

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code	PPH_ZBS2_leistungen_007	Gültig ab: 08.09.2017
Version-Nr.:	7	Seite 1 von 14

Zielsetzung:	Dokumentation und Kommunikation der spezifischen Anweisungen für die ordnungsgemäße Entnahme und Handhabung von Primärproben bzw. Proben mit dem Ziel der Optimierung der präanalytischen Phase von Untersuchungsverfahren, die durch das Diagnostiklaboratorium angeboten werden.
Verteiler:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Im Internet des RKI 2. QMB-OE ZBS2: 1 Mehrschrift 3. Original: Qualitätsmanagementbeauftragter des RKI (QMB-OL)

Dieses Dokument ersetzt die Version vom:	27.03.2015				
Änderungshinweise:	sind markiert				
Erstellt/ Überarbeitet:	<table border="0"> <tr> <td>04.01.2018</td> <td>Prof. Dr. med. Roland Grunow</td> </tr> <tr> <td>Datum</td> <td>Titel Vorname Name <i>Unterschrift (auf ausgedrucktem Original)</i></td> </tr> </table>	04.01.2018	Prof. Dr. med. Roland Grunow	Datum	Titel Vorname Name <i>Unterschrift (auf ausgedrucktem Original)</i>
04.01.2018	Prof. Dr. med. Roland Grunow				
Datum	Titel Vorname Name <i>Unterschrift (auf ausgedrucktem Original)</i>				
Gepprüft:	<table border="0"> <tr> <td>04.01.2018</td> <td>Dr. Silke Klee</td> </tr> <tr> <td>Datum</td> <td>Titel Vorname Name <i>Unterschrift (auf ausgedrucktem Original)</i></td> </tr> </table>	04.01.2018	Dr. Silke Klee	Datum	Titel Vorname Name <i>Unterschrift (auf ausgedrucktem Original)</i>
04.01.2018	Dr. Silke Klee				
Datum	Titel Vorname Name <i>Unterschrift (auf ausgedrucktem Original)</i>				
Freigegeben:	<table border="0"> <tr> <td>08.01.2018</td> <td>Dr. Janine Kleymann-Hilmes</td> </tr> <tr> <td>Datum</td> <td>Titel Vorname Name <i>Unterschrift (auf ausgedrucktem Original)</i></td> </tr> </table>	08.01.2018	Dr. Janine Kleymann-Hilmes	Datum	Titel Vorname Name <i>Unterschrift (auf ausgedrucktem Original)</i>
08.01.2018	Dr. Janine Kleymann-Hilmes				
Datum	Titel Vorname Name <i>Unterschrift (auf ausgedrucktem Original)</i>				

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code	PPH_ZBS2_Leistungen_007	Gültig ab: 08.09.2017
Version-Nr.:	7	Seite 2 von 14

Inhaltsverzeichnis

1. Anwendungsbereich	3
2. Zweck	3
3. Abkürzungen und Definitionen	3
3.1 Abkürzungen	3
3.2 Definitionen	4
4. Verantwortlichkeiten	4
5. Versandmaterialien und Hilfsmittel	4
6. Präanalytische Informationen und Hinweise	5
6.1 Allgemeine Informationen zum Fachgebiet ZBS2 (Laboratorium)	5
6.2 Leistungsangebot	6
6.3 Formblätter	6
6.4 Hinweise zur Ausfüllung der Formblätter	7
6.5 Informationen für Patienten bzw. Probanden zur Vorbereitung der Probenentnahme	7
6.6 Anweisungen über die richtige Entnahme von Primärproben	7
6.7 Hinweise zur Kennzeichnung der Primärprobe und weiterer erforderlicher Daten	8
6.8 Anweisungen über besondere zeitliche Festlegungen hinsichtlich der Probenentnahme und des Probenverkehrs	9
6.9 Entsorgung von bei der Probenentnahme verwendeten Materialien	9
6.10 Aufbewahrungsbedingungen von im Laboratorium untersuchten Proben	9
6.11 Zusätzliche bzw. Wiederholungsuntersuchungen	9
6.12 Kriterien zur Annahme bzw. Zurückweisung von Primärproben	9
6.13 Rückmeldungen und Reklamationen	10
6.14 Gebühren	10
7. Qualitätskontrolle	10
7.1 Interne Qualitätskontrolle	10
7.2 Externe Qualitätskontrolle	11
8. Besondere Sicherheitsmaßnahmen	11
9. Literatur (ausgewählt)	11
10. Mitgeltende Dokumente	13
11. Anlagen	13
12. Unterschriftenliste	14

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code	PPH_ZBS2_leistungen_007	Gültig ab: 08.09.2017
Version-Nr.:	7	Seite 3 von 14

1. Anwendungsbereich

Dieses Primärprobenhandbuch gilt für die mikrobiologische Diagnostik von hochpathogenen bakteriellen Erregern (siehe angeführte Liste im Rahmen der flexiblen Akkreditierung) im Fachgebiet ZBS2, kurz HPME (Hochpathogene Mikrobielle Erreger), in der Abteilung ZBS (Zentrum für Biologische Gefahren und spezielle Pathogene) am Robert Koch-Institut.

