

ROBERT KOCH INSTITUT



KONSILIARLABOR FÜR ROTAVIREN
Präanalytikhandbuch



Deutsche
Akkreditierungsstelle
D-ML-13113-01-01



Deutsche
Akkreditierungsstelle
D-PL-13113-01-01

Inhaltsverzeichnis

1	QM-Dokumentenlenkung.....	3
2	Zweck.....	3
3	Abkürzungen und Definitionen	3
4	Präanalytische Informationen und Hinweise	4
4.1	Allgemeine Informationen und Hinweise.....	4
4.2	Leistungsangebot.....	4
4.2.1	Leistungsspektrum.....	4
4.2.2	Methodenspektrum.....	5
4.3	Formblätter.....	5
4.4	Hinweise zur Ausfüllung der Formblätter.....	5
4.5	Informationen für Patienten bzw. Probanden zur Vorbereitung der Probenentnahme.....	6
4.6	Anweisungen über die richtige Entnahme von Primärproben	6
4.7	Hinweise zur Kennzeichnung der Primärprobe und weiterer erforderlicher Daten	6
4.8	Anweisungen über besondere Festlegungen hinsichtlich des Probenverkehrs	6
4.9	Entsorgung von bei der Probenentnahme verwendeten Materialien	6
4.10	Aufbewahrungsbedingungen von im Laboratorium untersuchten Proben.....	6
4.11	Zusätzliche bzw. Wiederholungsuntersuchungen.....	6
4.12	Kriterien zur Annahme bzw. Zurückweisung von Primärproben.....	6
4.13	Rückmeldungen und Reklamationen.....	7
4.14	Gebühren.....	7
5	Besondere Sicherheitsmaßnahmen	7
6	Verweise.....	7
6.1	Mitgeltende Dokumente	7
6.2	Literatur	7

1 QM-Dokumentenlenkung

Erstellt	20.01.2020, Andreas Mas Marques
Geprüft	21.01.2020, Sandra Niendorf
Freigegeben/Gültig ab	22.01.2020, Dr. J. Kleymann-Hilmes

2 Zweck

Im Rahmen dieses Präanalytikhandbuches werden spezifische Anweisungen für die ordnungsgemäße Entnahme und Handhabung von Primärproben und Stämmen mit dem Ziel der Optimierung der präanalytischen Phase von Untersuchungsverfahren, die durch das Konsiliarlabor für Rotaviren (KL) angeboten werden, dokumentiert und an die Einsender kommuniziert. Das Präanalytikhandbuch enthält insbesondere

- eine Aufstellung über die zur Verfügung stehenden Laboruntersuchungen (Leistungsangebot),
- Einsenderinformationen über die medizinischen Indikationen und/oder die adäquate Auswahl von zur Verfügung stehenden Laborleistungen,
- Verweis auf den Probenbegleitschein und Hinweise zum Ausfüllen des Probenbegleitscheines,
- Verfahrensbeschreibungen und Anweisungen über die richtige Auswahl und Entnahme sowie den Versand von Proben,
- Verfahren zur Identitätskennzeichnung der Primärprobe einschließlich der Art und Menge der Probe,
- Anweisungen über besondere zeitliche Festlegungen hinsichtlich der Entnahme und ggf. des Proben-transportes,
- Anweisungen für die sichere Entsorgung des bei der Probenentnahme verwendeten Materials,
- Anweisungen zu den Aufbewahrungsbedingungen untersuchter Proben,
- Regelungen zur Möglichkeit von zusätzlichen und/oder Wiederholungsuntersuchungen aus der gleichen Primärprobe

3 Abkürzungen und Definitionen

Abkürzung	Ausdruck
ADR	internationale Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße
KL	Konsiliarlabor
RKI	Robert Koch-Institut
SOP	Standardarbeitsanweisung

