

Präanalytik: Einsendungen Mikrobiologie

Analysenspektrum der Mikrobiologie

Das gesamte Analysenspektrum der Mikrobiologie bei Labor Berlin ist im Leistungsverzeichnis hinterlegt.

Notfälle

Außerhalb der regulären Dienstzeit (20.00 - 07.30 Uhr) erfolgt nur eine Notfalldiagnostik

Telefonischer Bereitschaftsdienst

In dringenden Fällen ist der diensthabende Mikrobiologe über das Diensthandy (0151 4223 0449) oder über das jeweilige Präsenzlabor erreichbar.

Befundübermittlung

Bei Meningitis und anderen lebensbedrohlichen Infektionen sowie multiresistenten und meldepflichtigen Erregern erfolgt eine telefonische Information.

Validierte Teil- und Endbefunde können über das Krankenhausinformationssystem abgerufen und ausgedruckt werden oder werden in geeigneter (vereinbarter) Form übermittelt.

Mikrobiologische Notfalldiagnostik

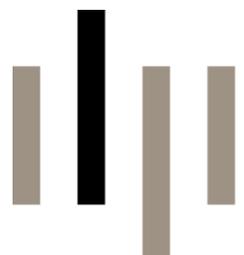
Außerhalb der regulären Dienstzeit (20.00 - 07.30 Uhr) erfolgt nur eine Notfalldiagnostik

- bei lebensbedrohlichen Infektionen, bei denen sich aus der mikrobiologischen Diagnostik eine therapeutische Konsequenz ergibt
- sowie bei den in der Tabelle auf der folgenden Seite angeführten Verdachtsdiagnosen.

Die Anzüchtung ausgewählter Infektionserreger bei Verdacht auf meldepflichtige übertragbare Erkrankungen nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) z.B. Pest oder Milzbrand wird in unserem Labor nicht durchgeführt. Wir geben Auskunft zur Präanalytik, zum Probenversand und zum diagnostischen bzw. therapeutischen Vorgehen und leiten die Proben an die zuständigen Fach- bzw. Referenzlaboratorien weiter.

Im Rahmen einer Notfalldiagnostik bitten wir um:

- telefonische Absprache mit diensthabender Ärztin/diensthabendem Arzt,
- Sicherstellung eines unverzüglichen Probentransportes, Deutliche Kennzeichnung des Einsendescheins, des Materials bzw. der Verpackung mit „Notfall“ oder „cito“
- Angabe einer Rückrufnummer und Erreichbarkeit des/der behandelnden Arztes/Ärztin zur Durchsage der Ergebnisse.



Anmerkungen:

Bei klinischer Indikation, z.B. lebensbedrohlichen Infektionen, muss eine Therapie sofort nach Abnahme des geeigneten Untersuchungsmaterials begonnen werden. Infektionsserologische Untersuchungen insbesondere Antikörper-Nachweise gehören **nicht** zur Notfalldiagnostik.

Telefonischer Bereitschaftsdienst

In dringenden Fällen ist der diensthabende Mikrobiologe über das Diensthandy (0151 4223 0449) oder über das jeweilige Präsenzlabor erreichbar.

Materialentnahme zur mikrobiologischen Diagnostik**Allgemeine Hinweise:**

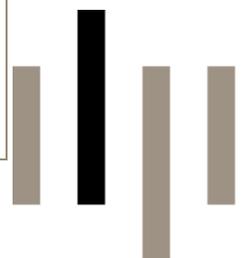
- Die mikrobiologische Diagnostik beginnt mit einer korrekten Entnahme von geeignetem Untersuchungsmaterial möglichst vor Beginn einer antimikrobiellen Therapie.
- Hinweise zur Materialentnahme bei klinischen Verdachtsdiagnosen finden Sie im Leistungsverzeichnis.
- Das Untersuchungsmaterial sollte entweder in sterilen Gefäßen oder in Transportmedien versandt werden. Standardtransportmedium für die bakteriologische Diagnostik sind Amies-Medium fest (Abstrichtupfer in Gel) oder flüssig (eSwab).
- Die Anzuchtbarkeit relevanter Erreger ist abhängig vom schnellstmöglichen Transport in das mikrobiologische Labor, der innerhalb von 2-4 Stunden erfolgen sollte. Ist dies nicht möglich, müssen Blutkulturen bei Raumtemperatur, Urintauchkulturen im Brutschrank, alle anderen Materialien im Kühlschrank zwischengelagert werden.
- Alle Materialien für Antigen- oder Antikörpernachweise (z.B. auch Amnionflüssigkeit oder Kammerwasser) in sterilen Gefäßen einsenden.

Übersicht über Untersuchungsmaterialien, deren Lagerung und Transport

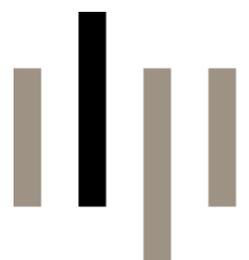
Material	Transport	Zwischenlagerung
Abstriche auf Erreger und Resistenz Abstriche-Screening multiresistenter Erreger (MRE: MRSA, VRE, MRGN, ESBL)	Amies-Medium fest (Abstrichtupfer in Gel) oder flüssig (eSwab)	4-8 oC



Biopsie- und Op-Material	Geringe Mengen in steriler physiol. NaCl-Lösung verschicken, größere Mengen ohne Transport-medium für H.pylori-NW spezielles Transportmedium anfordern	4-8 oC 4-8 oC max. 2 (-3) h
Blutkulturen	Blutkulturflaschen (nicht belüften!)	nur Zimmertemperatur !
Endoskopiematerial	in sterilem Röhrchen (eSwab)	4-8 oC
Fremdkörper (z.B. intravasale Katheter)	in sterilem Röhrchen	4-8 oC
Punktate (größere Mengen, z.B. Liquor, Eiter) aus sterilen Kompartimenten	Mind. 1 ml in sterilem Röhrchen, ggf. in Blutkulturflasche bei Verdacht auf strenge Anaerobier, ggf. in Spritze (luftfrei entnommen)	Blutkulturflasche bei Zimmertemperatur ! Punktat in Spritze bei 4-8 °C
Sekrete (z.B. Tracheobronchialsekret) BAL	in sterilem Röhrchen	4-8 oC
Sputum	im Sputumgefäß	4-8 oC
Stuhl	im Stuhlröhrchen	4-8 oC
Urin	Nativurin ggf. Tauchkultur	+ 36 oC, wenn Brutschrank vorhanden 4-8 oC
Blut zur Mykobakteriendiagnostik	Blutkulturflaschen zur Mykobakterienanzucht (Myco-F-lytic-Flaschen)	Zimmertemperatur



(z.B. bei V.a. Miliar-Tuberkulose)	Citrat-Blut zur molekularbiologischen Diagnostik	4-8 oC
------------------------------------	--	--------



Atemwegsinfektionen

Allgemeine Hinweise zur Probengewinnung für Atemwegsinfektionen

Sputum

- Das Material muss aus den tiefen Atemwegen abgehustet werden, die Untersuchung von Speichel oder Speichelbeimengungen ergibt keine verwertbaren Ergebnisse.
- Am günstigsten ist die Untersuchung von Morgensputum.
- Vor der Expektoration den Mund mehrmals mit frischem Leitungswasser ausspülen.
- Sputum in ein steriles Sputum-Gefäß abhusten.
- Bis zum Transport im Kühlschrank aufbewahren.

Tracheobronchialsekret, Spülflüssigkeit der bronchoalveolären Lavage

- Tracheobronchialsekret bzw. Spülflüssigkeit in ein steriles Plastik-Röhrchen geben.
- Zur Spülung sterile Ringer-Laktat-Lösung verwenden, da physiologische Kochsalzlösung eine bakterizide Wirkung haben kann.

Hinweis

Eine Kontamination des bronchoskopisch gewonnenen Materials durch Rachenflora (Plattenepithelzellen nachweisbar) ist nicht auszuschließen und muss bei der Beurteilung der Befunde berücksichtigt werden.