2. Zweck

Im Rahmen dieses Primärprobenhandbuchs werden den Einsendern spezifische Anweisungen für die ordnungsgemäße Entnahme und Handhabung von Primärproben gegeben mit dem Ziel der Optimierung der präanalytischen Phase von Untersuchungsverfahren, die durch ZBS2 angeboten werden. ZBS2 stellt zudem das nationale Konsiliarlaboratorium für *Bacillus anthracis* sowie das nationale Konsiliarlaboratorium für Tularämie dar.

Das Primärprobenhandbuch enthält insbesondere

- Anweisungen zu Probenahme und Versand (5, 6.1),
- eine Aufstellung über die zur Verfügung stehenden Laboruntersuchungen (Leistungsangebot, 6.2),
- Einsendeinformationen über die medizinischen Indikationen und/oder die adäquate Auswahl von zur Verfügung stehenden Laborleistungen (6.2),
- Hinweise zur Ausfüllung des Probenbegleitscheines (6.3, 6.4),
- Verweise auf Formblätter für Einverständniserklärungen (6.3),
- an Patienten/Probanden zu übergebende Informationen und Anweisungen zur Vorbereitung der Probenentnahme (6.5),
- Verfahrensbeschreibungen und Anweisungen über die richtige Auswahl und Entnahme sowie den Versand von Proben (6.6),
- Verfahren zur Identitätskennzeichnung der Primärprobe einschließlich der Art und Menge der Probe (6.7),
- Anweisungen über besondere zeitliche Festlegungen hinsichtlich der Probenentnahme und des Probentransportes (6.8)
- Anweisungen für die sichere Entsorgung des bei der Probenentnahme verwendeten Materials (6.9),
- Anweisungen zu den Aufbewahrungsbedingungen untersuchter Proben (6.10),
- Regelungen zur Möglichkeit von zusätzlichen und/oder Wiederholungsuntersuchungen aus der gleichen Primärprobe (6.11),
- Kriterien zur Annahme oder Zurückweisung von Proben (6.12),
- Informationen zu Rückmeldungen und Reklamationen (6.13) sowie Gebühren (6.14).

3. Abkürzungen und Definitionen

3.1 Abkürzungen

BSL	- Biosicherheitslabor
ELISA	- enzyme-linked immunosorbent assay
FG	- Fachgebiet
HPME	- Hochpathogene mikrobielle Erreger
LM	- lichtmikroskopische Untersuchung (Gramfärbung)
PCR	- Polymerasekettenreaktion

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code	PPH_ZBS2_leistungen_007	Gültig ab: 08.09.2017
Version-Nr.:	7	Seite 4 von 14

- rtPCR - real-time PCR
TA - Technische/r Assistent/in
WA - Wissenschaftliche/r Angestellte/r
V.i.A. - Vertreter im Amt

3.2 Definitionen

entfällt

4. Verantwortlichkeiten

Tätigkeiten ZBS2 HPME	Geschulte Mitarbeiter
Probeneingang	WA/TA
Serologische Tests: ELISA Vorbereitung und Durchführung	Durchführung: TA/WA Auswertung: TA/WA
PCR Nachweis: DNA Extraktion Real-time PCR	Durchführung: TA/WA Auswertung: TA/WA
Anzucht: - Anlegen der Platten - Ablesen der Platten - Bestätigungstests (Real-time PCR)	TA/WA/Laborantin TA/WA TA/WA
Erstellung des Ergebnisberichtes	FG-Leitung oder V.i.A.
Unterschrift des Ergebnisberichtes	FG-Leitung oder V.i.A.

5. Versandmaterialien und Hilfsmittel

Probe	Versandmaterial
Serum mind. 200 µl, (Plasma mind. 200 µl, Vollblut mind. 1 ml)	Vorzugsweise Standard-Serumröhrchen abzentrifugiert oder Serumprobe; alternativ (wenn Serum nicht verfügbar) Vollblutröhrchen (Blut mit Antikoagulant z.B. EDTA oder Heparin, vorzugsweise abzentrifugiertes Plasma).
Abstrich/Wundabstrich (mind. 1 Tupfer)	Tupfer in Transportröhrchen mit halbfestem/flüssigem Transportmedium (vorzugsweise Amies-Medium)
Organmaterial (mind. 0,1-0,5 g)	Transportröhrchen oder –gefäß mit Transportmedium (isotonische NaCl oder PBS, Amies-Medium)
Blutkultur (mind. 2 ml) bzw. Blutkultur-Flasche (BD-System)	Steril abgenommene Blutkultur mit nachgewiesenem Wachstum oder beimpfte Blutkultur-Flasche (Becton-Dickinson-System) nach Absprache
Bakterienkultur (mind. 1 Tupfer/Öse)	Tupfer in Transportröhrchen mit halbfestem/flüssigem Transportmedium (vorzugsweise Amies-Medium)
Weitere Sekrete und Körperflüssigkeiten	Transportröhrchen, steril ohne Zusätze oder in Blutkulturflaschen steril abgenommen

