

# Standard Arbeitsanweisung (SAA) für die ungezielte EBOV Diagnostik außerhalb von BSL4 V1.0

(nach einer SAA des Instituts für Virologie Ulm. Die vorliegende SAA dient als  
Muster und soll die Mindestanforderungen für sicheres Arbeiten darstellen.  
Demzufolge sind je nach den räumlichen Gegebenheiten und Ausstattung im  
Labor Modifikationen, die hinsichtlich der Sicherheit gleichwertig sind möglich.  
Dies betrifft naturgemäß insbesondere die Durchführung der Arbeitsschritte  
nach Inaktivierung)

## Inhalt

1. Zweck der Untersuchung
2. Grundlage und Methode des für die Untersuchungen angewendeten Verfahrens
3. Leistungsmerkmale
4. Art der Probe (z. B. Plasma, Serum, Urin)
  - 4.1 Probenmaterial
  - 4.2 Volumen bei Blutproben
5. Probennahme
6. Art des Behälters und der Zusatzstoffe
  - 6.1 Art des Behälters
  - 6.2 Zusatzstoffe
7. Erforderliche Ausrüstung und Reagenzien sowie Art und Qualität
8. Umwelt- und Sicherheitsmaßnahmen
9. Kalibrierverfahren (metrologische Rückführbarkeit)
10. Schritte im Arbeitsablauf
  - 10.1 Präanalytik
  - 10.2 Probenvorbereitung
    - 10.2.1 Persönliche Schutzmaßnahmen
    - 10.2.2 Probenentnahme
  - 10.3 Lyse und Inaktivierung
  - 10.4 PCR-Ansatz
11. Verfahren der Qualitätssicherung
12. Störungen (z. B. Lipämie, Hämolyse, Bilirubinämie, Drogen) und Kreuzreaktionen
  - 12.1 Störfaktoren
  - 12.2 Kreuzreaktionen
13. Ergebnisberechnung und Messunsicherheit
14. Klinische Entscheidungswerte
15. Berichtspflichtiges Intervall für die Untersuchungsergebnisse
16. Anweisungen für Messungen außerhalb des Messbereichs
17. Alarmierende oder kritische Werte
18. Befundinterpretation durch das Laboratorium
19. Mögliche Ursachen von Abweichungen
20. Verweise
21. Anlagen

## **1. Zweck der Untersuchung**

Der Ausschluss einer Infektion mit Marburg- oder Ebolaviren. Ziel ist es, die größtmögliche Sicherheit des medizinischen Personals sicherzustellen, die rasche weitere Diagnostik und Therapie bei Patienten zu ermöglichen und den größtmöglichen Schutz vor Infektionsketten sicherzustellen.

Wir führen daher nur die Ausschlussdiagnostik durch bei Fällen, die **nicht** vollständig die RKI-Kriterien für einen begründeten Verdacht auf eine Ebolavirus-Erkrankung erfüllen ([http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/Ebola/Ebola\\_node.html](http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/Ebola/Ebola_node.html)). Bei einem **begründeten** Ebolavirus-Verdachtsfall wird die Probe sofort an eine dafür benannte Untersuchungsstelle (z.B. BNI/Hamburg oder Regierungspräsidium/Landesgesundheitsamt Stuttgart) geschickt.

## **2. Grundlage und Methode des für die Untersuchungen angewendeten Verfahrens**

Siehe Anlage 2 RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0

## **3. Leistungsmerkmale**

Siehe Anlage 2 RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 (Altona)

## **4. Art der Probe (z. B. Plasma, Serum, Urin)**

### **4.1 Probenmaterial:**

EDTA-Blut, Plasma, Serum

### **4.2 Volumen bei Blutproben:**

Eine 7,5 ml Monovette; jedoch mind. 300 µl Serum/Plasma

Hinweis: Alternative Materialien und Probenvolumen können nach Absprache mit der Laborleitung verwendet werden.

## **5. Probennahme**

Die Probenentnahme wird durch das zuständige Personal auf der Station geregelt (siehe Intranet Ulm „[Medizin/Pflege](#)“ und „[Seuchalarmplan des Universitätsklinikums Ulm beim Auftreten hochkontagiöser, lebensbedrohlicher Erkrankungen](#)“), aber im Gegensatz zu anderen Proben von einem autorisierten Mitarbeitern der Virologie abgeholt.