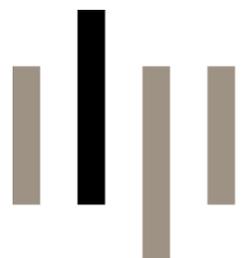
Angaben zur Materialentnahme für den Nachweis von Mykobakterien und *Pneumocystis jirovecii* können dem entsprechenden Abschnitt entnommen werden.

Pleurapunktat

- Punktion unter aseptischen Bedingungen mit einer sterilen Spritze vornehmen, Punktat in ein steriles Plastikröhrchen geben.
- Bei Verdacht auf Anaerobier das Punktat in eSwab geben oder in einer luftfreien, verschlossenen Spritze gut verschlossen transportieren.

HNO- und Augen-Infektionen

- Material mit einem sterilen Tupfer unter Sicht entnehmen, dabei Berührung unauffälliger Haut- bzw. Schleimhautbereiche nach Möglichkeit vermeiden.
- Anschließend Tupfer in Amies-Medium (z. B. Bakteriette) einbringen.
- Bis zur Weiterleitung in das bakteriologische Labor im Kühlschrank lagern.



Harnwegsinfektionen

Allgemeine Hinweise zur Probengewinnung für Harnwegsinfektionen

Urin

- Patienten über die saubere Entnahme von Mittelstrahlurin belehren:
 - Entnahme von Mittelstrahlurin beim Mann:
Vorhaut vollständig zurückziehen, Glans penis mit zwei in sauberes Wasser getauchten Tupfern reinigen, Harnröhrenöffnung mit einem dritten Tupfer trocknen.
 - Entnahme von Mittelstrahlurin bei der Frau:
Labien mit einer Hand spreizen, mit der anderen Hand Vulva mit zwei in sauberes Wasser getauchten Tupfern von vorn nach hinten reinigen, Harnröhrenöffnung mit einem dritten Tupfer trocknen, anschließend diesen Tupfer in die Vagina einlegen. Aus der Mitte des Harnstrahls ca. 5 ml in einem sterilen weitlumigen Gefäß auffangen, Tupfer aus der Vagina entfernen.

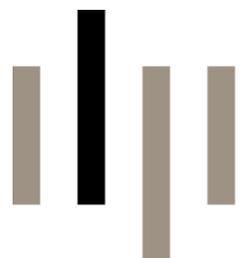
Nativ-Urin in Monovette überführen und umgehend in das Labor versenden ggf. bei 4-8°C zwischenlagern. Tauchkultur nur verwenden, wenn der Transport >2 Stunden dauert.
Cave: die Tauchkultur darf keinen Resturin enthalten!

Hinweise

In der Regel sollte ein Mittelstrahlurin gewonnen werden. Wenn keine kontaminationsfreie Entnahme möglich ist, sollte der Urin in Einzelfällen durch Katheter oder Blasenpunktion nach sorgfältiger Reinigung der Harnröhrenöffnung bzw. Desinfektion der Punktionsstelle entnommen werden.

Eine Blasenpunktion ist bei wiederholt unklaren quantitativen und/oder qualitativen bakteriologischen Untersuchungsergebnissen, z.B. Mischkulturen indiziert.

Proben aus Urinbeuteln bei Trägern von Dauerkathetern sind für die bakteriologische Untersuchung ungeeignet.



Gastrointestinale Infektionen

Allgemeine Hinweise zur Probengewinnung für Gastrointestinale Infektionen

Stuhl/Rektalabstrich

- für den Nachweis von bakteriellen Enteritiserregern
- Festen, geformten Stuhl nicht für bakteriologische Diagnostik einsenden!
- Ca. Kirschgroße Probe von breiigem Stuhl in ein Stuhl-Versandröhrchen geben, bei Schleimbeimengungen im Stuhl Schleimprobe entnehmen.
- Bei dünnflüssigem Stuhl ca. 1,0 ml einsenden.
- Rektalabstrich nur durchführen, wenn kein Stuhl gewonnen werden kann
- Rascher Transport in das mikrobiologische Labor, Aufbewahrung bis zum Transport im Kühlschrank

Hinweise

Ein rascher Transport ist notwendig, da empfindliche Erreger (z.B. Shigella spp.) schnell absterben.

Stuhlproben bei Verdacht auf pathogene Darmkeime an 3 aufeinander folgenden Tagen einsenden, da ein Erregernachweis in einer einzelnen Probe nicht immer gelingt.

Bei Verdacht auf Typhus oder Paratyphus parallel Blutkulturen entnehmen. Bei Verdacht auf nosokomiale Diarrhoe (Clostridium difficile-assoziierte Diarrhoe) nicht auf andere darmpathogene Erreger untersuchen und mindestens 1 ml Stuhl einschicken (außer Ausbrüche durch Salmonellen o.ä.).

Bei Verdacht auf Cholera ist die telefonische Kontaktaufnahme mit dem Fachbereich für Mikrobiologie notwendig!

Aszites

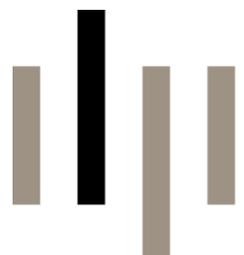
Material unter aseptischen Bedingungen mit einer sterilen Spritze entnehmen, in ein steriles Plastik-Röhrchen geben, schnellst möglicher Transport in das bakteriologische Labor.

Bei Verdacht auf Anaerobier, das Punktat in flüssiges Transportmedium (z.B: eSwab) geben oder in einer luftfreien verschlossenen Spritze transportieren.

Bei spontaner bakterieller Peritonitis einen Teil der Probe in eine aerobe Blutkulturflasche (nicht belüften) geben. Falls nötig, bei Zimmertemperatur zwischenlagern!

Duodenalsaft

- Bei Verdacht auf Giardiasis



Infektionen des weiblichen & männlichen Genitaltraktes

Allgemeine Hinweise zur Probengewinnung für Infektionen des weiblichen & männlichen Genitaltraktes

Vaginalabstrich

Die Untersuchung eines Vaginalabstrichs ist indiziert bei Verdacht auf:

- bakterielle Vaginose
- vulvovaginale Candidose
- zum Nachweis der Besiedlung mit Gruppe B-Streptokokken bei definierten Risikopatientinnen im letzten Trimenon der Schwangerschaft:
 - zuerst Vaginalabstrich aus dem hinteren Scheidengewölbe entnehmen, dann mit gleichem Tupfer Rektalabstrich durchführen, in flüssiges Medium (z. B. eSwab) geben
 - Zusätzlich einen luftgetrockneten Objektträgerausstrich (in entsprechendem Plastikbehälter) einsenden.

Untersuchungsmaterial bei Endomyometritis und Amnioninfektionssyndrom

Um eine Kontamination mit Vaginal- oder Zervikalflorea zu vermeiden, sollte das Material gewonnen werden:

- mit Doppellumen geschütztem Abstrichsystem,
- durch transabdominale Amniozentese oder
- intrapartal nach einem Blasensprung über einen doppellumigen Katheter aus der Amnionhöhle.

Um aerobe und anaerobe Bakterien zu erfassen, ist das Material in Amies-Medium (z. B. Bakteriette) einzusenden. Bei Fieber zusätzlich Blutkulturen anlegen.

Untersuchungsmaterial bei Adnexitis und Salpingitis

Die optimale Entnahme erfolgt laparoskopisch. Dieses Material wird auf Aerobier, Anaerobier, Mykoplasmen, Chlamydia trachomatis und Neisseria gonorrhoeae untersucht.

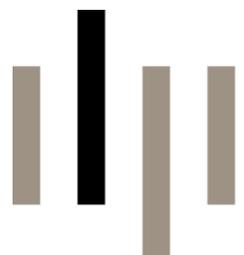
Angaben zur Materialentnahme für den Nachweis von Chlamydien, Mykoplasmen und Neisseria gonorrhoeae siehe Leistungsverzeichnis und Molekulardiagnostik.