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code	PPH_ZBS2_Leistungen_007	Gültig ab: 08.09.2017
Version-Nr.:	7	Seite 5 von 14

Probe	Versandmaterial
(mind. 100 µl)	
Umweltproben	asserviert in geeigneten Probengefäßen, RT oder gekühlt, nach Absprache; 50-100 g oder 50-100 ml
Weitere Proben (auch tierische Proben)	nach Absprache

Einsendungen an das ZBS2 für HPME müssen gemäß den Bestimmungen zum Versand von medizinischem Untersuchungsmaterial verschickt werden, das bedeutet vorzugsweise in dreifacher Verpackung nach der Verpackungsvorschrift P650 (siehe die Bestimmungen zum Probentransport nach ADR (www.rki.de/DE/Content/Infekt/Biosicherheit/Probentransport/Probentransport_node.html)). Die für den Transport beauftragte Firma sollte ein Qualitätssicherungssystem nachweisen können. Verpackung und Transportbedingungen von Umweltproben sind von der jeweiligen Risikobewertung des einzelnen Einsenders abhängig. Es muss jedoch eine sichere Verpackung gewährleistet sein, die ein Freisetzen des Materials unter den verwendeten Transportbedingungen verhindert. Alle Proben, aus denen eine Erregeranzucht versucht werden soll, müssen auf schnellstem Weg (vorzugsweise innerhalb von 12-24 h nach Abnahme) zum Empfänger geschickt werden. In der Regel sind die Proben gekühlt (möglichst bei 4-8°C) zu versenden. Ein Probeneingang am Wochenende oder an Feiertagen ist nach Möglichkeit zu vermeiden.

6. Präanalytische Informationen und Hinweise

6.1 Allgemeine Informationen zum Fachgebiet ZBS2 (Laboratorium)

Leitung: Prof. Dr. med. Roland Grunow

Vertretung: Dr. Daniela Jacob

Das ZBS2 für HPME nutzt verschiedene Methoden der Diagnostik zur Identifizierung von Infektionen und Kontaminationen mit HPME.

Neben klassischen bakteriologischen Methoden werden moderne molekulare und immunologisch-serologische Methoden eingesetzt und weiter entwickelt, um eine schnelle verlässliche Erkennung von Infektionen mit HPME zu ermöglichen. Weitere ausführliche Informationen zu diesen bakteriellen Krankheitserregern sind auf der Homepage des RKI der Allgemeinheit zugänglich. Neben den Erregern von Anthrax und Tularämie im Rahmen der konsiliarlaboratorischen Tätigkeit werden auch andere zoonotische HPME diagnostiziert bzw. differentialdiagnostisch ausgeschlossen (s. Anlage, „Diagnostikangebot ZBS2, flexible Akkreditierung“).

Vor der Einsendung der Proben muss mit dem ZBS2 Kontakt aufgenommen werden (möglichst telefonisch, alternativ auch per E-Mail), um Ablauf und Art, sowie den Zeitrahmen der Analysen abzuklären. Der Eingang von Proben sollte möglichst nicht an einem Wochenende oder an Feiertagen erfolgen, da nur für Notfälle eine 24/7 Laborbereitschaft vorgehalten wird. Unser Notfalldienst ist telefonisch 24 h, 7 Tage in der Woche (24/7) erreichbar. Die Annahme von Proben an der Pforte der RKI-Liegenschaft Seestr. 10 ist jederzeit möglich. Während der Kernarbeitszeit (Mo-Fr von 8.30 bis 17 Uhr) kann mit der Laborarbeit unmittelbar begonnen werden. Am Abend oder in der Nacht startet die Laborarbeit unter Umständen mit einem Zeitverzug von einigen Stunden. An Wochenenden ermöglicht eine Labor-Rufbereitschaft die Laborarbeit 1 Stunde nach Eingang des Notrufes zu beginnen. Notruf: RKI-Zentrale Tel. 030/18754-0.

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code	PPH_ZBS2_Leistungen_007	Gültig ab: 08.09.2017
Version-Nr.:	7	Seite 6 von 14