## **6. Art des Behälters und der Zusatzstoffe**

### **6.1 Art des Behälters**

EDTA – Monovette; Serum – Monovette mit dichter und bruchsicherer Umverpackung in einem autoklavierbaren Stahltransportbehälter (innerbetrieblicher Transport Ulm).

## 6.2 Zusatzstoffe

EDTA

Hinweis: Alternative Behälter und Zusatzstoffe dürfen erst nach Absprache mit der Laborleitung Virologie verwendet werden.

## 7. Erforderliche Ausrüstung und Reagenzien sowie Art und Qualität

Siehe Anlage 1 RealStar<sup>®</sup> Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0

## 8. Umwelt- und Sicherheitsmaßnahmen

Nur zuvor gesondert eingewiesenes Personal darf an der Untersuchung teilnehmen. Die Dokumentation der Einweisung erfolgt in der als Anlage 3 angefügten Tabelle.

Grundsätzlich gilt, dass die Arbeiten nur bei **gleichzeitiger** ständiger Anwesenheit eines eingewiesenen Mitarbeiters/Mitarbeiterin und eines akademischem Mitarbeiters (derzeit in Ulm: Mertens, Michel, Schubert) erfolgen dürfen.

Nach telefonischer Anmeldung und Annahme der Untersuchung durch die Leitung der virologischen Diagnostik wird der Raum 3116 (S3) für alle anderen Mitarbeiter gesperrt. Die entsprechenden Warnschilder sind im Raum 3101 hinterlegt. Die präanalytischen Arbeiten bis zur Nukleinsäureelution werden im Raum 3116 (S3) durchgeführt, die PCR kann im S2-Bereich (3102) erfolgen.

Notfallgerät 1: Tischzentrifuge (aus Raum 3102 – „Sequenzierplatz“)

Notfallgerät 2: Laminar-Flow

Notfallgerät 3: PCR-Gerät Mx3005P („Willi“)

Sämtliche Instrumente/Geräte, die in Kontakt mit dem Probenmaterial gekommen sind bzw. sein könnten (z.B. die Laminar Flow und alle Instrumente in der Laminar Flow), müssen umgehend nach Verschluss der Original-Probenabnahme-Monovette und Entnahme sowie Inaktivierung der Untersuchungsprobe desinfiziert werden. Die Desinfektion erfolgt nach Hygieneplan (Oberflächenbehandlung mit z.B. Inzidine 3% (Hatztabs).und später Handflächen/Haut mit Sterillium<sup>®</sup> Virugard).

**Bis zur dokumentierten Freigabe durch die Leitung der virologischen Diagnostik dürfen die entsprechenden Geräte/Instrumente/Materialien nicht für andere Arbeiten eingesetzt werden.**

**Bis zur dokumentierten Freigabe durch die Leitung der virologischen Diagnostik dürfen die Räume 3116 und 3102 nicht von anderen Mitarbeitern betreten werden.**

Sämtliche Einmalartikel und alle Materialien, die nicht desinfiziert werden können, werden zum Autoklavieren in einem gesonderten, fest verschließbaren Abfallbehälter unter der sterilen Werkbank gesammelt.

#### **Grundsätzlich gilt:**

Eine erfolgreiche Desinfektion kann nur durch die Leitung der virologischen Diagnostik bescheinigt werden.

### **9. Kalibrierverfahren (metrologische Rückführbarkeit)**

Entfällt

### **10. Schritte im Arbeitsablauf**

#### **10.1 Präanalytik**

**Hinweis:** Probenversand-/annahme erfolgt nur nach Absprache mit Prof. Dr. Th. Mertens (Handy: 0179-4754055) oder Prof. Dr. D. Michel (Dienst-Handy: 65107; Notfallhandy 0173-3492493). Es erfolgt zusätzlich immer eine interne Absprache unter der Leitung der virologischen Diagnostik (Ärztlicher Direktor, Laborleiter & Stellvertreter). Das Material wird immer durch einen autorisierten Mitarbeiter der Virologie auf der Station entgegengenommen.