Zervikalabstriche

Sie sind nur bei Zervizitis indiziert, die durch Chlamydia trachomatis und Neisseria gonorrhoeae hervorgerufen wird.

Bei Nachweis von Chlamydia trachomatis und Neisseria gonorrhoeae aus dem Zervikalkanal ist die ätiologische Relevanz auch bei Adnexitis/Salpingitis gesichert.

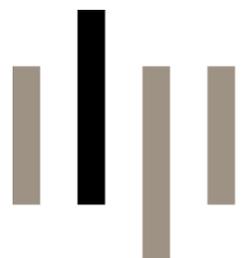
Angaben zur Materialentnahme für den Nachweis von Chlamydien und Neisseria gonorrhoeae siehe Leistungsverzeichnis und Kap. Molekulardiagnostik.



Ejakulat

- Material in einem sterilen Plastik-Röhrchen versenden.
- Aufbewahrung bis zum Transport im Kühlschrank.

Angaben zur Materialentnahme für den Nachweis von Chlamydien, Mykoplasmen und *Neisseria gonorrhoeae* siehe Leistungsverzeichnis oder Molekulardiagnostik.



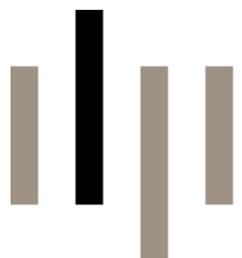
Meningitis

Allgemeine Hinweise zur Probengewinnung für Meningitis

Liquor zur mikroskopischen und kulturellen Untersuchung auf Bakterien und Pilze.

- Lumbalpunktion nach gründlicher Hautdesinfektion (siehe bei „Blutkulturen“).
- Mindestens 1 ml, möglichst 3 ml in einem sterilen Plastik-Röhrchen auffangen.
- Bei Verdacht auf eine bakterielle Meningitis Liquor nach telefonischer Information so rasch wie möglich in das Labor senden (empfindliche Erreger, z.B. Meningokokken, sterben rasch ab), bis dahin bei Zimmertemperatur aufbewahren.
- Gleichzeitig Beimpfung einer aeroben Blutkulturflasche und Blutkulturen entnehmen, diese bis zum Transport in das Labor ebenfalls bei Zimmertemperatur zwischenlagern.

Angaben zur Materialentnahme für den Nachweis von Mykobakterien und für molekularbiologische Untersuchungen siehe Mykobakteriendiagnostik und Molekulardiagnostik.



Sepsis und andere Indikationen für Blutkulturen

Allgemeine Hinweise zur Probengewinnung für Blutkulturen

Indikationen: Endokarditis, FUO, SIRS, Meningitis, schwere Pneumonie, Osteomyelitis, Arthritis, Pyelonephritis u.a.

Blutkulturen

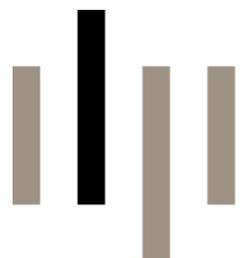
zum Nachweis von Bakterien (außer Mykobakterien) und Candida spp. gründliche Desinfektion der Haut durch Einreiben des Desinfektionsmittels im Bereich der Entnahmestelle mit 2 sterilen Tupfern, je 30 Sekunden Einwirkungszeit.

- Desinfektion der Durchstichmembran der Flaschen.
- Entnahme von ca. 10 ml Blut (bei Erwachsenen), bei Kindern 2-3 ml möglichst vor Beginn einer antimikrobiellen Therapie.
- Flaschen nicht belüften!
- Flaschen und Begleitschein mit Patientenetikett versehen, dabei Barcodestreifen nicht ablösen und nicht bekleben
- Auf dem Begleitschein Datum, Uhrzeit! und Entnahmeort (z.B. Katheter, periphere Vene) vermerken.
- Flaschen bis zum Transport in das bakteriologische Labor bei Zimmertemperatur zwischenlagern.

Hinweise

Es sollten 2 (- 3) Flaschenpaare innerhalb von 24 Stunden pro Infektionsepisode aus unterschiedlichen peripheren Venen nach Möglichkeit vor dem Beginn einer antimikrobiellen Therapie beimpft werden.

Bei Verdacht auf eine Kathetersepsis: parallel Blutkultur aus der peripheren Vene und dem intravasalen Katheter entnehmen.



Wund-, Weichteil- und Gelenkinfektionen

Allgemeine Hinweise zur Probengewinnung für Wund-, Weichteil- und Gelenkinfektionen

Abstriche

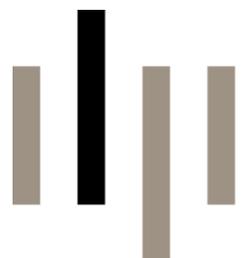
- Bei flächenhaften Wunden mit einem sterilen Tupfer Material am Wundrand entnehmen.
- Tupfer in flüssiges Medium (z. B. eSwab) geben.
- Bei Verdacht auf Gasbrand und Fasciitis/Myositis Material aus tieferen Wundbereichen oder Gewebeprobe entnehmen und das mikrobiologische Labor telefonisch informieren!
- Bei Verdacht auf eine Anaerobier-Infektion Sauerstoffkontakt bei der Probenentnahme vermeiden, Transport in flüssiges Medium (z. B. eSwab).
- Gewebeproben in einem sterilen Plastik-Röhrchen transportieren.

Punktate

- Material unter aseptischen Bedingungen mit einer sterilen Spritze entnehmen, gut verschlossen in ein steriles Plastik-Röhrchen geben, schnellst möglicher Transport in das Labor.
- Bei Verdacht auf Anaerobier ,das Punktat in einer luftfreien, verschlossenen Spritze transportieren. (Kanüle entfernen!)
- Wenn der Transport nicht sofort möglich ist oder zur Verbesserung der Sensitivität (insbes. bei Gelenkpunktaten), einen Teil der Probe in Blutkulturflaschen (nicht belüften) inokulieren.

Biopsiematerial

- Kleine Proben in kleinem Volumen steriler physiologische Kochsalzlösung bzw. flüssiges Medium (z. B. eSwab) aufnehmen.
- Größere Proben trocken in einem sterilen Plastik-Röhrchen transportieren.
- Rascher Transport in das Labor.

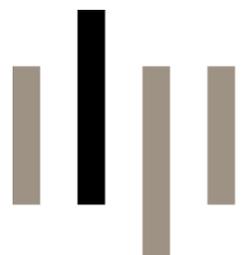


Informationen zur Untersuchungsdauer für die bakteriologische Diagnostik

Die Diagnostik wird im Laborbereich Bakteriologie täglich, einschließlich der Wochenenden und Feiertage, durchgeführt.

Untersuchungsdauer (Laufzeiten) vom Eingang der Proben in den Laborbereichen bis zur Befunderstellung:

- Mikroskopische Präparate (z. B. Gramfärbung): bei telefonischer Voranmeldung und dringlichen Indikationen - ca. 30 Minuten
- Wichtige mikroskopische Befunde (z. B. Gramfärbung) sind über das Klinikinformationssystem am Stationsarbeitsplatz einsehbar.
- Das Ergebnis der Kultur liegt bei Nachweis schnellwachsender aerober Erreger frühestens nach Übernachtbebrütung und bei Mischkulturen meistens nach 24-48 Stunden Bebrütung vor.
- Bei Nachweis relevanter Erreger schließen sich eine Identifizierung auf Speziesebene und Resistenztestung an. Die Laufzeit beträgt im Diagnostikautomaten 8 – 12 Stunden und mit manuellen Methoden ca. weitere 24 Stunden.
- Bei Nachweis von anaeroben und anderen langsam wachsenden Erregern dauert die Kultur 2 bis 5 Tage, bis zum Ergebnis der Identifizierung und Resistenztestung nochmals 1 bis 2 Tage.
- Da die kulturelle Anzucht von Aktinomyzeten 14 Tage und Nokardien 3 - 10 Tage beansprucht, ist erst nach dieser Zeit mit einem endgültigen Befund zu rechnen
- Positive Blutkulturen werden im Automaten frühestens nach 18 Stunden gemeldet. Die Kulturen werden bis zu 6 Tagen kontinuierlich inkubiert und gemessen. Bei positivem Signal wird ein Grampräparat angefertigt. Das Ergebnis wird telefonisch übermittelt und als Vorbefund in das Klinikinformationssystem gestellt. Die Kultur auf festen Nährmedien sowie Identifizierung und Resistenztestung dauern zusätzlich 1-2 Tage.
- Bitte beachten Sie: durch Wiederholungsuntersuchungen und zusätzlichen Einsatz weiterer Methoden kann es zu einer Verzögerung des Endbefundes um ein oder zwei weitere Tage kommen!