6.2 Leistungsangebot

- Beratung zu Fragen der Diagnostik, der epidemiologischen Analyse, der pathogenetischen Relevanz eingesandter Isolate sowie zur Interpretation der diagnostischen Ergebnisse. Therapieempfehlungen im Einzelfall kann das ZBS2 nicht abgeben; hier hat es lediglich beratende Funktion.
- Real-Time PCR (rtPCR): Der zurzeit schnellste und hochsensitive Nachweis von HPME ist der Nachweis der Nukleinsäure der Bakterien mittels rtPCR. Dabei werden verschiedene Zielstrukturen der DNA erfasst, womit die diagnostische Sicherheit erhöht wird. Weiterführende molekulare Typisierungsmethoden sind möglich.
- Mikroskopie und Anzucht/Isolierung: Für die Bestätigung des Vorhandenseins lebender Bakterien und deren weitere Charakterisierung stellt die Anzucht ein entscheidendes Element der Diagnostik dar. Darüber hinaus kann die Anzucht unter optimalen Bedingungen auch den sensitivsten Nachweis der Bakterien darstellen. Parallel zur Kultivierung der Bakterien und für eine erste Identifizierung werden Färbungen und mikroskopische Verfahren eingesetzt. In ZBS2 sind verschiedene Verfahren zur Isolierung der Bakterien über deren Kultivierung mittels verschiedener Nährmedien, einschließlich Selektivnährmedien, etabliert.
- Serologie: Neben dem direkten Nachweis der Erreger mit Hilfe der rtPCR oder der Anzucht können Expositionen mit diesen Bakterien bei Menschen und Tieren auch indirekt mit serologischen Methoden nachgewiesen werden. Antikörper gegen die Bakterien können mit spezifischen ELISA bestimmt werden. Darüber hinaus stehen für eine zusätzliche Bestätigung der Antikörper Westernblots zur Verfügung. Für den Nachweis des Cholera-Toxins aus Bakterienkulturen werden ebenfalls immunologische Methoden angewendet.

Die Tabelle im Anhang „Diagnostik-Angebot ZBS2“ zeigt die in unserem Labor etablierten und evaluierten Methoden für HPME.

Die Durchführung der PCR- und Serologie-Untersuchungen erfordert eine Bearbeitungszeit von bis zu 2 Werktagen. Ein abschließender schriftlicher Bericht wird im Allgemeinen ca. 2-3 Werktage nach Probeneingang erstellt. Die Durchführung der Anzucht und Identifizierung dauert bis zu 5 Werktagen für *Bacillus anthracis* und weitere Anthrax-Erreger der *Bacillus cereus*-Gruppe und schnell wachsende HPME sowie bis zu 10 Werktagen für *Francisella tularensis* und andere langsam wachsende HPME. Wird die Anzucht der Erreger durchgeführt, kann sich der Zeitraum bis zum Bericht verzögern oder das Anzuchtergebnis wird im positiven Fall nachgeliefert (entsprechender Vermerk auf dem Bericht wird eingefügt). Bei begründeter klinischer Fragestellung (z. B. akuter Fall) oder Umweltproben mit dringender Fragestellung (z.B. Proben mit Bioterrorverdacht) kann ein vorläufiger Bericht zu einzelnen Untersuchungsergebnissen angefordert werden. Der vorläufige Bericht wird vorzugsweise telefonisch (für dringende Fälle sollte die Nummer eines Mobiltelefons angegeben werden) an eine vom Einsender benannte autorisierte Person übermittelt. Nach Abschluss aller Untersuchungen folgt ein endgültiger Bericht. Die Rückstellproben bzw. die gewonnenen Isolate gehen in das Repository von ZBS2 zur etwaigen anonymisierten Weiterverwendung im Rahmen von QM-Maßnahmen oder wissenschaftlichen Fragestellungen über, wenn dem auf dem Probenbegleitschein (s. 6.3) nicht widersprochen wird.

6.3 Formblätter

- Einverständniserklärungen für die Entnahme oder Untersuchungen von Proben im Rahmen des Leistungsangebotes von ZBS2 sind nicht erforderlich.

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code	PPH_ZBS2_Leistungen_007	Gültig ab: 08.09.2017
Version-Nr.:	7	Seite 7 von 14

- Einsendungen müssen einen Probenbegleitschein enthalten (vorzugsweise sollte der Probenbegleitschein von ZBS2 verwendet werden:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Diagnostik_Speziallabore/Bakterien/Begleitschein_Probeneinsendung.pdf?blob=publicationFile), aus dem mindestens hervorgeht:
 - Patientenidentifikation (vorzugsweise verschlüsselt) bzw. Identifikation von Umweltproben
 - Auftraggeber und Empfänger des Ergebnisberichtes
 - Art der diagnostischen Anforderung
 - Materialbeschreibung
 - Wenn möglich, Kurzbeschreibung des klinischen Bildes und anamnestischer Zusammenhänge bzw. der Umweltproblematik
 - Evtl. Widerruf zur anonymisierten Weiterverwendung des Probenmaterials bzw. von Erregerisolaten.
- Probenannahme im RKI und Transport zum zuständigen Labor (siehe VAW_LAB_probeneingang)

6.4 Hinweise zur Ausfüllung der Formblätter

Jede eingesandte Probe muss mit einem Probenbegleitschein versehen sein (siehe 6.3). Der Nachweis einer Reihe von HPME ist nach Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig. Entsprechend den Definitionen hat diese Meldepflicht durch den behandelnden Arzt bzw. das erstmalig diagnostizierende Labor zu erfolgen. Für Anthrax ist z. B. gemäß §6 IfSG der Krankheitsverdacht, die Erkrankung sowie der Tod und gemäß §7 der direkte oder indirekte Erregernachweis zu melden. Für Tularämie gilt eine Meldepflicht für den Erregernachweis gemäß §7 IfSG. Weitere Informationen über meldepflichtige Erkrankungen in der Anlage „Diagnostikangebot ZBS2“.

