

ROBERT KOCH INSTITUT



NRZ FÜR SALMONELLEN UND ANDERE ENTERITISERREGER

Präanalytikhandbuch



Deutsche
Akkreditierungsstelle
D-ML-13113-01-06



Deutsche
Akkreditierungsstelle
D-PL-13113-01-06

Inhaltsverzeichnis

1	QM-Dokumentenlenkung.....	3
2	Zweck.....	3
3	Abkürzungen und Definitionen	3
4	Präanalytische Informationen und Hinweise	3
4.1	Allgemeine Informationen und Hinweise.....	3
4.2	Leistungsangebot.....	4
4.3	Hinweise zum Ausfüllen des Probenbegleitscheins	4
4.4	Informationen für Patienten bzw. Probanden zur Vorbereitung der Probenentnahme.....	4
4.5	Anweisungen über die richtige Entnahme von Primärproben	5
4.6	Hinweise zur Kennzeichnung der Primärprobe und weiterer erforderlicher Daten	5
4.7	Anweisungen über besondere Festlegungen hinsichtlich der Probenentnahme und des Probentransports.....	5
4.8	Entsorgung von bei der Probenentnahme verwendeten Materialien	6
4.9	Aufbewahrungsbedingungen von im Laboratorium untersuchten Proben.....	6
4.10	Zusätzliche bzw. Wiederholungsuntersuchungen	6
4.11	Kriterien zur Annahme bzw. Zurückweisung von Primärproben.....	6
4.12	Rückmeldungen und Reklamationen.....	7
4.13	Gebühren.....	7
5	Besondere Sicherheitsmaßnahmen	8
6	Verweise.....	8
6.1	Mitgeltende Dokumente	8
6.2	Literatur	8
6.3	Anlagen.....	8

1 QM-Dokumentenlenkung

Erstellt	12.09.2019, Sabrina Diederich
Geprüft	12.09.2019, Dr. Angelika Fruth
Freigegeben/Gültig ab	16.09.2019, Dr. J. Kl.-Hilmes

2 Zweck

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 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 zur Ausfüllung des/der Anforderungsformulars(e), **Probenbegleitschein**

Verweise auf Formblätter für Einverständniserklärungen,

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 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
NRZ	Nationales Referenzzentrum
RKI	Robert Koch-Institut
ADR	Accord européen relatif au transport international des marchandises Dangereuses par Route
ÖGD	Öffentlicher Gesundheitsdienst

4 Präanalytische Informationen und Hinweise

4.1 Allgemeine Informationen und Hinweise

Leitung: Prof. Dr. Antje Flieger

Vertretung: Dr. Angelika Fruth

Das Nationale Referenzzentrum (NRZ) für Salmonellen und andere Enteritiserreger im Fachgebiet 11 des RKI bearbeitet wichtige, vor allem durch Lebensmittel übertragbare humanpathogene bakterielle Erreger, wie *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* und *Shigella*.

Für die genannten Erreger wird im Rahmen des NRZ an der Entwicklung bzw. Verbesserung diagnostischer Verfahren gearbeitet, die von Qualitätssicherungsmaßnahmen begleitet werden. Außerdem werden über die Primärdiagnostik hinausreichende Differenzierung und Feintypisierung (komplexe Typisierung) zur Aufklärung von epidemischen Prozessen und Infektionsquellen durchgeführt. Epidemiologische Analysen und Bewertungen der Resistenz- und Virulenzentwicklung tragen zum Verständnis von Veränderungen in der Erregerpopulation bei. Weitere Informationen finden sich auf der Website des RKI, [Nationales Referenzzentrum für Salmonellen](#).

4.2 Leistungsangebot

- Beratung zu Fragen der Diagnostik, der epidemiologischen Analyse und der pathogenetischen Relevanz und der Antibiotikaresistenz eingesandter Isolate
- Typisierung mittels phänotypischer Verfahren
- Typisierung mittels DNA-Fragmentmusteranalyse (im Bedarfsfall)
- NGS (Ganzgenomsequenzierung) für die molekulare Surveillance
- Nachweis von Pathogenitätsdeterminanten mittels PCR
- Bestätigung der Speziesdiagnostik in Fällen widersprüchlicher oder unklarer Ergebnisse im Laboratorium des Einsenders
- Führen einer Stammsammlung und Abgabe von Vergleichsstämmen auf Anfrage

4.3 Hinweise zum Ausfüllen des Probenbegleitscheins

Für die Bearbeitung eines jeden eingesandten Stammes wird ein entsprechender Probenbegleitschein des NRZ benötigt. Dieser ist auf der Website des NRZ hinterlegt unter den Rubriken „Leistungen“ und „Hinweise für den Einsender“ (Begleitschein für die Einsendung von Bakterienstämmen zur Typisierung, PDF).