4 Präanalytische Informationen und Hinweise

4.1 Allgemeine Informationen und Hinweise

Leitung: Dr. Andreas Mas Marques

Vertretung: Dr. Sandra Niendorf

Das Konsiliarlabor (KL) für Rotaviren am RKI ist im Geschäftsgebiet des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG). Die Aufgaben des Konsiliarlabors beruhen auf der Anforderung des BMG zu einer effektiven Präventions- und Bekämpfungsstrategie von Infektionskrankheiten und zum Ausbau von infektionsepidemiologischen Netzwerken. Die gesetzliche Grundlage ist das Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (IfSG). Die Aufgaben umfassen unter anderem folgende Aspekte: Molekulare Surveillance von zirkulierenden Rotaviren durch Feincharakterisierung der Viren (Sequenzierung und Genotypisierung), Aufklärung von Ausbruchsgeschehen, Aufklärung von Infektketten, Untersuchungen zu persistierenden Rotavirus-Infektionen, Analysen zur Erfassung der Erregervariabilität, Bestätigungsuntersuchungen (vielfach von Proben mit diskrepanten Vorergebnissen) und Differenzierung von Wild- und Impfstämmen bei symptomatischen Verläufen nach Impfung. Hierfür ist eine enge Zusammenarbeit mit Untersuchungsämtern, Einrichtungen des öffentlichen Gesundheitswesens, Universitätsinstituten und -kliniken, Krankenhäusern, privaten Laboratorien und niedergelassenen Ärzten Voraussetzung.

Im KL sind molekularbiologische Methoden für den Nachweis von Rotavirus-Genom, sowie die Genotypisierung und Differenzierung von Rotavirus Wild-/Impfsequenzen in verschiedenen Genomsegmenten etabliert. Mittels Sequenzierung und phylogenetischer Analysen in verschiedenen Genomregionen können Aussagen zur Genomveränderung von Rotaviren (antigenic drift bzw. shift) getroffen werden.

Die Genotypisierungs-Daten werden in enger Zusammenarbeit auf europäischer Ebene ausgetauscht, um schnell Informationen über die aktuelle Zirkulation von Virusvarianten in Europa zu erhalten.

Nach § 7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) ist der laborgestützte primäre Nachweis von Rotaviren durch die untersuchenden Laboratorien meldepflichtig.

Für Ärzte sind nach § 6 IfSG Krankheitsverdacht und Erkrankung an einer akuten infektiösen Gastroenteritis meldepflichtig, wenn die erkrankte Person eine Tätigkeit im Sinne des § 42 IfSG ausübt oder wenn zwei oder mehr gleichartige Erkrankungen auftreten, bei denen ein epidemiologischer Zusammenhang wahrscheinlich ist oder vermutet wird.

4.2 Leistungsangebot

4.2.1 Leistungsspektrum

- Molekularer Nachweis von Rotavirus-RNA (Gruppe A und C)
- Molekulare Feincharakterisierung von Gruppe A Rotaviren
- Entwicklung und Optimierung von Methoden zum Nachweis und zur Charakterisierung von Rotaviren
- Aufklärung von Infektketten (z.B. bei nosokomialen Infektionen)
- Beratung und Unterstützung zu Rotavirus-Nachweis und –Differenzierung sowie zu Anforderungen an das Untersuchungsmaterial und Versandbedingungen
- Abgabe von Referenzmaterial (mittels Material Transfer Agreement, entsprechend hausinterner Regelung).
- Öffnungszeiten: Werktags (Montag-Freitag), 8:30 bis 16:30 Uhr

4.2.2 Methodenspektrum

Im Einzelnen werden die folgenden Methoden angewandt:

- Quantitativer² und qualitativer Nachweis von Rotavirus-Genom mittels Nukleinsäureamplifikationstechniken
- G- und P-Typisierung von Rotaviren mittels Computer-gestützter Fragmentlängenanalyse^{1,2} amplifizierter Abschnitte aus den Genen für VP7 („G Typ“) und VP4 („P Typ“). VP7 und VP4 sind die beiden äußeren Antigene, sie stellen wichtige Unterscheidungsmerkmale unterschiedlicher Rotavirus-Stämme dar.
- Molekulare Differenzierung von Rotavirus Wild- und Impfstämmen (aus Rotarix® bzw. RotaTeq®)²
- Sequenzierung von Rotavirus-Stämmen in verschiedenen Genomsegmenten, insbesondere der Gene für die VP4-, VP7- und VP6-Antigene, sowie das NSP4-Enterotoxin.²

