

ROBERT KOCH INSTITUT



NRZ FÜR POLIOMYELITIS UND ENTEROVIREN

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.....	5
4.3	Formblätter.....	6
4.4	Hinweise zur Ausfüllung der Formblätter.....	7
4.5	Informationen für Patienten bzw. Probanden zur Vorbereitung der Probenentnahme.....	7
4.6	Anweisungen über die richtige Entnahme von Primärproben	7
4.7	Hinweise zur Kennzeichnung der Primärprobe und weiterer erforderlicher Daten	7
4.8	Anweisungen über besondere Festlegungen hinsichtlich der Probenentnahme und des Proben transports	8
4.9	Entsorgung von bei der Probenentnahme verwendeten Materialien	8
4.10	Aufbewahrungsbedingungen von im Laboratorium untersuchten Proben.....	8
4.11	Zusätzliche bzw. Wiederholungsuntersuchungen	8
4.12	Kriterien zur Annahme bzw. Zurückweisung von Primärproben.....	8
4.13	Rückmeldungen und Reklamationen.....	8
4.14	Gebühren.....	9
5	Besondere Sicherheitsmaßnahmen	9
6	Verweise.....	9
6.1	Mitgeltende Dokumente	9
6.2	Literatur	9

1 QM-Dokumentenlenkung

Erstellt	15.07.2022, Sabine Diedrich
Geprüft	31.08.2022, Sindy Böttcher
Freigegeben/Gültig ab	12.10.2022, Dr. J. Kleymann-Hilmes

Verteiler: QMB-OL → 1 Original
 Fachgebiet 15 → 1 Gelbschrift

2 Zweck

Dieses Primärprobenhandbuch gilt für das NRZ Poliomyelitis und Enteroviren (NRZ PE) des Fachgebiets 15 "Virale Gastroenteritis- und Hepatitiserreger und Enteroviren" der Abteilung 1 „Infektionskrankheiten“ am Robert Koch-Institut.

Im Rahmen dieses Primärprobenhandbuchs werden spezifische Anweisungen für die ordnungsgemäße Entnahme und Handhabung von Primärproben mit dem Ziel der Optimierung der präanalytischen Phase von Untersuchungsverfahren, die durch das NRZ PE angeboten werden, dokumentiert und an die Einsender kommuniziert. Das Primärprobenhandbuch 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,
- Hinweise zum Ausfüllen des Anforderungsformulars,
- an Patienten/Probanden zu übergebende Informationen und Anweisungen zur Vorbereitung der Probenentnahme,
- 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 Probenverkehrs,
- Anweisungen zu den Aufbewahrungsbedingungen untersuchter Proben. Regelungen zur Möglichkeit von zusätzlichen und/oder Wiederholungsuntersuchungen aus der gleichen Primärprobe

3 Abkürzungen und Definitionen

Abkürzung	Ausdruck
NRZ PE	Nationales Referenzzentrum für Poliomyelitis und Enteroviren
RKI	Robert Koch-Institut
P650	Verpackungsanweisung
UN-Nr. 3373	offizielle Benennung für die Beförderung der UN-Nr.3373 lautet „Diagnostische Proben“ oder „Klinische Proben“

Abkürzung	Ausdruck
ADR	Europäisches Übereinkommen über die internationale Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße
IfSG	Infektionsschutzgesetz
WHO	Weltgesundheitsorganisation
AFP	Akute schlaffe Paresen
LaNED	Labornetzwerk Enterovirusdiagnostik in Deutschland

4 Präanalytische Informationen und Hinweise

4.1 Allgemeine Informationen und Hinweise

Leitung: Dr. med. Sabine Diedrich
 Vertretung: Dr. rer. nat. Sindy Böttcher

Hauptaufgabe des NRZ PE ist die Überwachung der Poliofreiheit im Rahmen der globalen WHO Initiative zur Polioeradikation. Dazu wird in Deutschland die Enterovirus surveillance (EVSurv), basierend auf der Untersuchung von Patienten mit viralen Meningitiden bzw. Enzephalitiden und akuten schlaffen Lähmungen (AFP), durchgeführt. Im Rahmen dieser Überwachung werden im NRZ PE neben dem primären Enterovirusnachweis auch Enterovirus positive Proben, die im Rahmen des Labornetzwerkes für Enterovirusdiagnostik in Deutschland (LaNED) erhalten werden, weiter differenziert, um ggf. enthaltene Polioviren sicher auszuschließen.