Mit diesem Formular werden sowohl einsender- und patientenbezogene Daten als auch epidemiologisch relevante Daten erfasst. Wichtig sind in diesem Zusammenhang folgende Informationen:

- vollständige Angabe der Adresse des einsendenden Labors
- Geburtsjahr und Geschlecht des Patienten
- Klinische Symptomatik in wenigen Stichpunkten oder Grund der Untersuchungsanforderung (z.B. betriebsärztliche Kontrolle)
- Gruppenerkrankung oder Erkrankung nach Auslandsaufenthalt

Für die weiterführenden Untersuchungen am NRZ sind die Angaben zum eingesandten Stamm von besonderer Bedeutung. Dies beinhaltet:

- Datum der Einsendung im Labor des Einsenders (was eine Einordnung zum Erkrankungsbeginn ermöglicht)
- Datum der Isolierung des Stammes
- Angaben zum Untersuchungsmaterial
- Im Labor des Einsenders bereits durchgeführte Untersuchungen und deren Resultate
- Angaben zur Dringlichkeit

Einsendungen, die ohne oder mit unvollständig ausgefülltem Probenbegleitschein bzw. Mitteilungsbogen am NRZ eingehen, können nicht (siehe 6.12 und 6.14) bearbeitet werden.

4.4 Informationen für Patienten bzw. Probanden zur Vorbereitung der Probenentnahme

Es sind keine besonderen Informationen erforderlich (siehe 6.3).

4.5 Anweisungen über die richtige Entnahme von Primärproben

Die vom NRZ für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger durchgeführten Untersuchungen dienen in erster Linie der Aufklärung von Ausbrüchen und der Darstellung epidemiologischer Zusammenhänge in der Regel lebensmittelasoziierten Infektionen.

Ein solcher Zusammenhang ist zu vermuten, wenn im gleichen Zeitraum mehr als 2 Infektionen mit dem gleichen Erreger (insbesondere in geographisch zusammenhängenden Gebieten) aufgetreten sind.

Besondere Anweisungen zur Entnahme des Primärmaterials werden seitens des NRZ nicht gegeben. Am NRZ erfolgt ausschließlich die Bearbeitung der Isolate, die in den Laboren der Primärdiagnostik vorliegen und dort aus Primärmaterial gewonnen wurden.

4.6.1 Auswahl von Isolaten zur Typisierung

Der Einsender sollte vor dem Versand von Stämmen an das NRZ eine eigene Einschätzung der epidemiologischen Situation vornehmen und den Grund der Einsendung an das NRZ verifizieren. Die Typisierung einzelner Isolate aus einem Infektionsgeschehen/einer Häufung von Erkrankungsfällen hat nur einen geringen Aussagewert.

Deshalb sollten immer mehrere Stämme die in einem möglichen Zusammenhang stehen könnten eingeschickt werden. Eine telefonische Rücksprache und Beratung mit dem NRZ ist bei einer größeren Zahl von Erkrankungsfällen notwendig.

4.6.2 Probenentnahme und – versand

Die im Labor des Einsenders isolierten bakteriellen Erreger sollten gemäß der Neufassung der ADR 2018 (siehe 5.) nach P620/P650 versandt werden. Als Versandart wird seitens des NRZ die Verwendung von Abstrichtupfern mit AMIES als Transportmedium empfohlen. Hierzu sollten von der Kultur auf einem Festmedium (z.B. Endoagar) mehrere Einzelkolonien mittels Tupfer abgenommen und in das Transportmedium des Abstrichbesteck-Röhrchens überführt werden. Ein Kühlversand ist nicht erforderlich, wenn die Transportzeiten nicht deutlich überschritten werden oder die Umgebungstemperaturen unter 37°C liegen.

4.6 Hinweise zur Kennzeichnung der Primärprobe und weiterer erforderlicher Daten

Jeder eingesandte Stamm muss mit einer eindeutigen Kennzeichnung/Proben-Nummer (Labornummer des Einsenders) versehen sein und diese Kennzeichnung muss mit der angegebenen Nummer auf dem beigegefügteten Probenbegleitschein übereinstimmen. Ohne eindeutige Zuordnung der Probe erfolgt keine Bearbeitung durch das NRZ.

Weitere erforderliche Daten, insbesondere bei Verdacht auf ein Ausbruchsgeschehen, siehe auch 6.4 „Hinweise zum Ausfüllen des Probenbegleitscheins“.