(IfSG:

http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/IfSG/Meldepflichtige_Krankheiten/Meldepflichtige_Krankheiten_node.html). Der Ergebnisbericht beinhaltet dazu eine entsprechende Information.

6.5 Informationen für Patienten bzw. Probanden zur Vorbereitung der Probenentnahme

Entfällt.

6.6 Anweisungen über die richtige Entnahme von Primärproben

Die Indikation für eine Untersuchung auf HPME ist auf den entsprechenden Internetseiten des RKI beschrieben, wie z.B.

Ratgeber für Ärzte:

http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/merkblaetter_node.html

Mikrobiologische Untersuchungen und Erregerfeintypisierung am RKI von A-Z:

http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Mikrobiologische_Untersuchungen/Mikrobiologische_Untersuchungen_node.html

Falldefinitionen:

http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/IfSG/Falldefinition/Downloads/Falldefinitionen_des_RKI.pdf?blob=publicationFile

„Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten“:

http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/Steckbriefe/Steckbriefe_120606.pdf?blob=publicationFile

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code	PPH_ZBS2_leistungen_007	Gültig ab: 08.09.2017
Version-Nr.:	7	Seite 8 von 14

Informationen zu geeigneten Primärproben für die Diagnostik von HPME werden in der Anlage „Diagnostikangebot ZBS2“ zur Verfügung gestellt.

Zweckmäßigerweise sollten Proben zur Untersuchung mittels PCR in Amies-Transportmedium versandt werden. Ein gekühlter Versand ist nur bei Organ- und Gewebeproben erforderlich, alle anderen Proben können bei Raumtemperatur versendet werden, sofern die üblichen Transportzeiten für medizinisches Probenmaterial (siehe 6.8) nicht deutlich überschritten werden.

Die für den Transport beauftragte Firma sollte ein Qualitätssicherungssystem nachweisen können.

Bei serologischen Untersuchungen können stark hämolytische Proben, unvollständig geronnene Serumproben sowie Plasmaproben mit Fibrin, hyperlipämische, stark bilirubinhaltige, bakteriell kontaminierte und hitzeinaktivierte Proben oder kreuzreaktive Antikörper (weitestgehend durch Validierung ausgeschlossen) zu falsch-reaktiven Ergebnissen führen. Der Nachweis von Bakterien kann durch Autolyse des Gewebes oder zu lange Transportzeiten negativ beeinflusst werden.

Methoden	Material	Menge	Transport
Serologische Untersuchungen	<ul style="list-style-type: none"> • Serum (vorzugsweise) • Plasma • Vollblut 	0,2-10 ml 0,2-10 ml 1-10 ml	Raumtemperatur
PCR, Anzucht	<ul style="list-style-type: none"> • Wundabstrich (Hautabstrich, Ulcusmaterial) • Organ/Gewebe (Biopsie) • Körperflüssigkeiten (z. B. Urin, Liquor) 	Nach Verfügbarkeit	Möglichst gekühlt, Amies-Transportmedium
	<ul style="list-style-type: none"> • Blutkultur 	2-10 ml	Raumtemperatur
	<ul style="list-style-type: none"> • Bakterienkultur 	wenig Koloniematerial	Raumtemperatur, Tupfer in Amies-Transportmedium
	<ul style="list-style-type: none"> • Weitere Proben (auch tierische Proben oder Umweltproben) 	Nach Absprache	Nach Absprache

S. auch Punkt 5 dieses Handbuchs.

6.7 Hinweise zur Kennzeichnung der Primärprobe und weiterer erforderlicher Daten

Jede eingesendete Probe muss mit einer eindeutigen Proben-Nr. (Labor-Nr. des Einsenders) gemäß dem Probeneinsendeformular gekennzeichnet sein. Einsendungen an das ZBS2 müssen gemäß den Bestimmungen zum Versand von medizinischem Untersuchungsmaterial (http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Biosicherheit/Probentransport/Probentransport_node.html) nach der Verpackungsvorschrift P650 erfolgen. Diagnostische Proben mit Verdacht auf Anthrax- oder Tularämieerreger gehören zur Kategorie B, UN 3373, und müssen mit der Bezeichnung „Biological substance, category B“ versehen sein.

Bereits diagnostizierte Reinkulturen von *B. anthracis*, verwandten Anthrax-Erregern oder *F. tularensis* oder anderen Erregern der Risikogruppe 3 bzw. als Kategorie A nach IATA oder ADR klassifiziert, die zur Bestätigung und weiteren Charakterisierung an das ZBS2 eingesandt werden, müssen entsprechend UN 2814 (P620) verpackt und versendet werden.