Im KL werden routinemäßig folgende Untersuchungen für jede eingesandte Probe durchgeführt:

- Nukleinsäure-Präparation
- Nachweis von Rotavirus-Genom mittels Reverser Transkription und Real-Time PCR oder nested PCR

Der Nachweis von Rotavirus-Genom erfordert eine Bearbeitungszeit von ca. 2-3 Arbeitstagen, die genotypischen Untersuchungen ca. 10 Arbeitstage. Ein abschließender schriftlicher Laborbericht wird daher je nach Fragestellung im Allgemeinen nach 2-10 Arbeitstagen erstellt. Bei begründeter klinischer Fragestellung kann ein vorläufiger Laborbericht (Zwischenbericht) zu einzelnen Untersuchungsergebnissen angefordert werden.

¹ Mas Marques et al. 2007, Iturriza-Gomara et al. 2009

² nicht-akkreditierte Verfahren

4.3 Formblätter

- Der Proben-Begleitschein wird auf Anfrage zur Verfügung gestellt oder kann von der RKI-Homepage heruntergeladen werden (Anlage 01).
- Einverständniserklärungen für die Entnahme oder Untersuchungen von Proben im Rahmen des Leistungsangebotes des Konsiliarlabors sind nicht erforderlich.
- Die Abgabe von Positivkontrollen (Stuhlproben) durch das Konsiliarlabor darf nur an solche Labore erfolgen, die nach § 52 Infektionsschutzgesetz (IfSG) eine Erlaubnis zum Arbeiten mit Krankheitserregern besitzen (Ausnahmen: staatliche human- oder veterinärmedizinische Untersuchungseinrichtungen). Vor der Abgabe muss ein Material Transfer Agreement (Material Transfer Agreement / Abgabe von Krankheitserregern) ausgefüllt und von der anfordernden Einrichtung unterschrieben werden (ggf. zusätzlich Formular „Vergewisserung“: Material Transfer; Agreement / Abgabe von Krankheitserregern / Vergewisserung § 52 IfSG). Diese Formblätter werden auf Anforderung zur Verfügung gestellt.

4.4 Hinweise zur Ausfüllung der Formblätter

Je Gastroenteritisausbruch sollten mindestens 2, max. 5 Proben von Erkrankten eingesandt werden.

Für jede eingesandte Probe sollten auf dem ausgefüllten Proben-Begleitschein Angaben zum Einsender, zu Patientendaten (Patienten- oder Probennummer), zum Ausbruch (welche Einrichtung, Zahl der betroffenen Patienten), Angaben zur angeforderten Untersuchung, sowie zur Adresse und Tel./Fax-Nr. des Bericht-Empfängers gemacht werden. Diese Daten ermöglichen dem KL die molekular-epidemiologische Überwachung der Zirkulation von Rotaviren.

4.5 Informationen für Patienten bzw. Probanden zur Vorbereitung der Probenentnahme

Im Rahmen des Leistungsangebots des KL sind keine besonderen Informationen erforderlich.

4.6 Anweisungen über die richtige Entnahme von Primärproben

Der Nachweis von Rotaviren erfolgt in der Regel aus Stuhl, ggf. aus Erbrochenem (ca. 1 g bzw. 1 ml). Die Proben werden in handelsübliche Stuhlröhrchen gefüllt. Beim Versand mehrerer Proben muss die Abfüllung so erfolgen, dass eine Kreuzkontamination vermieden wird.

Eine Probenentnahme sollte möglichst während der akuten Phase der Gastroenteritis erfolgen (idealerweise 1 bis 2 Tage nach Einsetzen der Symptome). Da die Viren in der Regel noch 1 bis 2 Wochen nach dem Abklingen der Symptome ausgeschieden werden (in einigen Fällen auch länger), können nach Absprache mit dem Konsiliarlabor ggf. später entnommene Proben zur Untersuchung eingesandt werden. Der Nachweis von Viren erfolgt in der Regel aus Stuhl, ggf. aus Erbrochenem (ca. 1 g bzw. 1 ml). Die Proben werden in handelsübliche Stuhlröhrchen gefüllt.