Das NRZ PE nutzt verschiedene Methoden zum Nachweis und zur Typisierung von Enteroviren, einschließlich Polioviren. Neben molekularen Methoden (PCR-Systeme in verschiedenen Genomregionen mit anschließender Sequenzierung) werden klassische virologische Methoden (Virusanzucht in verschiedenen Zellen und Typisierung im Neutralisationstest) angewendet, um Enterovirusinfektionen sicher nachzuweisen und die aktuell zirkulierenden Viren zu charakterisieren.

Ausführliche Informationen zur Poliomyelitis und zu Enteroviren sind auf der Homepage des NRZ PE zu finden:

http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/Polio/Polio_node.html;jsessionid=CFCE1200B2F246DCAE6AACDE961D4B52.2_cid290

Nach Möglichkeit nimmt der Einsender vor Versand der Proben mit dem NRZ PE telefonisch oder per E-Mail Kontakt auf, um Ablauf und Art, sowie den Zeitrahmen der Analysen abzuklären.

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

Für Ärzte sind nach § 6 IfSG der Krankheitsverdacht, die Erkrankung sowie der Tod an einer Poliomyelitis namentlich meldepflichtig.

4.2 Leistungsangebot

- Enterovirusdiagnostik bei Patienten mit aseptischer Meningitis/Enzephalitis und akuten schlaffen Paresen im Rahmen des WHO-Programms zur Eradikation der Poliomyelitis mit virologischen (Virusanzucht und Typisierung) und molekularen Methoden (PCR in verschiedenen Genomregionen mit anschließender Sequenzierung)
- Molekularbiologische Feincharakterisierung ausgewählter Picornavirustypen zur Aufklärung von Ausbrüchen (Beispiel: Hand-Fuß-Mund-Krankheit) oder für phylogenetische Analysen
- Intratypische Differenzierung von Polioviren (Unterscheidung Impf-/Wildvirus)
- Kontrolle der Populationsimmunität und Feststellung der individuellen Immunität gegen Poliomyelitis bei gegebener Indikation mittels Neutralisationstest (Polio 1 und Polio 3)
- Standardisierung und Verbesserung der molekularen Enterovirusdiagnostik (Beispiel: spezifische PCR-Systeme zum Nachweis der verschiedenen Enteroviruspezies sowie ausgewählter Typen)
- Führung und Abgabe von Referenzmaterial (Virusstämme, Referenzserum für Neutralisationstest) mittels Material Transfer Agreement, entsprechend hausinterner Regelung
- Durchführung von Ringversuchen zum Enterovirusnachweis mittels virologischer (Virusanzucht und Typisierung) und molekularer Verfahren (PCR) in Zusammenarbeit mit INSTAND, Inter-Laborvergleiche zur Qualitätssicherung (Neutralisationstest)
- Beratung des BMG und der obersten Landesbehörden zur Poliomyelitis und zum Komplex der Enteroviren

Wir führen folgende Untersuchungen durch:

PCR-Nachweis und Typisierung von Enteroviren

- Für den Nachweis von enteroviraler RNA wird eine nested RT-PCR in der nichtkodierenden konservierten 5'NCR durchgeführt. Fällt diese positiv aus, werden die Proben weiteren PCRs mit anschließender Sequenzierung unterzogen (VP1-Region, molekulare Typisierung).

Zellkultur

- Für den Nachweis von Enteroviren ist dieses Verfahren seit der Verfügbarkeit sensitiver PCR Systeme von geringerer Bedeutung. Die Virusanzucht (RD-A, CaCo2, Hep2C, L20B) und Typisierung im Neutralisationstest unter Verwendung monospezifischer- oder Poolseren wird bei allen positiv vorgetesteten Proben und bei Patienten mit AFP durchgeführt, um Polioviren auszuschließen. Virusisolate sind eine notwendige Voraussetzung für virologische Untersuchungen hinsichtlich veränderter phänotypischer Eigenschaften.