4.7 Anweisungen über besondere Festlegungen hinsichtlich der Probenentnahme und des Probentransports

(beinhaltet auch, Versandmaterialien und Hilfsmittel)

Es erfolgt keine routinemäßige 24/7 Bearbeitung der Proben. Die Registrierung durch die Annahme des NRZ findet Montag bis Freitag (außer an Feiertagen) zweimal täglich statt.

Dringende Proben werden nach vorheriger telefonischer Absprache mit den zuständigen Mitarbeitern (siehe 4.13) auch außerhalb o.g. Dienstzeiten angenommen und bearbeitet.

Proben, die mit dem Dienst der Deutschen Post oder ähnlichen Kurierdiensten transportiert werden, sollten nicht bei Außentemperaturen von über 30°C und unter 0°C ohne Rücksprache mit dem NRZ verschickt werden, um Transportschäden zu vermeiden.

Die Verpackung muss nach gefahrgutrechtlichen Kategorien erfolgen, denen die Einstufung der biologischen Stoffe nach Biostoffverordnung von 15.Juli 2013 (BGBl. I S. 2514) zugrunde liegt:

Kategorie A (Viren und Bakterien der Risikogruppen 3 und 4): P620; **werden am NRZ nicht bearbeitet!** Siehe [Liste NRZ und Konsiliarlaboratorien](#)

Kategorie B (Viren und Bakterien der Risikogruppen 2 und 3): P650; alle Erreger des NRZ**

Freigestellte Proben: „P650 light“; alle Proben, bei denen eine minimale Wahrscheinlichkeit besteht, dass sie Krankheitserreger enthalten (Verdachtsproben)

Es gelten die Verpackungsvorschriften der Deutschen Post (IATA-DGR) und die 27. ADR-Verpackungsverordnung vom 25.10.2018 (BGBl. 2018 II S. 443) Kap. 2.2.62 „Klasse 6.2: Ansteckungsgefährliche Stoffe“ in Verbindung mit der 21. RID-Änderungsverordnung vom 5.11.2018 (BGBl. 2018 II S. 494).

Die Verpackung P650 ist dabei 3-fach (Primärgefäß, Polstermaterial und starre Außenverpackung, z. B. Karton) mit rautenförmiger Kennzeichnung UN3373 und Bezeichnung „Biologischer Stoff, Kategorie B“.

Für den Versand der Bakterienisolate und ggf. Mischkulturen für die Typisierung am NRZ muss ein Abstrichbesteck, bestehend aus Tupfer mit Watteträger und Transportröhrchen, ein entsprechendes Transportmedium enthaltend (z.B. AMIES oder AMIES mit Aktivkohle), verwendet werden. **Von einem Universal-Flüssigmedium (gemäß Herstellerangaben für Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen geeignet) als Versandart wird besonders beim Versand von EHEC-Proben dringend abgeraten.**

4.8 Entsorgung von bei der Probenentnahme verwendeten Materialien

Die [Entsorgung](#) von infektiösem Material erfolgt gemäß den Vorschriften und Betriebsanweisungen des RKI.

4.9 Aufbewahrungsbedingungen von im Laboratorium untersuchten Proben

Die Isolierung von den Erregern aus den Primärproben von Patienten oder aus als Infektionsquelle verdächtigen Proben (z.B. Lebensmittel) erfolgt im Labor des Einsenders.

Isolierte Reinkulturen können dort bis zum Versand im Kühlschrank bei 2-8°C aufbewahrt werden. Längerfristige Lagerung ist ebenso möglich. Eine Lagerung zur Stammsammlung sollte in 20% Glycerin als Kryokonservierungsmittel bei -80°C erfolgen.

4.10 Zusätzliche bzw. Wiederholungsuntersuchungen

Die Notwendigkeit von **Wiederholungsuntersuchungen** kann in besonderen klinischen Fällen begründet sein. Sie sollten grundsätzlich erst nach Absprache mit dem NRZ erfolgen.

4.11 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 werden daher zurückgewiesen.

Einsendungen, die ohne ausgefüllten Probenbegleitschein oder Mitteilungsbogen am NRZ eingehen, können nicht bearbeitet werden (siehe 6.14).

Es werden ausschließlich Isolate von Erregern, jedoch keine Originalproben wie Blut, Stuhl, Sputum etc. bearbeitet.

In Einzelfällen kann das Einsenden von sogenannten Mischkulturen notwendig sein, wenn die Gewinnung der Reinkultur im Labor der Primärdiagnostik nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Dies ist auf dem Probenbegleitschein zu vermerken.