Siehe Anlage 2

Bei einer neurologischen oder systemischen Beteiligung können nach Absprache Liquor oder Serum eingesandt werden (ca. 200 µl).

4.7 Hinweise zur Kennzeichnung der Primärprobe und weiterer erforderlicher Daten

Jede Probe muss eindeutig gekennzeichnet sein (Patienten-Nr. und/oder Proben-Nr. des Einsenders) und eindeutig dem mitgeschickten Proben-Begleitschein des Konsiliarlabors zuzuordnen sein. Sofern keine eindeutige Kennzeichnung der Probe vorliegt und sie nicht uneindeutig zugeordnet werden kann, siehe Abschnitt 4.12.

4.8 Anweisungen über besondere Festlegungen hinsichtlich des Probenverkehrs

Beim Versand mehrerer Proben muss die Abfüllung der Proben so erfolgen, dass eine Kreuzkontamination vermieden wird. Einsendungen an das KL sind als UN-Nummer 3373 „Biologischer Stoff, Kategorie B“ zu klassifizieren und sind nach der Verpackungsanweisung P650 (dreifache Verpackung, stabile Außenverpackung) zu verpacken. Ein gekühlter Versand ist bei Stuhlproben nicht erforderlich. Liquor- und Serumproben sollten jedoch gekühlt versendet werden. Ein gekühlter Versand ist bei Stuhlproben nicht erforderlich. Liquor und Serum sollten jedoch gekühlt versendet werden.

4.9 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.

4.10 Aufbewahrungsbedingungen von im Laboratorium untersuchten Proben

Die Proben werden bis zur Bearbeitung bei 4°C gelagert (max. 3 Tage). Für eine längerfristige Lagerung werden die Proben bei -20°C eingefroren.

4.11 Zusätzliche bzw. Wiederholungsuntersuchungen

Bei begründeter klinischer Fragestellung können nach Absprache zwischen Einsender und Konsiliarlabor innerhalb von vier Wochen nach Proben-Einsendung zusätzliche Untersuchungen (wie z.B. Suche nach weiteren viralen Gastroenteritiserregern) erfolgen.

4.12 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 (ADR) entsprechen; unsachgemäß verpackte

Einsendungen stellen eine Gefährdung für die transportierenden oder annehmenden Mitarbeiter dar und können daher zurückgewiesen oder entsorgt werden.

- Proben, die nicht eindeutig zu den Daten des Einsendescheins zuzuordnen sind, die für die beauftragte Untersuchung ungeeignet sind oder deren zugehöriger Untersuchungsauftrag nicht geklärt werden kann, können nicht bearbeitet werden. Sie werden ggf. entsorgt.

4.13 Rückmeldungen und Reklamationen

Für Anfragen zu Einsendungen oder Berichten, Rückmeldungen sowie Reklamationen stehen die Mitarbeiter des KL zur Verfügung.

Kontakt :

E-Mail: KL-Rotaviren@rki.de
Telefon: +49 (0)30 - 18754-2375
Fax: +49 (0)30 - 18754-2617

Anschrift:

Robert Koch-Institut
Konsiliarlabor für Rotaviren
Fachgebiet 15
Seestr. 10
13353 Berlin

4.14 Gebühren

Für die primäre Diagnostik von Gastroenteritisproben werden Gebühren nach der Gebührenordnung der Ärzte berechnet. Für Proben, die nach Absprache mit dem Konsiliarlabor zur sekundären Differentialdiagnostik von Rotaviren oder zur molekular-epidemiologischen Untersuchung zur Überwachung der zirkulierenden Rotaviren eingesandt werden, werden keine Gebühren erhoben.

5 Besondere Sicherheitsmaßnahmen

Siehe Abschnitt 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.12 des Präanalytikhandbuchs.

6 Verweise

6.1 Mitgeltende Dokumente

Sämtliche Methoden-SOPs der akkreditierten Untersuchungsverfahren werden in aktueller und autorisierter Fassung im KL vorgehalten und beinhalten Verfahrensvorschriften zur internen Präanalytik. Diese können bei Bedarf und nach Absprache mit dem Leiter und dem Qualitätsbeauftragten des Labors eingesehen werden.