Mykologische Diagnostik

Allgemeines

Durch unseren Untersuchungsgang werden im Allgemeinen die Erreger von oberflächlichen und tiefen Mykosen erfasst. Ein Verdacht auf eine Systemmykose durch Dimorphe Pilze wie: *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* und *Blastomyces dermatitidis*, vor allem bei entsprechender Reiseanamnese, muss speziell vermerkt werden, damit die Kulturen länger als üblich beobachtet werden.

Mikroskopie

Mit Material beschichte Objektträger für eine mikroskopische Untersuchung bitte luftgetrocknet, aber nicht fixiert einsenden.

Im Allgemeinen gelten die gleichen Anforderungen wie für bakteriologische Untersuchungen. Bei Unklarheiten bitten wir, bereits vor der Probenentnahme um Rücksprache.

Kultur

Proben für mykologische Untersuchungen sollten im Allgemeinen nativ und in ausreichender Menge eingeschickt werden.

Besondere Hinweise

Ausnahmen: Abstriche auf Watteträger in Transportmedium (Amies-Medium) Biopsien in physiologische Kochsalzlösung

Liquor: Da Pilzmeningitiden oft keimarm sind, sollten mindestens 3 ml untersucht werden.

Stuhl: Untersuchung auf Sproßpilze nur bei Säuglingen, immunsupprimierten Patienten oder Patienten nach Antibiotikatherapie sinnvoll.

Urin: Falls kein Nativ-Urin eingeschickt wird, bitte spezielle Eintauchnährböden für Pilze (z.B. Mycoslide, Roche) verwenden.

Blut: In Blutkulturflaschen (Mycosis-Flaschen oder aerobe Bactec-Flaschen) einsenden.

Kunststoffmaterialien (z. B. Venenkatheter):

In sterilem Behälter einschicken (schneller Transport ins Labor ist wegen Gefahr der Austrocknung nötig)



Diagnostik von Erregern

Candida spp.

Häufigste Spezies: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* (ortho- metapsilosis)

Infektionsweg: endogen; nosokomial (z. B. Neugeborenstation, Intensivstation)

klinische Manifestationen

oberflächliche Candida-Mykose

- Intertrigo, Windeldermatitis (feucht-warmes Milieu)
- Nagelinfektionen
- oropharyngeale Infektion
- Vulvovaginitis; Balanitis
- Keratokonjunktivitis (z. B. nach lokaler Kortikosteroidtherapie)
- chronische mukokutane Candidose

wichtigste Risikofaktoren

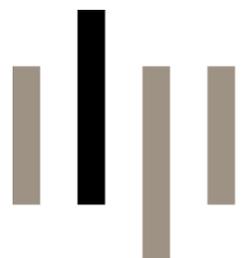
- HIV-Infektion
- Steroidtherapie
- Diabetes mellitus
- Schwangerschaft; orale Kontrazeption
- Chemotherapie

tiefe Candida-Mykose

- lokal: Peritonitis; abdominaler Abszess (z. B. bei CAPD), Zystitis, Pyelonephritis (aufsteigende Infektion), Oesophagitis, Mediastinitis (z. B. nach Oesophagusruptur)
- hämatogen: Candidämie, Meningitis, Endophthalmitis, Arthritis, Osteomyelitis, Endocarditis, Nierenbeteiligung, Lunge (hämatogen oder fortgeleitet), chron. disseminierte Candidose (hepatolienale Candidose)

wichtigste Risikofaktoren

- prolongierte Neutropenie (maligne Erkrankungen)
- KMT, Organtransplantation
- Chemotherapie, Strahlentherapie
- Verbrennungen, Katheter, Antibiotikatherapie
- Abdominal- und Herzchirurgie
- Früh- und Neugeborene



Diagnostik

Mikroskopie (Calcofluor, Gram): alle Materialien

Kultur: alle Materialien

Serologie: Ag+Ak im Serum

Bewertung

Wegen kommensalischen Vorkommens von *Candida albicans* und anderen *Candida* spp. sind positive Kulturen nur bedingt aussagekräftig. Allerdings spricht der kulturelle Nachweis von *Candida* spp. in einem primär sterilen Material, wie z.B. Blut, Liquor, Punktat oder Gewebeprobe, für eine invasive Candidose.

Bei Verdacht auf eine systemische Candidose können außerdem serologische Verfahren (s.o.) durchgeführt werden. Die Interpretation eines positiven *Candida* Antigen-Testes ist abhängig vom verwendeten Test-Kit (Nachweis verschiedener Antigene) sowie von den Risikofaktoren und dem Immunstatus (z. B. Neutropenie) des einzelnen Patienten. Wenn keine eindeutigen Kriterien für eine invasive Candidose vorliegen (s.o.), ist der Nachweis meistens sehr schwierig. Um dann zu einer Diagnose zu kommen, müssen neben den mykologischen Befunden (Kultur, Mikroskopie, Serologie) auch die individuellen Risikofaktoren des Patienten, der klinische Verlauf und andere diagnostische Verfahren (z.B. CT, Sonographie etc.) einbezogen werden.

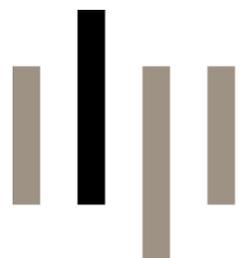
Aspergillus spp. („Aspergillose“)

Allgemeines:

- Häufigste Spezies: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*
- Infektionsweg: Inhalation von Sporen; direkte Inokulation (z. B. Haut, Auge, OP)
- Klinische Manifestationen: saprophytische Kolonisation: Aspergillom (Lunge, Pleura, Sinus), Otomykose
- Invasive Aspergillose (pulmonale Eintrittspforte): invasive, pulmonale Aspergillose; disseminierte Aspergillose: zerebral, renal (Endokarditis, Myokarditis, Endophthalmitis, Osteomyelitis)
- Invasive Aspergillose (nicht-pulmonale Eintrittspforte): meist immunkompetente Patienten; Keratitis, Endophthalmitis (posttraumatisch, postoperativ), Endokarditis (postoperativ; i.v. Drogenabhängige), Infektion von Gefäßprothesen

Wichtigste Risikofaktoren für:

- **Aspergillom:** (Lunge, paranasale Sinus), anatomische Veränderungen der Lunge, z.B. nach Tuberkulose, bei Bronchiektasen etc., chronische Sinusitis, Hypoventilation, Mucusbildung
- **Invasive pulmonale Aspergillose mit/ohne Dissemination:** prolongierte Neutropenie (z. B. nach KMT), Chemotherapie, Steroidtherapie
- **Nicht-pulmonale Eintrittspforte:** Trauma, Operation



Diagnostik:

- Mikroskopie (Calcofluor): alle Materialien
- Kultur: alle Materialien
- Serologie: Ag und Ak im Serum

Bewertung

Der kulturelle Nachweis von *Aspergillus* spp. bei immunsupprimierten Patienten ist ein wichtiger diagnostischer Hinweis für eine Aspergillose: Eine positive Kultur kann jedoch auch durch eine Kontamination der Materialien durch ubiquitär vorkommende *Aspergillus*-Sporen verursacht werden. Bei neutropenischen Patienten sollte aber der Nachweis von *Aspergillus* spp. nicht als Kontamination betrachtet werden. Der mikroskopische Nachweis von typischen Pilzelementen im Direktmaterial ist ein weiteres, wichtiges diagnostisches Kriterium.

