1.4	Werden Viren und Zellkulturen aliquotiert in Unterchargen sachgerecht gelagert (tiefgekühlt, ggf. in flüssigem Stickstoff)?			
5.6.1.5	Werden Zelllinien regelmäßig auf Mykoplasmenkontamination kontrolliert?			
5.6.1.6	Ist definiert bis zu welcher maximalen Passagenzahl Zellen verwendet werden dürfen?			(neu)
5.6.1.7	Ist, falls erforderlich, definiert bis zu welcher maximalen Passagenzahl Viren verwendet werden dürfen (z.B. bei Poliovirus)?			(neu)
5.6.1.8	Werden Protokolle über Zellpassage und Viruspropagierung geführt (z.B. Nachvollziehbarkeit von Medien und Serumchargen, Serumkonzentrationen, Vermehrungsdauer)?			

5.6.2	Nährmedien			
--------------	-------------------	--	--	--

Das Laboratorium ist dafür verantwortlich, dass alle verwendeten Nährmedien – ob gekauft oder selbst hergestellt – steril sind und die Vermehrung von Zellen und Viren ausreichend fördern. Dazu ist es erforderlich, dass das Labor einen Bestand an Referenzkontrollviren und eine ausreichende Anzahl diverser Zellkulturen unterhält und die Medien zum Zeitpunkt der Herstellung oder Benutzung kontrolliert. Eine genaue Dokumentation dieser Kontrollen ist unerlässlich.

		U	O	Bemerkungen
5.6.2.1	Werden Nährmedien und Seren von Herstellern bezogen, die über ein Qualitätsmanagementsystem verfügen?			
5.6.2.2	Werden die Kulturmedien auf Sterilität geprüft?			
5.6.2.3	Werden Sterilität und pH-Wert von Verdünnungsreagenzien kontrolliert?			
5.6.2.4	Werden Tierseren (z.B. Foetales Kälberserum [FKS]) für Zellkulturmedien auf fehlende Zelltoxizität dokumentiert überprüft? Ist eine entsprechende Arbeitsvorschrift vorhanden?			(geändert) (neu)
5.6.2.5	Hat das Laboratorium die erforderlichen Nährmedien für alle virologischen Untersuchungen, die durchgeführt werden, verfügbar?			

		U	O	Bemerkungen
5.6.3	Antikörper/Antiseren			
5.6.3.1	Werden Antikörper bzw. Antiseren von Herstellern oder Laboratorien bezogen, die über ein Qualitätsmanagementsystem verfügen?			
5.6.3.2	Werden selbst gewonnene Antikörper bzw. Antiseren mit anerkannten Referenzpräparaten – soweit vorhanden – verglichen?			(neu)
5.6.3.1	Werden bei neu gekauften oder selbst gewonnenen Antikörpern bzw. Antiseren Titrationen zur Ermittlung der geeigneten Antikörperverdünnungen durchgeführt?			(geändert)
5.6.3.2	Werden für die interne Qualitätskontrolle anerkannte Referenzpräparate – soweit vorhanden – verwendet (z.B. für quantitative Antikörperbestimmungen Referenzstandards von der WHO oder vom Paul-Ehrlich-Institut)?			
5.6.3.3	Werden laboreigene Referenzpräparate zur internen Qualitätskontrolle mit anerkannten Referenzpräparaten abgeglichen?			