1) Die vom Patienten entnommene, verschlossene Probe (EDTA-/Serum-Monovette) wird zunächst dort in ein mit 3% Incidin getränktes Tuch vollständig eingewickelt und anschließend in einen verschließbaren Plastik-Transportbehälter überführt (s.o.). Der Transportbehälter wird in der Patientenzimmer-Schleuse von außen noch einmal desinfiziert und an eine zuvor eingewiesene Person der virologischen Diagnostik übergeben.

#### **10.2 Probenvorbereitung**

##### **10.2.1 Persönliche Schutzmaßnahmen (jeweils Varianten A/B je nach Verfügbarkeit)**

A. Einmal-Ganzkörper-Schutzanzug, doppelte Handschuhe mit Ärmelschutz

B. Flüssigkeitsabweisender Einmal-OP-Mantel, Einmal-Gummihandschuhe mit Klebeband fixieren, darüber Rückschlusskittel (blauer/grün Kittel) und mit Klebeband fixierte, lange Gummihandschuhe.

Handschuhe grundsätzlich AQL 0,65

OP-Haube

A. Transportables Atemschutzgerät

B. Gesichtsschild oder Schutzbrille und Atemmaske FFP 3.

A. Autoklavierbare OP Clogs

B. Doppelte Einmal-Plastik-Überschuhe

Die zweite Person trägt ebenfalls Schutzkleidung und assistiert der probenbearbeitenden Person beim Ablegen der Schutzkleidung, ohne Berührungen der Kleidungsinnenflächen. Die zweite Person muss den gesamten Arbeitsablauf genau beobachten und ggf. für sofortige Desinfektion sorgen.

Vor Beginn der Arbeiten unter der Laminar wird mindestens ein weiteres Paar Einmalhandschuhe übergezogen (nicht fixiert).

Das obere Handschuhpaar ist stets unter der Laminar ausziehen, bevor die Hände aus der Werkbank genommen werden (→ Nach Ausziehen der oberen („vorletzten“) Handschuhe darf nichts mehr unter der Laminar berührt werden!)

### **10.2.2 Probenentnahme zur Extraktion**

Sämtliche Arbeiten im Raum 3116 (S3) an der eingeschalteten Laminar Flow (Notfallgerät 2) durchführen.

Die Nukleinsäureextraktion erfolgt im S3-Bereich.

Metallbehälter für Abwurf (Pipettenspitzen usw.) mit Desinfektionsmittel und ein neues Tuch mit Desinfektionsmittel für die Monovette ebenfalls unter der Laminar bereit stellen

Plastik-Transportbehälter aus der Transportbox nehmen und in der Laminar Flow abstellen. (→ Transportbox mit 3% Incidine desinfizieren! und nach Abschluss der Arbeiten autoklavieren)

Transportbehälter öffnen und die Monovette entnehmen. Plastik-Transportbehälter in der Autoklavierbox abstellen

Monovette aus Desinfektionstuch nehmen und senkrecht stehen lassen bis aufgrund der spontanen Blutsenkungsreaktion ausreichend Plasma für eine Probennahme sichtbar ist.

### **10.3 Lyse und Inaktivierung**

- jeweils 545 µl AVL in 2x 1,5 ml Reaktionsgefäß („Eppi“ A und B) vorlegen 10 µl Carrier RNA und 5 µl IC hinzu pipettieren
- Zugabe von  
Eppi **A**: 126 µl H<sub>2</sub>O , dann 14 µl Plasma  
Eppi **B**: 140 µl Plasma

Hinweis: Mischen der Probe mit AVL-Puffer durch 5x langsam auf- und ab pipettieren. Vermeiden von Aerosolbildung und Kontamination des Deckels!!!!

- Die verwendete Pipettenspitze wird vorsichtig in den mit abgenommenem Deckel bereitstehenden Metallbehälter mit Desinfektionsmittel entsorgt. Dieser Behälter wird abschließend unter der Flow in den Behälter für den Autoklaven platziert.
- Monovetten-Deckel nicht ablegen sondern Monovette wieder verschließen und erneut in mit Desinfektionsmittel getränktes Tuch einwickeln.