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code	PPH_ZBS2_Leistungen_007	Gültig ab: 08.09.2017
Version-Nr.:	7	Seite 9 von 14

6.8 Anweisungen über besondere zeitliche Festlegungen hinsichtlich der Probenentnahme und des Probenverkehrs

Abnahmedatum und Zeit muss auf der Probe vermerkt werden. Es ist sicherzustellen, dass die Probe so schnell wie möglich das Untersuchungslabor erreicht. Alle Proben mit Fragestellung der Anzucht von Bakterien müssen auf schnellstem Weg (innerhalb von 12-24 h nach Abnahme) beim Empfänger eintreffen. In der Regel sind die Proben gekühlt (möglichst bei 4-8°C) zu versenden. Alle anderen Proben sollten nicht länger als 48 h transportiert werden. Ein Probeneingang an Wochenenden oder Feiertagen ist nach Möglichkeit zu vermeiden oder muss bei hoher Dringlichkeit gesondert verabredet werden.

6.9 Entsorgung von bei der Probenentnahme verwendeten Materialien

Die Entsorgung der infektiösen Materialien erfolgt durch Autoklavieren nach im RKI etablierten Standardarbeitsanweisungen gemäß dem Stand von Wissenschaft und Technik.

6.10 Aufbewahrungsbedingungen von im Laboratorium untersuchten Proben

Proben zur serologischen Untersuchung werden bis zur Analyse bei 4°C aufbewahrt; Proben zur PCR-Untersuchung oder Anzucht ebenfalls bei 4°C, wobei diese in der Regel sofort nach Eingang bearbeitet werden. Nach den Analysen erfolgt eine Lagerung für 6 Monate bei 4°C oder bei -20°C (totes Material) bis -80°C (Bakterien oder bakterienhaltiges Material, das zur Anzucht verwendet werden könnte) in Abhängigkeit von der Art der Probe. Die Aufbewahrungsorte sind Kühlgeräte im akkreditierten Bereich (4°C, -20°C, -80°C). Isolierte Bakterienstämme können in die Stammsammlung von ZBS2 aufgenommen werden, wie auf den Probenbegleitschein von ZBS2 ausgewiesen.

6.11 Zusätzliche bzw. Wiederholungsuntersuchungen

Grundsätzlich sollte die serologische Untersuchung zweimal im Mindestabstand von 14 Tagen erfolgen, insbesondere, wenn ein positiver Erstbefund vorliegt. In Einzelfällen kann ein einmalig hoher Antikörpertiter bereits den Krankheitsverdacht bestätigen. Bei Verdacht auf andere als in der Anforderung beschriebene Krankheitserreger kann in Abstimmung mit dem Einsender (siehe Probenbegleitschein) eine weitergehende Diagnostik eingeleitet werden.

6.12 Kriterien zur Annahme bzw. Zurückweisung von Primärproben

Eingesandte Proben müssen den o. g. Anforderungen an die Verpackung gemäß den Bestimmungen zum Versand von medizinischem Untersuchungsmaterial entsprechen; unsachgemäß verpackte Einsendungen stellen eine Gefährdung für die transportierenden oder annehmenden Mitarbeiter dar und können daher zurückgewiesen bzw. entsorgt werden. Der Einsender, wenn ersichtlich, erhält in einem solchen Fall eine Benachrichtigung.

Einsendungen, denen kein ausgefüllter Probenbegleitschein beiliegt, können nicht befundet werden.

Einsendungen, bei denen die Proben beeinträchtigt sind und möglicherweise zu fehlerhaften Untersuchungsergebnissen führen (z. B. wegen zu langer Transportdauer), werden unter Vorbehalt angenommen und untersucht. Ein kritischer Zustand der Probe wird im Ergebnisbericht dokumentiert.

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code	PPH_ZBS2_Leistungen_007	Gültig ab: 08.09.2017
Version-Nr.:	7	Seite 10 von 14

6.13 Rückmeldungen und Reklamationen

Für Anfragen zu Einsendungen oder Ergebnisberichten, Rückmeldungen sowie Reklamationen stehen die wissenschaftlichen Mitarbeiter des ZBS2 in der Regel werktags von 08:30 bis 17:00 zur Verfügung. Kontakte:

Prof. Dr. med. Roland Grunow (Leiter ZBS2)

Telefon: +49 (0)30 - 18754-2100
Fax: +49 (0)30 - 18754-2110
E-Mail: GrunowR@rki.de

Dr. Daniela Jacob (Stvtr. Leiterin ZBS2)

Telefon: +49 (0)30 - 18754-2934
Fax: +49 (0)30 - 18754-2110
E-Mail: JacobD@rki.de

Weitere Mitarbeiter nach Vereinbarung.

6.14 Gebühren

Die Durchführung der Untersuchungen kann nach GOÄ abgerechnet werden.