Bei Verdacht auf eine Aspergillose können auch serologische Verfahren eingesetzt werden. Der *Aspergillus*-Antigen-Nachweis im Serum weist eine sehr gute Spezifität (~ 98 %), aber eine noch nicht befriedigende Sensitivität (~ 50 – 93 %) auf. Der Nachweis von *Aspergillus* Antigen in BAL und Liquor kann ein Hinweis auf eine invasive Aspergillose sein. Der Antikörpernachweis ist bei immunsupprimierten Patienten nur bedingt aussagefähig.

Zygomyceten ("Mucormykose")**häufigste Erreger:**

- *Rhizopus oryzae*
- *Rhizopus rhizopodiformis*
- *Absidia corymbifera*

Infektionsweg:

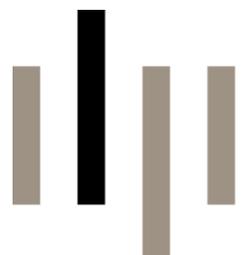
- Inhalation von Sporen
- direkte Inokulation/Aufnahme (z. B. Gastrointestinaltrakt)

klinische Manifestationen:

- rhinocerebral (häufigste Lokalisation) ausgehend von den paranasalen Sinus
- Pneumonie
- zerebral (fortgeleitet oder hämatogen)
- gastrointestinal
- disseminiert (bei hämatogener Streuung)
- Haut

häufigste Risikofaktoren:

- entgleister Diabetes mellitus (Ketoazidose)
- Hyperglykämie bei Steroidtherapie
- Leukämie, Lymphom
- Organtransplantation



- Desferrioxamin-Therapie
- Verbrennungen/Wunden

Diagnostik:

- Mikroskopie (Calcofluor)
- Kultur (aus Biopsien teilweise schlecht anzüchtbar)
- Keine serologische Untersuchung möglich!

Bewertung:

Bedeutung einer positiven Kultur abhängig von klinischer Situation, Material und Resultat der Direktmikroskopie

Dimorphe Pilze (Systemmykosen)**Erreger:**

- Histoplasma capsulatum
- Coccidioides immitis
- Paracoccidioides brasiliensis
- Blastomyces dermatitidis

Infektionsweg:

- Vorkommen nur in Endemiegebieten; Ausnahme: Laborinfektion
- in der Regel Inhalation von Sporen (Ausbreitung auf andere Organsysteme möglich)
- sehr selten primärer Befall der Haut

Diagnostik:

- kultureller Nachweis
- Serologie (Robert-Koch-Institut), kann über Labor Berlin verschickt werden.

Bewertung:

Positive Kulturen sind pathognomonisch; oft falsch-negative Kulturen infolge Überwucherung durch Begleitflora.

Dermatophyten**häufigste Erreger:**

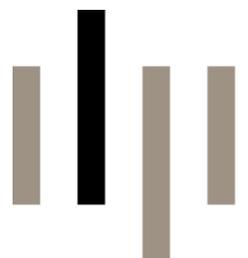
- Trichophyton rubrum
- Trichophyton interdigitale
- Microsporum canis

klinische Manifestationen:

- Infektion von Haaren, Haut, Nägeln

Diagnostik:

- Mikroskopie (KOH)



- kultureller Nachweis aus Patientenmaterial

Bewertung:

Positive Kultur ist pathognomonisch.

Untersuchung auf Pneumocystis jirovecii

Bei Patienten mit Immunschwäche (AIDS, neutropenische Patienten, Tumorerkrankungen, bei zytostatischer und immunsuppressiver Therapie) sowie bei Früh- und Neugeborenen können Lungeninfektionen mit *Pneumocystis jirovecii* (Pneumozystose) auftreten.

Untersuchungsmaterial

- Bronchiallavage: 20 ml oder mehr ohne Zusatz, möglichst aus Lungenbereichen, in denen Herde vermutet werden
- Trachealsekret, Bronchialsekret: nur bei Kindern
- "Induziertes" Sputum: (nach Inhalation von 5 - 10% NaCl) - ohne Zusatz (ungünstige Variante)
- Lungenbiopsie: Biopsie-Material in physiologischer Kochsalzlösung einsenden

Diagnostik:

- Indirekte Immunfluoreszenz

Bisher nicht aufgeführte Pilze (z. B. *Pseudallescheria boydii*, *Fusarium spp.* etc.)

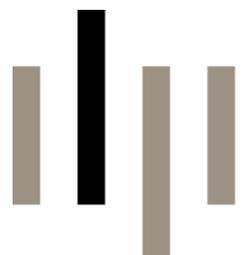
Die Bedeutung einer positiven Kultur ist abhängig von der klinischen Situation, vom Material und dem Resultat der Direktmikroskopie.

Resistenzprüfung**Sprosspilze:**

Bei Isolaten aus normalerweise sterilen Proben oder auf Anforderung können getestet werden:

- Flucytosin (Agardiffusion/e-Test)
- Fluconazol (e-Test)
- Itraconazol (e-Test)
- Voriconazol (e-Test)
- Amphotericin B (e-Test)
- Caspofungin (e-Test)
- Posaconazol (e-Test)

Es gibt für einige Antimykotika noch keine Grenzwerte nach DIN. Die im Befund angegebenen Bewertungen entsprechen Erfahrungswerten aus verschiedenen Studien.

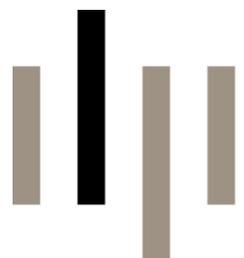
Fadenpilze:

Bei relevanten Isolaten wird eine Resistenztestung in Anlehnung an DIN 58940-84 durchgeführt. Bisher sind keine offiziellen Grenzwerte für die Interpretation der Ergebnisse festgelegt. Die Methode ist nicht akkreditiert.

Befundmitteilung:

Klinisch relevante Resultate werden telefonisch mitgeteilt und schriftlich bestätigt. Die Differenzierung von Schimmelpilzen (auch Kontaminanten) ist zeitaufwendig und erfolgt meist als Nachbefund.

Negative Kulturen werden nach 4 Tagen mitgeteilt. Ein Nachbefund erfolgt nur, falls im Verlauf der weiteren Beobachtungszeit noch Wachstum nachgewiesen werden kann.



Mykobakteriendiagnostik

Allgemeines

Für die Einsendung von Patientenmaterial zur Mykobakteriendiagnostik - sterile Gefäße sowie die Myco-F-lytic-Blutkulturflaschen verwenden (Ausnahme: Gefäße zur Neutralisation von Magensaft bitte direkt im Labor anfordern).

Anforderungen an das Untersuchungsmaterial

(entsprechend DIN 58943/MIQ 5/2010)

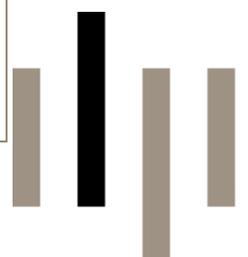
Patientenprobe (Primärprobe)	Gewinnung und Anforderung
Sputum	<p>Gewinnung durch Abhusten aus den tiefen Atemwegen an drei aufeinander folgenden Tagen.</p> <p>Volumen möglichst 2-5 ml.</p> <p>Erstes Morgensputum besonders geeignet.</p> <p>Möglichst geringe Kontamination mit Speichel anstreben.</p> <p>Keine Mundspülung vor Sputumgewinnung.</p> <p>Kein Sammelsputum (wenn Sammeln von Sputum erforderlich, einen Zeitraum von 1 Std. nicht überschreiten).</p> <p>Wenn kein Sputum abgehustet werden kann, sind folgende Alternativen möglich:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Sputuminduktion durch Inhalation von 5- bis 10%iger Kochsalzlösung. Vorsicht: Infektionsgefahr durch Aerosolbildung! Induziertes Sputum als solches kennzeichnen2. Bronchoskopie3. Gewinnung von Magennüchternsekret oder Magenspülwasser <p>Beim Erwachsenen sind die Bronchoskopie und bei Kindern Magennüchternsekret oder –spülwasser der Sputuminduktion vorzuziehen. Postbronchoskopisch gewonnenes Sputum soll eine besonders hohe diagnostische Aussagekraft haben.</p>