Achtung: Die Außenseiten, der Deckel und der obere Rand der Innenseiten des Reaktionsgefäßes dürfen durch die Pipettenspitze nicht kontaminiert werden! Bei Kontaminationsgefahr Analyse neu ansetzen und zu verwerfendes Eppi vorsichtig in den bereitstehenden Metallbehälter mit Desinfektionsmittel (s.o.) geben!

- 10 min bei RT inkubieren („Eppi-Deckel“ nicht schließen, um eine Kontaminationsgefahr vom Deckelrand zu vermeiden)
- Zugabe von 560 µl 100% Ethanol (Inaktivierung!) Mischen des Ansatzes durch 5x langsam auf- und ab pipettieren. Vermeiden von Aerosolbildung!!!!
- „Eppi-Deckel“ schließen und gesamtes Reaktionsgefäß mit 3% Incidin einsprühen. Anschließend in ein mit Desinfektionsmittel-getränktes Tuch einwickeln und mindestens 5` stehen lassen.

Hinweis: Nach der Zugabe von Ethanol zum Aufschlusspuffer kann von einer vollständigen Inaktivierung der Viruspartikel ausgegangen werden. Die Probe gilt somit nicht mehr als infektiös und für die anschließenden Arbeitsschritte kann die Probe nach erneuter äußerer Desinfektion aus dem S3 Labor ausgeschleust werden.

### **Nukleinsäureextraktion**

- 1-3 sec zentrifugieren bei 1000-3000 rpm
- 630 µl auf Säule laden
- 1 min 8000 rpm zentrifugieren
- Säulen in neue 2 ml Eppis, Durchfluss verwerfen
- restliches Probenvolumen auf Säule laden
- 1 min 8000 rpm zentrifugieren
- Säulen in neue 2 ml Eppis, Durchfluss verwerfen
- 500 µl AW1 auf Säule laden
- 1 min 8000 rpm zentrifugieren
- Säule in neue 2 ml Eppis, Durchfluss verwerfen
- 500 µl AW2 auf Säule laden

- 3 min 13000 rpm zentrifugieren
- Säule in neues 1,5 ml Eppi
- 10 min 13000 rpm zentrifugieren („Altona-Protokoll“)
- 50 µl RNA-freies Wasser auf Säule laden
- 1 min bei RT stehen lassen
- 1 min 8000 rpm zentrifugieren
- Eluat (Durchfluss) auf Eis stellen.

**Achtung:** Es muss sichergestellt werden, dass vor der erneuten Verwendung eine ausreichende Desinfektion und sichere Entsorgung der Verbrauchsmaterialien (autoklavieren) erfolgt.

Die Endreinigung der Werkbank sollte durch den verantwortlichen Akademiker erfolgen bzw. unter direkter Aufsicht.

Bis zur Freigabe wird ein **Warnschild:**

„Infektionsgefahr, Gerät darf bis zum Abschluss der Dekontamination nicht benutzt werden! Freigabe nur durch Laborleitung!“

- RNA auf Eis (z.B. bis Abschluss der Analyse) oder bis zu einer Woche bei 4° C im Kühlschrank lagern; dann lagern bei -70°C)

#### **10.4 PCR-Ansatz**

Ansetzen der Filo-PCR mittels Altona-Testkit im Prä-PCR. Das Zyklus-Programm ist auf dem Mx3005P im Raum 3101 unter „Ebola-Marburg-RT-PCR“ abgespeichert. Läufe im Ordner „Notfall-PCR“ ablegen.

**Reaktionsvolumen: 30 µl**

Pipettierschema:

Mastermix:

**Pro Ansatz:**

5 µl Mastermix A

15 µl Mastermix B

**→Mindestansatz-Master: 1 Patient**

30 µl Mastermix A

90 µl Mastermix B

Pipettierschema für einen Patienten:

A. 20 µl Mastermix A/B

10 µl **Patienten** Nukleinsäure „Eppi A“ (14 µl Ausgangs-Patientenmaterial)

B. 20 µl Mastermix A/B

10 µl **Patienten** Nukleinsäure „EppiB“ (14 µl Ausgangs-Patientenmaterial)