Art des eingesetzten Verfahrens	GOÄ-Nr.
Isolierung von Nukleinsäuren	4780
Amplifikation von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten mittels PCR	4783
Identifizierung von Nukleinsäurefragmenten durch Sequenzermittlung	4787
ELISA (Bestimmung von AK mittels Ligandenassay)	4291
Immunoblot	A-4408
Gramfärbung des Probenmaterials	4511
Rakette oder andere Färbung des Probenmaterials	4513
Gramfärbung des Bakterienkulturausstriches	4553
Bakterien-Nachweis, aerobe Züchtung auf Selektiv-/Anreicherungsmedien, je Nährmedium	4538
Bakterien-Nachweis, Züchtung in CO ₂ -Atmosphäre, je Nährmedium	4532
Orientierende Identifizierung, Untersuchung von angezüchteten Bakterien mit einfachen Verfahren (z. B. Katalase-, Oxidasetest)	4545
Agglutinationsreaktion (Vibrio O:1, O:139)	4432
Untersuchung zum Nachweis von Bakterientoxinen mittels Ligandenassay (Choleratoxin)	4593
Untersuchung zur quantitativen Prüfung der Empfindlichkeit von Bakterien gegen Antibiotika	4614

7. Qualitätskontrolle

Die Untersuchungen erfolgen gemäß Qualitätssicherungssystem im RKI/ ZBS2 (s. Anhang „Diagnostik-Angebot ZBS2“).

7.1 Interne Qualitätskontrolle

Als interne Qualitätskontrolle werden in allen Untersuchungen Positiv- und Negativkontrollen eingesetzt, die die korrekte Durchführung der Analysen dokumentieren.

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code	PPH_ZBS2_leistungen_007	Gültig ab: 08.09.2017
Version-Nr.:	7	Seite 11 von 14

7.2 Externe Qualitätskontrolle

Externe Qualitätskontrollen werden durch Beteiligung an nationalen oder internationalen Ringversuchen durchgeführt, sofern verfügbar. Alternativ werden Interlaborvergleiche durchgeführt.

8. Besondere Sicherheitsmaßnahmen

Proben sind potentiell infektiös, daher ist die Probenaufarbeitung unter der Mikrobiologischen Sicherheitswerkbank durchzuführen. Es gilt die aktuelle Betriebsanweisung für BSL der Schutzstufe 2 (BioStoffV). Proben von Patienten oder Umweltmaterialien, bei denen bereits bekannt ist, dass sie Erreger der Risikogruppe 3 enthalten, müssen unter Schutzstufe 3 (BioStoffV) bearbeitet werden. Weiterführende Charakterisierungen von Reinkulturen von Erregern der Risikogruppe 3 haben im BSL der Schutzstufe 3 zu erfolgen, es sei denn, sie wurden nachweislich inaktiviert. Grundlage für die Festlegung der Sicherheitsmaßnahmen sind für den Arbeitsschutz die Technischen Richtlinien für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe.

9. Literatur (ausgewählt)

Stern D, Richter M, Schrick L, Lasch P, Keeren K, Polleichtner A, Lemmer K, Nitsche A, Grunow R, Herzog C, Dorner BG, Schaade L (2016) [On-site detection of bioterrorism-relevant agents : Rapid detection methods for viruses, bacteria and toxins - capabilities and limitations]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 59:1577-1586.

Grunow R, Jacob D, Klee S, Schlembach D, Jackowski-Dohrmann S, Loening-Baucke V, Eberspächer B, Swidsinski S (2016) Brucellosis in a refugee who migrated from Syria to Germany and lessons learnt, 2016. Euro Surveill. 21(31).

Dupke S, Akinsinde KA, Grunow R, Iwalokun BA, Olukoya DK, Oluwadun A, Velavan TP, Jacob D (2016) Characterization of *Vibrio cholerae* strains isolated from the Nigerian cholera outbreak in 2010. J Clin Microbiol. 54:2618-2621.

Schulze C, Heuner K, Myrtenäs K, Karlsson E, Jacob D, Kutzer P, Große K, Forsman M, Grunow R (2016) High and novel genetic diversity of *Francisella tularensis* in Germany and indication of environmental persistence. Epidemiol Infect. 144:3025-3036.

Keim P, Grunow R, Vipond R, Grass G, Hoffmaster A, Birdsell DN, Klee SR, Pullan S, Antwerpen M, Bayer BN, Latham J, Wiggins K, Hepp C, Pearson T, Brooks T, Sahl J, Wagner DM (2015) Whole genome analysis of injectional anthrax identifies two disease clusters spanning more than 13 years. EBioMedicine. 2:1613-1618.

Slesak G, Fleck R, Jacob D, Grunow R, Schäfer J (2016) Imported cholera with acute renal failure after a short business-trip to the Philippines, Germany, October 2015. Euro Surveill. 21(1).

Becker S, Lochau P, Jacob D, Heuner K, Grunow R (2016) Successful re-evaluation of broth medium T for growth of *Francisella tularensis* ssp. and other highly pathogenic bacteria. J Microbiol Methods. 121:5-7.