Serologie

- Der Neutralisationstest zur Bestimmung von Virus-neutralisierenden Antikörpern wird nur für Polio durchgeführt (Polio 1 und Polio 3).

Nachweis	Material
PCR (5'NCR)	Stuhl, Liquor, Rachenabstrich, Zellkulturüberstand
5'NCR-Sequenzierung (Gruppenzuordnung)	Stuhl, Liquor, Rachenabstrich, Zellkulturüberstand
Molekulare Typisierung (VP1-Sequenzierung)	Stuhl, Liquor, Rachenabstrich, Zellkulturüberstand
Anzucht	Stuhl, Liquor, Rachenabstrich, Zellkulturüberstand
Neutralisationstest	Serum

Fettgedruckt: akkreditierte Verfahren nach DIN EN ISO 15189 und DIN EN ISO/IEC 17025 (Anlage 04)

Die Durchführung des molekularen Nachweises erfordert in der Regel eine Bearbeitungszeit von ca. 2 bis 3 Arbeitstagen, die der molekularen Typisierung ca. 10 Arbeitstage. Ein abschließender schriftlicher Bericht wird daher im Allgemeinen nach 2 bis 10 Arbeitstagen erstellt. Bei begründeter klinischer Fragestellung kann ein vorläufiger Bericht zu einzelnen Untersuchungsergebnissen erstellt werden. Die Ergebnisse der Virusanzucht und Typisierung werden in der Regel nicht mitgeteilt, sofern sie nicht der molekularen Typisierung widersprechen.

Die aktuellen Angaben zur Messunsicherheit der einzelnen Untersuchungsverfahren können vom Laboratorium auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden, sofern dies möglich und sinnvoll ist.

4.3 Formblätter

- Einverständniserklärungen für die Entnahme oder Untersuchungen von Proben im Rahmen des Leistungsangebotes des NRZ PE sind nicht erforderlich. Mit seiner Unterschrift bestätigt der Einsender, dass der Patient zur Weitergabe seiner Proben und (personenbezogenen) Daten eingewilligt hat.
- Der Proben-Begleitschein wird im Internet und auf Anfrage zur Verfügung gestellt (Anlage 01): https://www.rki.de/DE/Content/infekt/NRZ/Polio/leistungen/Begleitschein_Diagnostik.pdf?_blob=publicationFile
- Die Abgabe von infektiösem Material darf nur an solche Laboratorien 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, ggf. eine Abgabevergewisserung ausgefüllt werden, die unterschrieben an das NRZ PE zurückgeschickt werden. Das Formblatt Material Transfer Agreement/Abgabe von Krankheitserregern/Vergewisserung § 52 IfSG 21.08.2008 wird zur Verfügung gestellt.

4.4 Hinweise zur Ausfüllung der Formblätter

Jede zu untersuchende Probe muss mit einem möglichst vollständig ausgefüllten Probenbegleitschein eingeschickt werden:

- Daten zum Einsender und Unterschrift des Arztes
- Daten zum Patienten (Patienten-ID) und dessen Anamnese (Symptome, Symptombeginn)
- Daten zur eingesandten Probe und deren Abnahme
- Art der angeforderten Untersuchung

4.5 Informationen für Patienten bzw. Probanden zur Vorbereitung der Probenentnahme

Im Rahmen des Leistungsangebots des NRZ PE sind keine besonderen Informationen erforderlich. Hinweise zum Nachweis von Enteroviren zur Aushändigung an den Patienten/Patientin sind in der Anlage 02 zu finden.

4.6 Anweisungen über die richtige Entnahme von Primärproben

Material	Mindestmenge
Stuhl	1 g (erbsengroße Menge)
Liquor	0,3 ml
Rachenabstrich im Transportmedium	0,3 ml
Serum	0,3 ml
Nukleinsäure (RNA)	20 µl

Die Proben müssen fachgerecht entnommen werden.

Hinweise zur fachgerechten Entnahme von Stuhlproben zur Aushändigung an den Patienten sind in der Anlage 03 zu finden.