Anlage 1: PPH_FG15_rota-Anl01-begleitschein (Probenbegleitschein)

Anlage 2: PPH_FG15_rota-Anl02-Probenentnahme-Stuhl (Information zur richtigen Entnahme von Stuhlproben)

6.2 Literatur

Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, Franco MA, Greenberg HB, O'Ryan M, Kang G, Desselberger U, Estes MK: Rotavirus infection. Nat Rev Dis Primers. 2017 Nov 9;3:17083.

Hungerford D, Vivancos R; EuroRotaNet network members, Read JM, Pitzer VE, Cunliffe N, French N, Iturriza-Gómara M.: In-season and out-of-season variation of rotavirus genotype distribution and age of infection across

12 European countries before the introduction of routine vaccination, 2007/08 to 2012/13. *Euro Surveill.* 2016;21(2).

Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, Fiore L, Johansen K, Korsun N, Kroneman A, Lappalainen M, László B, Maunula L, Matthijnssens J, Midgley S, Mladenova Z, Poljsak-Prijatelj M, Pothier P, Ruggeri FM, Sanchez-Fauquier A, Schreier E, Steyer A, Sidaraviciute I, Tran AN, Usonis V, Van Ranst M, de Rougemont A, Gray J.: Rotavirus surveillance in Europe, 2005-2008: web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. *J Infect Dis.* 2009 Nov 1;200 Suppl 1:S215-21.

Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, Fiore L, Johansen K, Koopmans M, Korsun N, Koukou D, Kroneman A, László B, Lappalainen M, Maunula L, Marques AM, Matthijnssens J, Midgley S, Mladenova Z, Nawaz S, Poljsak-Prijatelj M, Pothier P, Ruggeri FM, Sanchez-Fauquier A, Steyer A, Sidaraviciute-Ivaskeviciene I, Syriopoulou V, Tran AN, Usonis V, Van Ranst M, de Rougemont A, Gray J.: Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect.* 2011 Jun;139(6):895-909.

Japhet MO, Famurewa O, Iturriza-Gómara M, Adesina OA, Opaleye OO, Niendorf S, Bock CT, Mas Marques A: Group A rotaviruses circulating prior to a national immunization programme in Nigeria: Clinical manifestations, high G12P[8] frequency, intra-genotypic divergence of VP4 and VP7. *J Med Virol.* 2018 Feb;90(2):239-249.

Klinkenberg D, Blohm M, Hoehne M, Mas Marques A, Malecki M, Schildgen V, Schneppenheim R, Müller I, Schildgen O, Kobbe R. Risk of Rotavirus Vaccination for Children with SCID. *Pediatr Infect Dis J.* 2015 Jan;34(1):114-5.

Koch J, Wiese-Posselt M, Remschmidt C, Wichmann O, Bertelsmann H, Garbe E, Hengel H, Meerpohl JJ, Mas Marques A, Oppermann H, Hummers-Pradier E, von Kries R, Mertens T.: Background paper to the recommendation for routine rotavirus vaccination of infants in Germany. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2013 Jul;56(7):957-84.

Mas Marques A, Diedrich S, Huth C, Schreier E.: Group A rotavirus genotypes in Germany during 2005/2006. *Arch Virol.* 2007;152(9):1743-9.

Mas Marques A, Molekulare Epidemiologie von Rotaviren in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin* 25/2009.

Matthijnssens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K, Rahman M, Zeller M, Beutels P, Van Damme P, Van Ranst M: Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009 Dec;4:1303-16.

Oh DY, Gaedicke G, Schreier E.: Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity. *J Med Virol.* 2003 Sep;71(1):82-93.

Rosenfeld L, Mas Marques A, Niendorf S, Hofmann J, Gratopp A, Kühl JS, Schulte JH, von Bernuth H, Voigt S5: Life-threatening systemic rotavirus infection after vaccination in severe combined immunodeficiency (SCID). *Pediatr Allergy Immunol.* 2017 Dec;28(8):841-843.

Wiese-Posselt M, Rotaviren in Deutschland (2001–2006): *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2007; 155 (2): 167-175.