4.12 Rückmeldungen und Reklamationen

Für Anfragen, Beschwerden und Reklamationen stehen die wissenschaftlichen Mitarbeiter des NRZ zur Verfügung.

Kontakte:

Email-Postfach des NRZ:

NRZ-Salm-Fg11@rki.de

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Leitung:

Prof. Dr. Antje Flieger

Telefon: +49 30 18754-2522

FAX: +49 30 18754-4207

E-mail: fliegera@rki.de

EHEC, andere *E.coli* Pathovare und Shigellen:

Dr. Angelika Fruth

Telefon: +49 30 18754-4241

FAX: +49 30 18754-4207

E-mail: frutha@rki.de

Dr. Christina Lang

Telefon: +49 30 18754-4324

FAX: +49 30 18754-4207

E-mail: langc@rki.de

Salmonellen:

Dr. Sandra Simon

Telefon: +49 30 18754-4211

FAX: +49 30 18754-4207

E-mail: simons@rki.de

Dr. Eva Trost

Telefon: +49 30 18754-4379

FAX: +49 30 18754-4207

E-mail: troste@rki.de

Campylobacter:

Dr. Sangeeta Banerji

Telefon: +49 30 18754-4382

FAX: +49 30 18754-4207

E-mail: banerjis@rki.de

Listerien:

PD Dr. Sven Halbedel

Telefon: +49 30 18754-4323

FAX: +49 30 18754-4207

E-mail: halbedels@rki.de

Yersinien/Stammsammlung :

Dr. Philipp Auraß

Telefon: +49 30 18754-4224

FAX: +49 30 18754-4207

E-mail: aurassp@rki.de

Miriam Hiller

Telefon: +49 30 18754-4460

FAX: +49 30 18754-4207

E-mail: hillerm@rki.de

4.13 Gebühren

Typisierungen von Salmonellen zur Aufklärung von Infektketten im Auftrag des ÖGD werden ohne Erhebung von Kosten durchgeführt, wenn in Verbindung mit den eingesandten Stämmen alle für das NRZ relevanten Informationen gemäß Probenbegleitschein mitgeteilt wurden.

5 Besondere Sicherheitsmaßnahmen

Laborordnung und Betriebsanweisungen des RKI

6 Verweise

6.1 Mitgeltende Dokumente

- QMH des RKI und sämtliche Methoden-SOP, FLT und VAW werden in aktueller und autorisierter Fassung im NRZ für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger vorgehalten und beinhalten Verfahrensvorschriften zur „internen“ Präanalytik. Diese können bei Bedarf und nach Absprache mit dem Leiter und dem Qualitätsmanagementbeauftragten des NRZ eingesehen werden.
- SOP_SALM_probeneingang incl. Anlagen (Begleitschein, Auftragsprüfung, Ablauf Annahme)

6.2 Literatur

- E. Hauser, E. Tietze, R. Helmut, E. Junker, K. Blank, R. Prager, W. Rabsch, B. Appel, A. Fruth, B. Malorny (2010). Salmonella enterica serovar 4,[5],12:i:- contaminated pork is an emerging foodborne health risk for humans. Appl. Environ. Microbiol. 76(14):4601-10.
- Prager, R., Rabsch, W., Streckel, W., Voigt, W., Tietze, E. and Tschäpe, H. (2003). Molecular properties of Salmonella enterica serotype Paratyphi B distinguish between ist systemic and ist enteric pathovars. J. Clin. Microbiol. 41:4270-4278.
- Hunter, S.B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M.A., Van Duynne, M.S., Kubota, K., Graves, L., Wrigley, D., Barrett, T. and E. Ribot (2005). Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. J. Clin. Microbiol. 43:1045-1050
- Grimont PAD, Weill FX: WHOCC-Salm: Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars. 9th Edition. Paris, 2007
- Rabsch, W.: Salmonella Typhimurium phage typing for pathogens. In: Methods in Molecular Biology. Salmonella and Protocols. Eds. H. Schatten, A. Eisenstark. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2007, 177-211

6.3 Anlagen

Die Anlagen enthalten Informationen zu den regelmäßig durchgeführten Ringversuchen am NRZ und den relevanten von den verschiedenen Bereichen in Abstimmung mit den internationalen Referenzzentren genutzten Bakterienstämmen für Vergleichsanalysen.

PPH_SALM_Leistungen_FLT-Anl01_ringversuche

PPH_SALM_Leistungen_FLT-Anl02_listereferenzstämme