<p>Bronchialsekret</p>	<p>Volumen möglichst 2-5 ml.</p> <p>Bronchoskopisch zu gewinnen!</p> <p>Kontamination mit Begleitkeimen aus der Rachen- und Mundflora möglich</p> <p>Trachealsekret von intubierten Patienten oder Patienten mit Trachealtubus ist wegen der Kolonisation mit Begleitkeimen weniger sinnvoll.</p> <p>Die Anwendung von lokal wirksamen Anästhetika bei bronchoskopischen Verfahren kann wegen der möglichen bakteriziden Wirksamkeit das Untersuchungsergebnis verfälschen!</p>
<p>Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit</p>	<p>Möglichst gezielt das betroffene Segment lavagieren.</p> <p>Recovery-Flüssigkeit ohne weitere Behandlung (z.B. Filtration) gesondert für die TB-Diagnostik auffangen.</p> <p>Volumen möglichst 20-30 ml.</p> <p>Die Anwendung von lokal wirksamen Anästhetika bei bronchoskopischen Verfahren kann wegen der möglichen bakteriziden Wirksamkeit das Untersuchungsergebnis verfälschen!</p>
<p>Geschützte Bürste und bronchoskopisch gewonnene Biopsien</p>	<p>Wegen der Gefahr der Austrocknung etwa 0,5 ml sterile physiologische Kochsalzlösung zusetzen.</p> <p>Die Anwendung von lokal wirksamen Anästhetika bei bronchoskopischen Verfahren kann wegen der möglichen bakteriziden Wirksamkeit das Untersuchungsergebnis verfälschen!</p> <p>1 Biopsie bei Tbc-Verdacht; mehrere bei MOTT-Verdacht.</p>
<p>Magennüchternsekret und Magenspülwasser</p>	<p>Je jünger Kinder sind, desto schwieriger ist es, Sputumproben zu gewinnen. Deshalb sind besonders bei kleinen Kindern Magennüchternsekret oder Magenspülwasser zu entnehmen. Bei älteren Kindern und Erwachsenen sind Sputum oder bronchoskopisch gewonnene Proben vorzuziehen.</p> <p>Volumen möglichst 2-5 ml (Magennüchternsekret) bzw. 20-30 ml (Magenspülwasser).</p>



	Die Proben müssen mit Phosphatpuffer neutralisiert werden. Gefäße zum Versand können im Tuberkuloselabor angefordert werden.
Urin	<p>Vorzugsweise Morgenurin nach Einschränkung der Flüssigkeitszufuhr am Vorabend.</p> <p>Kein Mittelstrahlurin, sondern erster Portionsurin!</p> <p>Entnahme unter Vermeidung von mikrobiellen Verunreinigungen.</p> <p>Mindestens 30 ml, keine Sammelurinproben.</p> <p>Nicht aus Urinauffangbeuteln, bei Säuglingen und Kleinkindern können jedoch Einmalklebebeutel verwendet werden.</p>
Menstrualblut	<p>Gynäkologisch gewinnen.</p> <p>Etwa zu gleichen Teilen mit sterilem Wasser versetzen oder als Zitratblut.</p>
Sperma, Prostatasekret	In sterilen Behältnissen auffangen und ohne Zusatz versenden.
Stuhl	<p>Ca. 1-2 g</p> <p>Stuhlproben sollten nur bei Patienten mit zellulärem Immundefekt auf Myko-bakterien untersucht werden.</p> <p>Bei Verdacht auf eine Darmtuberkulose sind endoskopisch gewonnene Biopsien vorzuziehen.</p>
Blut	<p>3–5 ml direkt in Myco-F-lytic-Flaschen verimpfen oder 5 – 10 ml Zitratblut.</p> <p>Nur sinnvoll bei immunsupprimierten Patienten bzw. Verdacht auf Miliar-tuberkulose.</p>
Knochenmark	Für Knochenmarkbiopsate und –aspirate gilt sinngemäß die für Blut festgelegte Vorgehensweise.
Abstrichtupfer	Abstrichtupfer sind im Regelfall nicht geeignet; falls nötig, dann nicht im Transportmedium, sondern in sterilem Gefäß mit Zusatz einer geringen Menge sterilem 0,9%igem NaCl



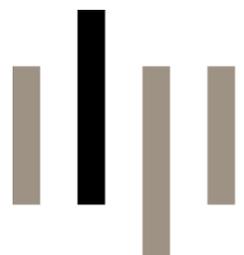
<p>Gewebe, Biopsien</p>	<p>So viel Untersuchungsgut wie möglich ohne Zusätze (wie z.B. Formalin).</p> <p>Durch Zusatz einer adäquaten Menge steriler physiologischer Kochsalzlösung gegen Austrocknung schützen.</p> <p>Anmerkung: Gewebsproben und Biopsien sollten immer auch histologisch untersucht werden.</p>
<p>Körperflüssigkeiten (Punktionen, Aspire, Exsudate)</p>	<p>Z.B. Liquor, Pleuraflüssigkeit, Perikardflüssigkeit, Peritonealflüssigkeit oder -dialysat, Synovialflüssigkeit, Abszesspunktionen.</p> <p>Die Entnahme von möglichst großen Probenmengen ist besonders wichtig, da in diesen Proben Mykobakterien oft nur in sehr geringen Mengen vorkommen.</p> <p>Liquor möglichst 3-5 ml, andere Körperflüssigkeiten möglichst 30-50 ml.</p> <p>Blutige Proben können evtl. Den Zusatz von Antikoagulanzen erforderlich machen (s. hierzu die Angaben zum Blut)</p>
<p>Wundmaterial</p>	<p>Tupferabstriche sind im Regelfall nicht geeignet, siehe Abstrichtupfer.</p> <p>Alternative Probenentnahmen (z.B. nativer Abszessinhalte, aspirierter Eiter, Biopsien, Geschabsel) sind überlegen und vorzuziehen.</p>

Mikroskopie

Von allen Proben, außer Urin, Stuhl und Blut werden nach Vorbehandlung mikroskopische Präparate hergestellt und nach Auramin-Färbung mikroskopiert. Mikroskopisch positive Befunde werden sofort telefonisch übermittelt.

Mykobakterien-Nachweis mittels PCR

- Mycobacterium tuberculosis Komplex (Mtb) (Mtb)
- Nicht-Tuberkulose Mykobakterien (Mycobacteria other than tuberculosis, MOTT)



Methoden

1. **Mycobacterium tuberculosis Komplex** – Amplifikation (COBAS Amplicor, Fa. Roche) eines ca. 600bp großen Fragments der 16S rDNA mit Mykobakterien-Genus-spezifischen Primern. Detektion der PCR-Produkte mittels Hybridisierung mit spezifischen Sonden für M. tuberculosis-Komplex

Untersuchungsdauer: nach Eingang vorbehandelter Proben aus dem Mykobakterienlabor 24-48h.

Literatur: Reischl U, et al.: Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. J Clin Microbiol 1998 Oct; 36(10):2853-60

2. **Nicht-Tuberkulose Mykobakterien**– Nested-PCR eines ca. 600bp großen Fragments der 16S rDNA. Nach Detektion durch Gelelektrophorese, Sequenzierung der PCR-Produkte und Identifizierung durch Abgleich mit verschiedenen Gendatenbanken.

Untersuchungsdauer: ca. 3 Tage bis 2 Wochen nach Eingang vorbehandelter Proben, Durchführung in Abhängigkeit vom Probenaufkommen und der Dringlichkeit der Untersuchung.