Zweckmäßigerweise sollten Proben zur Untersuchung bis zum Versand im Kühlschrank gelagert werden. Ein Versand zum Wochenende sollte vermieden werden; Einsendungen an das NRZ PE müssen gemäß den Bestimmungen zum Versand von medizinischem Untersuchungsmaterial in dreifacher Verpackung erfolgen. Ein gekühlter Versand ist nicht erforderlich.

Bei Transportzeit von über einem Monat werden die Proben nicht untersucht.

4.7 Hinweise zur Kennzeichnung der Primärprobe und weiterer erforderlicher Daten

Jede eingesendete Probe muss eindeutig gekennzeichnet sein (Klarnamen des Patienten vermeiden und Patienten-ID nutzen; wenn vorhanden Labor-Nr. des Einsenders angeben) und eindeutig dem mitgeschickten Einsendeschein zuzuordnen sein. Einsendungen an das NRZ PE müssen gemäß den Bestimmungen zum Versand von medizinischem Untersuchungsmaterial (http://www.rki.de/cln_151/nn_196438/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2005/04_05.html?nnn=true) nach der Norm P650 erfolgen. Diagnostische Proben gehören zur Kategorie B, UN-Nr. 3373, und müssen mit der Bezeichnung „Diagnostische Proben“ versehen sein.

4.8 Anweisungen über besondere Festlegungen hinsichtlich der Probenentnahme und des Probentransports

Eine Probenentnahme (insbesondere Liquor und Rachenabstriche) sollte möglichst während der akuten Krankheitsphase erfolgen (1 bis 2 Tage nach Einsetzen der Symptome). Da die Enteroviren im Stuhl in der Regel bis 2 Wochen nach dem Abklingen der Symptome ausgeschieden werden, kann auch bei diesen Proben ein Virusnachweis erfolgreich sein.

4.9 Entsorgung von bei der Probenentnahme verwendeten Materialien

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

4.10 Aufbewahrungsbedingungen von im Laboratorium untersuchten Proben

Eingesendete Proben zur Untersuchung werden bis zur Analyse gekühlt im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Abschluss der Untersuchung erfolgt eine längerfristige Lagerung von Rückstellproben sowie möglichen Virusisolaten bei -20°C. Das Originalmaterial wird eine Woche nach Abschluss der Untersuchungen verworfen.

4.11 Zusätzliche bzw. Wiederholungsuntersuchungen

Bei begründeter klinischer Fragestellung können nach Absprache zwischen Einsender und NRZ PE zusätzliche Untersuchungen 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, können nicht bearbeitet werden. Weiterhin findet keine Bearbeitung bei fehlender Unterschrift sowie fehlenden Einsender-Informationen statt.

4.13 Rückmeldungen und Reklamationen

Für Anfragen zu Einsendungen, Laborergebnissen, sowie Reklamationen stehen die wissenschaftlichen Mitarbeiter des NRZ PE zur Verfügung. Aufgrund datenschutzrechtlicher Bestimmungen werden personenbezogene Patientendaten nur sechs Monaten gespeichert.

Kontakte:

E-Mail: polio@rki.de

Fax: +49 (0)30 1810754 2617

Dr. med. Sabine Diedrich

Telefon: +49 (0)30 18754 2378

Dr. rer. nat. Sindy Böttcher

Telefon: +49 (0)30 18754 2869

4.14 Gebühren

Gebühren werden vom NRZ PE nicht in Rechnung gestellt.

5 Besondere Sicherheitsmaßnahmen

Alle Proben sind potentiell als infektiös zu betrachten und nach den gängigen Laborvorschriften für den Umgang mit infektiösem Material zu behandeln.