C. 20 µl Mastermix A/B

10 µl **negative** Kontrolle

D. 20 µl Mastermix A/B

10 µl positive Kontrolle **MarV**

E. 20 µl Mastermix A/B

10 µl positive Kontrolle **EboV**

## **11. Verfahren der Qualitätssicherung**

Siehe Anlage 1 RealStar<sup>®</sup> Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0

## **12. Störungen (z. B. Lipämie, Hämolyse, Bilirubinämie, Drogen) und Kreuzreaktionen**

### **12.1 Störfaktoren:**

Heparin

### **12.2 Kreuzreaktionen:**

Keine bekannt

## **13. Ergebnisberechnung und Messunsicherheit**



Ein Ergebnis wird als „positiv“ gewertet, wenn der ct-Wert einen Wert <37 aufweist

Ein Ergebnis wird als „negativ/unter Nachweisgrenze“ gewertet, wenn für die Probe kein ct-Wert ermittelt werden kann („not detected“)

Ein Ergebnis wird als grenzwertig gewertet, wenn der ermittelte ct-Wert einer Probe einen Wert von 37 und größer aufweist.

Hinweis: Voraussetzung! Die PCR wurde anhand der mitgeführten Kontrollen zuvor als valide eingestuft.

#### 14. Klinische Entscheidungswerte

Variante	Fam- („EboV“)-Kanal	Cy5- („MabV“-Kanal	Joe-(IC)-Kanal	Interpretation
1	positiv	negativ	positiv*	Ebolavirus-RNA nachweisbar. Es liegt eine Infektion vor.
2	negativ	positiv	positiv*	Marburgvirus-RNA nachweisbar. Es liegt eine Infektion vor.
3	negativ	negativ	positiv	Keine Virus-RNA nachweisbar. Es liegt keine Infektion vor. je nach Symptombeginn: Kontrolle erforderlich.
4	negativ	negativ	negativ	Nicht auswertbar

\* Ein positiver Ebolavirus-/ Marburgvirus-RNA-Nachweis, ist auch dann valide wenn die interne Kontrolle (IC) negativ ist. Eine Unterquantifizierung der Erregerkonzentration kann jedoch dann nicht ausgeschlossen werden.

#### 15. Berichtspflichtiges Intervall für die Untersuchungsergebnisse

Entfällt

#### 16. Anweisungen für Messungen außerhalb des Messbereichs

Entfällt

#### 17. Alarmierende oder kritische Werte

Wegen der besonderen Gefährdungslage müssen alle Ergebnisse der Filovirus-PCR direkt vom validierenden Akademiker an den behandelnden Arzt berichtet werden.

Wird das PCR-Ergebnis, als „**positiv**“ oder „**grenzwertig/Kontrolle erforderlich**“ gewertet, bedingt dies, dass der „Seuchenalarmplan“ aktiviert wird.

#### **18. Befundinterpretation durch das Laboratorium**

A) Ergebnis positiv: Aktive Filovirus-Infektion

B) Ergebnis negativ:

Kein Hinweis auf eine aktive Infektion (frühe Infektionsphase nicht ausgeschlossen). Kontrolle nach 48h empfohlen.

Achtung: Falls der Symptombeginn <72 Stunden zurückliegt muss die PCR 72h nach Symptombeginn wiederholt werden.

C) Ergebnis grenzwertig:

Ein grenzwertiges PCR-Ergebnis spricht am ehesten für eine an der Nachweisgrenze liegende Viruslast in der untersuchten Probe. DD: unspezifische Reaktion.

#### **19. Mögliche Ursachen von Abweichungen**

Siehe Anlage 1 RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0

#### **20. Verweise**

RKI-Homepage: [http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/Ebola/Ebola\\_node.html](http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/Ebola/Ebola_node.html) Konsiliarlaboratorium für Filoviren, Institut für Virologie der Universität Marburg <http://www.uni-marburg.de/fb20/vrologie/diagnostik>

WHO-Ebola-Seite: <http://www.who.int/csr/disease/ebola/en/>

Seuchenalarmplan des Universitätsklinikums Ulm

#### **21. Anlagen**

Anlage 1: Erstverdacht auf Ebolafieber- Flusschema RKI)

Anlage 2: Beipackzettel -RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0

Anlage 3: Ebola- Notfalldiagnostik: Liste eingewiesener Mitarbeiter

Anlage 4: Protokollblatt