Literatur: Kirschner, P. et al.: Diagnosis of Mycobacterial Infections by Nucleic Acid Amplification: 18-Month Prospective Study. J Clin Microbiol 1996; 34:304-312

Material

Der Nachweis von Mtb-DNA im COBAS Amplicor ist für respiratorische Materialien evaluiert (Sputum, Trachealsekret, Bronchialsekret, BAL). Die Untersuchung von Liquor, Punktionen, Gewebeproben, Citrat-Blut, Knochenmark, Abstrichen, Magensaft,

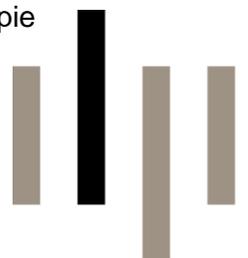
Urin und Stuhl ist möglich – es können jedoch keine Angaben zu Sensitivität und Spezifität der Methode in diesen Materialien gemacht werden.

Für den Nachweis mykobakterieller DNA mittels in-house-PCR können keine Angaben zu Sensitivität und Spezifität in Patientenmaterialien gemacht werden, es liegen keine ausreichenden klinischen Evaluationen vor.

Hinweise zur Probenentnahme entnehmen Sie bitte dem Kapitel Mykobakteriendiagnostik, Kapitel 6.

Indikationen

- Mikroskopisch (Kinyoun-Färbung) positives oder fraglich positives Material.
- Bei begründetem klin. Verdacht auf Tuberkulose bzw. Mykobakteriose (Anamnese, Klinik, Röntgen, positiver Mendel-Mantoux-Test, positiver Quantiferon-Test, Exposition, Immunsuppression).
- Anbehandelte Patienten ohne vorherigen Keimnachweis. Eine Therapiekontrolle ist nicht sinnvoll, da mit der PCR bis zu einem Jahr nach erfolgreicher Therapie noch DNA nachgewiesen werden kann.
- Verdacht auf tuberkulöse Meningitis



Kultur

- Mykobakterien werden in einer Flüssigkultur (MGIT-Verfahren) und zwei festen Nährböden angezüchtet.
- MGIT-Röhrchen und Myco-F-lytic-Flaschen werden mindestens 6 Wochen auf Wachstum überprüft.
- Festkulturen werden mindestens 8 Wochen lang bebrütet und in regelmäßigen Abständen auf Wachstum überprüft.
- Bei mikroskopisch positiven Proben bzw. molekulardiagnostischem Nachweis von Mykobakterien und einer negativen Kultur nach 8 Wochen Bebrütung wird bei entsprechender Klinik die Bebrütungsdauer bis auf 12 Wochen verlängert.
- Positive Befunde werden sofort telefonisch und schriftlich mitgeteilt.
- Negative Befunde werden nach Abschluss der Kultivierung schriftlich mitgeteilt.

Identifizierung

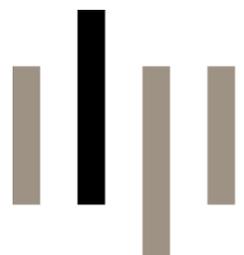
Kulturell positive Proben werden mit Hilfe eines Schnelltestes in Mycobacterium tuberculosis-Komplex (MTBK) und Nicht-Tuberkulose Mykobakterien differenziert.

Resistenztestung

Tuberkulosebakterien (MTBK) werden routinemäßig auf folgende Antibiotika getestet: Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid, Streptomycin, Ethambutol.

Bei multiresistenten Stämmen, bei Therapieversagen oder Unverträglichkeiten können nach Absprache mit dem Kliniker darüber hinaus auch Zweitrang- oder Reservemedikamente getestet werden.

Die Resultate der Resistenztestung stehen innerhalb von 1-2 Wochen nach positiver Kultur zur Verfügung. Für nichttuberkulöse Mykobakterien wird nur bei klinischer Relevanz, bei Therapieversagen und nach Rücksprache mit dem Kliniker eine Resistenztestung durchgeführt.



Molekularbiologische Diagnostik

Stellenwert molekularbiologischer Diagnostik

Die Nukleinsäureamplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht einen schnellen und sensitiven Nachweis von Krankheitserregern und kann so eine sinnvolle Ergänzung zu den konventionellen kulturellen Verfahren darstellen. Wegen des hohen personellen und finanziellen Aufwandes sollte eine strenge Indikationsstellung erfolgen. Die molekularbiologische Diagnostik findet eine sinnvolle Anwendung im Nachweis von Bakterien, die nicht oder nur schwer kultivierbar sind oder wie z.B. Mykobakterien nur sehr langsam wachsen. Sie kann auch zur Identifizierung von Bakterienkulturen eingesetzt werden, die nicht mit den üblichen Methoden differenziert werden können. Eine häufig genutzte Zielsequenz ist die 16S rDNA, die sowohl hochkonservierte Bereiche, die für alle Bakterienspezies identisch sind enthält, als auch hypervariable Regionen aufweist, die für bestimmte Gattungen / Spezies spezifisch sind. Die Identifizierung des amplifizierten Genabschnittes erfolgt entweder durch Hybridisierung mit spezifischen Sonden oder durch Sequenzierung.

Nachteil der PCR-Diagnostik ist ein durch die hohe Sensitivität der Methode bedingtes Kontaminationsrisiko. Daher ist ein positives Ergebnis nicht automatisch mit einer Infektion gleichzusetzen, sondern kann nur im Kontext von kulturellen oder serologischen Nachweisverfahren, anderen mikrobiologischen Befunden und dem

klinischen Bild hinsichtlich seiner Wertigkeit beurteilt werden. Falls das Resultat in einem weiteren Material bestätigt werden kann, erhöht sich die diagnostische Sicherheit beträchtlich. Zudem erfasst die PCR auch tote, nicht mehr vermehrungsfähige Bakterien, so dass die molekularbiologische Diagnostik in der Regel nicht zur Therapiekontrolle eingesetzt werden kann. Trotz der hohen methodischen Sensitivität der PCR kann diese nicht zum Ausschluss einer bestimmten Verdachtsdiagnose herangezogen werden, da nur sehr geringe Mengen des Materials (meist nur wenige µl) eingesetzt werden können und auch die Erreger (dies ist insbesondere bei Mykobakterien der Fall) nicht immer gleichmäßig in der Probe verteilt sind. Ein negatives PCR-Ergebnis bedeutet also lediglich, dass die Konzentration der Krankheitserreger sich unter der Nachweisgrenze der eingesetzten Methode befindet. Eine mehrfache Probenentnahme kann allerdings die diagnostische Sensitivität erhöhen.

Besonderheiten der Präanalytik in der Molekularbiologie

Die Qualität der Ergebnisse der molekularbiologischen Diagnostik ist außer von der eigentlichen Probenanalyse auch maßgeblich von der Präanalytik abhängig.

Abklärung vor der Entnahme:

- Ist eine Beantwortung der diagnostischen Fragestellung durch Einsatz molekularbiologischer Methoden möglich?
- Welches Material, in welcher Menge und welche Modalitäten der Abnahme (z. B. Erststrahlurin für die Chlamydia trachomatis-Diagnostik) sind für die gewünschte Untersuchung geeignet?
- Sofern es die klinische Situation zulässt, sollte der Zeitpunkt der Probenentnahme so gewählt werden, dass ein zügiger Transport und eine schnelle Verarbeitung des Materials gewährleistet sind. Falls eine zeitliche Abstimmung mit dem Labor nicht möglich ist, sollte das Material bei 4° C gelagert werden. Bei Unklarheiten telefonische Rücksprache erbeten.



- Gegebenenfalls ist die rechtzeitige Bestellung von speziellen Abnahmebestecken (z. B. Chlamydia trachomatis-PCR) notwendig (s. u.).