6 Verweise

6.1 Mitgeltende Dokumente

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

PPH_FG15_Enter0-Anl01-Begleitschein (Probenbegleitschein)

PPH_FG15_Enter0-Anl02_Patienteninfo

PPH_FG15_Enter0-Anl03_Probenentnahme-Stuhl

PPH_FG15_Enter0-Anl04_Leistungsnachweis der Verfahren im flexiblen Akkreditierungsbereich

6.2 Ausgewählte Literatur

- Keeren K, Böttcher S, Diedrich S.: Enterovirus surveillance (EVSurv) in Germany. *Microorganisms*. 2021 Sep 22;9(10):2005. doi: 10.3390/microorganisms9102005. PMID: 34683328.
- Krzysztoszek A, Gad B, Diedrich S, Böttcher S, Wiczorek M. Investigation of airport sewage to detect importation of poliovirus, Poland, 2017 to 2020. *Euro Surveill*. 2022 Jun;27(24). PMID: 35713024
- Schneider J, Engler M, Hofmann J, Selinka HC, Jones TC, Drosten C, Diedrich S, Corman VM, Böttcher S. Molecular detection of cosaviruses in a patient with acute flaccid paralysis and in sewage samples in Germany. *Virus Res*. 2021 May;297:198285. PMID: 33548413 .
- Böttcher S, Diedrich S, Keeren K, The Laboratory Network For Enterovirus Diagnostic LaNED. Increased detection of enterovirus A71 infections, Germany, 2019. *Euro Surveill*. 2019 Sep; 24(39). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.39.1900556.
- Knoester M, Helfferich, 2016 EV-D68 AFM Working Group. Twenty-nine Cases of Enterovirus-D68-associated Acute Flaccid Myelitis in Europe 2016: A Case Series and Epidemiologic Overview. *Pediatr Infect Dis J*. 2019 Jan; 38(1):16-21

- Bubba L, Broberg EK, Jasir A, Simmonds P, Harvala H; Enterovirus study collaborators. Circulation of non-polio enteroviruses in 24 EU and EEA countries between 2015 and 2017: a retrospective surveillance study. *Lancet Infect Dis*. 2019 Dec 20. pii: S1473-3099(19)30566-3.
- Hayes A, Diedrich S, Simmonds PA et al. European multi-centre evaluation of detection and typing methods for human enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *J Med Virol*. 2019 Dec 28. doi: 10.1002/jmv.25659.
- Broberg EK, Simone B, Jansa J, The Eu/Eea Member State Contributors. Upsurge in echovirus 30 detections in five EU/EEA countries, April to September, 2018. *Euro Surveill*. 2018 Nov;23(44).
- Harvala H, et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J Clin Virol*. 2018 Feb 6; 101:11-17.
- Weiner V, Niesters B., Diedrich S., Christen H J: Plötzlich gelähmt – die akute schlaffe Myelitis bei Kindern in der Post-Polio-Era, *Pädiatrische Praxis* 2018, Band 90/2, 222-233
- Johannes Hübner, Bernd Kruse, Hans-Jürgen Christen, Jürgen Weidenmann, Viktoria Weiner, Jan-Christoph Schöne-Backe, Sabine Diedrich, Wolfgang Müller-Felber, Gehäuftes Auftreten von akuter schlaffer Myelitis bei Kindern 2016 in Deutschland - Rückkehr von "Polio" ?. *Deutsches Ärzteblatt*, 2017
- Böttcher S, Prifert C, Weißbrich B, Adams O, Aldabbagh S, Eis-Hübinger AM, Diedrich S.: Detection of enterovirus D68 in patients hospitalised in three tertiary university hospitals in Germany, 2013 to 2014. *Euro Surveill*. 2016 May 12;21(19).
- Schubert A, Böttcher S, Eis-Hübinger AM: Two Cases of Vaccine-Derived Poliovirus Infection in an Oncology Ward., *N Engl J Med*. 2016 Mar 31;374(13):1296-8.
- Böttcher S, Obermeier PE, Neubauer K, Diedrich S; the Laboratory Network for Enterovirus Diagnostics. Recombinant enterovirus A71 subgenogroup C1 strains, Germany, 2015. *Emerg Infect Dis*. Vol 22, Oct 2016
- Böttcher S, Neubauer K, Baillot A, Rieder G, Adam M, Diedrich S. Stool screening of Syrian refugees and asylum seekers in Germany, 2013/2014: identification of Sabin like polioviruses. *Int J Med Microbiol*. 2015 Oct; 305(7):601-6.
- Kuryk L, Wiczorek M, Diedrich S, Böttcher S, et al. (2014): Genetic analysis of poliovirus strains isolated from sewage in Poland. *J. Med. Virol*. 86 (7): 1243-1248.