Lasch P, Wahab T, Weil S, Pályi B, Tomaso H, Zange S, Kiland Granerud B, Drevinek M, Kokotovic B, Wittwer M, Pflüger V, Di Caro A, Stämmeler M, Grunow R, Jacob D (2015) Identification of highly pathogenic microorganisms by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Results of an interlaboratory ring trial. J Clin Microbiol. 53:2632-2640.

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code	PPH_ZBS2_Leistungen_007	Gültig ab: 08.09.2017
Version-Nr.:	7	Seite 12 von 14

Zasada AA, Formińska K, Zacharczuk K, **Jacob D**, **Grunow R** (2015) Comparison of eleven commercially available rapid tests for detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. Lett Appl Microbiol. 60:409-413.

Grunow R, Ippolito G, **Jacob D**, **Sauer U**, **Rohleder A**, Di Caro A, Iacovino R (2014) Benefits of a European project on diagnostics of highly pathogenic agents and assessment of potential "dual use" issues. Front Public Health 2:199.

Rydzewski K, **Schulz T**, Brzuszkiewicz E, Holland G, Lück C, Fleischer J, **Grunow R**, **Heuner K** (2014). Genome sequence and phenotypic analysis of a first German *Francisella* sp. isolate (W12-1067) not belonging to the species *Francisella tularensis*. BMC Microbiol 14:169.

Epidemiologisches Bulletin, Ausgabe 41/2014 (Meliodiose: Fallvorstellung einer Patientin aus dem Rhein-Neckar-Kreis; Hinweise zur Labordiagnostik von *Burkholderia pseudomallei*).

Grunow R, **Klee SR**, Beyer W, George M, **Grunow D**, **Barduhn A**, **Klar S**, **Jacob D**, Elschner M, Sandven P, Kjerulf A, Jensen JS, Cai W, Zimmermann R, Schaade L (2013) Anthrax among heroin users in Europe possibly caused by same *Bacillus anthracis* strain since 2000. Euro Surveill. 18(13).

RKI (Grunow R, Grunow D, Schaade L) (2012) Anthrax - Serologische Untersuchung zur Fallfindung von *Bacillus anthracis* Expositionen bei Heroinkonsumenten in Deutschland im Zeitraum 2010-2011. Epid Bull 26.

Klee SR, Brzuszkiewicz EB, **Nattermann H**, Bruggemann H, **Dupke S**, Wollherr A, et al. (2010) The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. PLoS ONE 5:e10986.

RKI (Grunow R, Kühn A, Bernard H, Faber M) (2010) Ein dritter Fall von Anthrax bei einem i. v. Heroinkonsumenten in Deutschland. Epid Bull 49.

Jenzora A, Jansen A, **Ranisch H**, Lierz M, Wichmann O, Grunow R (2008) Seroprevalence study of *Francisella tularensis* among hunters in Germany. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 53:183-189.

Grunow R, Porsch-Ozcürümez M, Splettstoesser W, Buckendahl A, Hahn U, Beyer W, Böhm R, Huber M, vd Esche U, Bessler W, Frangoulidis D, Finke EJ. (2007) Monitoring of ELISA-reactive antibodies against anthrax protective antigen (PA), lethal factor (LF), and toxin-neutralising antibodies in serum of individuals vaccinated against anthrax with the PA-based UK anthrax vaccine. Vaccine 25:3679-3683.

Klee SR, Nattermann H, Becker S, Urban-Schriefer M, Franz T, Jacob D, Appel B (2006) Evaluation of different methods to discriminate *Bacillus anthracis* from other bacteria of the *Bacillus cereus* group. J. Appl. Microbiol. 100:673-681.

Klee SR, Ozel M, Appel B, Boesch C, Ellerbrok H, Jacob D, et al. (2006) Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. J. Bacteriol. 188:5333-44.

Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B (2006) Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. BMC Microbiol 6:2.

Klee SR, Jacob D, Nattermann H, Appel B (2003) Bioterroristisch relevante bakterielle Erreger: Epidemiologie, Klinik, Diagnostik. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 46:935-948.

Ellerbrok H, **Nattermann H**, Ozel M, Beutin L, **Appel B**, Pauli G (2002) Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. FEMS Microbiol Lett. 214:51-59.

ZBS2 Hochpathogene mikrobielle Erreger

Dokumenten-ID-Code PPH_ZBS2_leistungen_007
Version-Nr.: 7

Gültig ab: 08.09.2017
Seite 13 von 14

10. Mitgeltende Dokumente

Sämtliche Methoden-SOPs werden in aktueller und autorisierter Fassung im ZBS2 vorgehalten und beinhalten Verfahrensvorschriften zur „internen“ Präanalytik. Diese können bei Bedarf und nach Absprache mit dem Leiter und dem Qualitätsbeauftragten von ZBS2 eingesehen werden.

11. Anlagen

Ausgefüllte Probenbegleitscheine und ggf. weitere ausgefüllte Formblätter
Diagnostikangebot ZBS2 (PPH_ZBS2_leistungen_FLT-Anl01_diagnostik)
Probenbegleitschein (PPH_ZBS2_leistungen_FLT-Anl02_probenbegleitschein)