Probenentnahme:

- Das Material sollte so entnommen werden, dass eine Kontamination mit der physiologischen Flora des Patienten möglichst vermieden wird. Bei der intraoperativen Entnahme ist darauf zu achten, dass keine Kontakte zu kontaminierten oder besiedelten Bereichen, wie beispielsweise der Darmschleimhaut stattfinden. Bei Obduktionen dürfen nur sterile, nicht kontaminierte Gerätschaften und sterile Probengefäße zur Entnahme verwendet werden.
- Da generell parallel zur PCR-Diagnostik (Ausnahme nicht oder schlecht kultivierbare Erreger z. B. Tropheryma whipplei) die konventionelle mikrobiologische Diagnostik erfolgen muss, sollte das Probenmaterial für die PCR (Ausnahme Mykobakteriendiagnostik) in einem gesonderten Gefäß asserviert werden, um eine
- Kontamination beim Öffnen des Gefäßes und Teilen der Probe zu vermeiden. Aus dem gleichen Grund sollte Probenmaterial auch auf Station nicht in andere Gefäße umgefüllt werden.
- Um den sogenannten „sampling-error“ möglichst gering zu halten, sollten, soweit sinnvoll, mehrere Patientenmaterialien (insbesondere für die TBC-Diagnostik) eingeschickt werden.
- Zusätze, die einen hemmenden Effekt auf die PCR haben, dürfen nicht verwendet werden (z. B. Formalin, Heparin).
- Es ist ausreichend Material zu entnehmen, um bei Flüssigkeiten durch Zentrifugation eine Anreicherung des Probenmaterials zu ermöglichen und in fraglichen Fällen genügend Material für erforderliche Wiederholungsuntersuchungen zu haben.

Spezielle Anforderungen an das Probenmaterial für die Molekularbiologie**Vollblut, Knochenmark:**

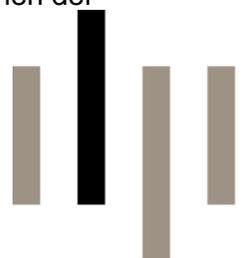
Zur Gerinnungshemmung sollte vorzugsweise Citrat (alternativ EDTA) eingesetzt werden. Heparin ist nicht geeignet, da es zur Hemmung der PCR führen kann.

Abstriche:

Es sollte kein mikrobiologisches Transportmedium (wie z. B. Amies- oder Port-a-cul-Transport-medium) verwendet werden, da dieses einen hemmenden Effekt auf die Amplifikationsreaktion haben kann, vielmehr sollte der Abstrich in ein steriles Gefäß mit etwas steriler Kochsalzlösung gegeben werden, um eine Austrocknung zu verhindern. Grundsätzlich sind aber Aspirate, Punktate oder Biopsien wegen der deutlich höheren Ausbeute vorzuziehen. Für bestimmte Untersuchungen ist ein spezielles Abnahmebesteck erforderlich (Chlamydia trachomatis- und Neisseria gonorrhoeae-PCR), das über die Materialwirtschaft bestellt werden kann (s.u.).

Gewebeproben:

Das Gewebe sollte nativ in sterilen Röhrchen eingeschickt werden. Bei längeren Transportwegen, Zugabe von etwas steriler Kochsalzlösung, um ein Austrocknen der Probe zu verhindern.



Punktate, Liquores, Pleura- und Peritonealfüssigkeiten, respiratorische Materialien, Magensaft , Fruchtwasser, Stuhl:

Die Materialien sollten nativ und in ausreichender Menge in sterilen Röhrchen eingesendet werden



Diagnostik von *Chlamydia trachomatis* & *Neisseria gonorrhoeae*

Methoden

Chlamydia trachomatis

Amplifikation eines ca. 200bp großen Fragments eines kryptischen Plasmids spezifisch für *Chlamydia trachomatis*. Detektion des PCR-Produktes mittels Hybridisierung.

Neisseria gonorrhoeae

Amplifikation (COBAS Amplicor, Fa. Roche) eines ca. 200bp großen Fragments einer chromosomalen Sequenz (vermutlich Methyltransferase-Gen) von *Neisseria gonorrhoeae*. Detektion der PCR-Produkte mittels Hybridisierung. Falsch-positive Ergebnisse sind für einige andere *Neisserien*-Spezies (*N. cinerea*, *N. subflava* – Standortflora im Nasenrachenraum) bekannt, deshalb müssen positive Ergebnisse durch eine weitere PCR in einem anderen Genbereich bestätigt werden.

Untersuchungsdauer

ca. 1 bis 3 Tage nach Eingang der Probe, Durchführung in Abhängigkeit von der angefallenen Probenzahl.

Probengewinnung, Material & Transport

Die Nachweismethoden sind nur für Endocervix-Abstriche, Urethral-Abstriche und Erststrahl-Urin evaluiert. Die Untersuchung von Vaginalabstrichen, Sperma, Douglaspunktat, Gelenkpunktat, respiratorischen Materialien (s.o.), Pharynxabstrichen, Konjunktivalabstrichen, Rektumabstrichen und Gewebeproben ist möglich - es können jedoch keine Angaben zu Sensitivität und Spezifität der Methoden in diesen Materialien gemacht werden.

Parallel zur PCR-Diagnostik sollte immer auch eine kulturelle Anzucht (2. Abstrich in Bakteriette) angestrebt werden, um eine Resistenztestung zu ermöglichen.

Für die molekularbiologische Untersuchung von Cervical- und Urethralabstrichen müssen spezielle Abstrichbestecke (z.B. STD Swab Specimen Collection and Transport-Kit der Firma Roche) verwendet werden. Besonders zu beachten ist, dass die Abstrichtupfer **nicht** im Transportmedium belassen werden dürfen.

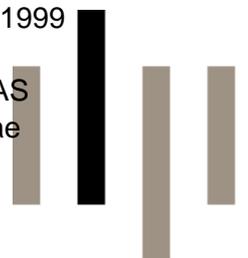
Für Urine sind nur Polypropylenbehälter ohne Konservierungsstoffe geeignet.

Für Bindehautabstriche sollten sterile Abstrichtupfer verwendet werden.

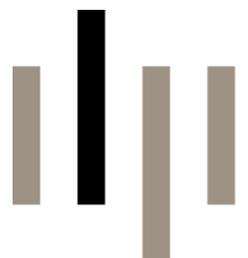
Literatur

Vincelette, J. et al: Multicenter evaluation of the fully automated COBAS AMPLICOR PCR test for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. J Clin Microbiol. 1999 Jan;37(1):74-80

van Doornum, G. J., et al: Comparison between the LCx Probe system and the COBAS AMPLICOR system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*



infections in patients attending a clinic for treatment of sexually transmitted diseases in Amsterdam, The Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2001 Mar; 39(3):829-35



Toxoplasma gondii

Methoden

Real-time PCR mit Amplifikation und Sondenhybridisierung (FRET) eines 163bp großen Fragmentes eines für Toxoplasma gondii spezifischen Genes (Cryptic-Genes). Bei positivem Ergebnis erfolgt eine Bestätigung durch Amplifikation und Hybridisierung (Real-time PCR) eines zweiten spezifischen Genabschnittes (B1-Gen).

Untersuchungsdauer

Ca. ein Tag bis eine Woche nach Eingang der Probe, Durchführung in Abhängigkeit von der angefallenen Probenzahl und der Dringlichkeit der Untersuchung.

Material

Die Toxoplasmose-PCR ist validiert für folgende Materialien: Fruchtwasser, Liquor, Citratblut

Die Untersuchung von Kammerwasser und Gewebeproben ist möglich, es können jedoch keine Angaben über Sensitivität und Spezifität der Untersuchung gemacht werden.

Indikation

Verdacht auf frische Toxoplasma gondii-Infektion in der Schwangerschaft. Die Sensitivität der PCR im Fruchtwasser ist in der 17-21 SSW am höchsten.

Verdacht auf intrauterine Infektion bei Neugeborenen

Verdacht auf Infektion bzw. Reaktivierung bei immunsupprimierten Patienten. Bei HIV-Patienten ist nach ca. 7-10 Tagen Therapie keine Toxoplasma gondii-DNA mehr nachweisbar.

Literatur

Reischl, U. et al.: Comparison of two targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence energy transfer hybridization probes. BMC Infectious Diseases 2003,3:7:1-9

Ramand S. et al: Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. Obstet Gynecol, 2001; 97(2): 296-300

