



Raccomandazioni per il corretto prelievo e conservazione del campione biologico. Diagnosi di conferma di Covid-19

**Task Force ISS-DMI, Dipartimento Malattie Infettive
Istituto Superiore di Sanità**

***Alessandra Ciervo
ISS-Roma 25-03-2020***



Prelievo e conservazione del campione biologico.

Campioni biologici per la diagnosi di Covid-19

Tampone faringeo

Tampone nasale

Tampone combinazione naso/faringeo

Lavaggio bronco-alveolare

Aspirato endotracheale

Espettorato



Raccogliere in un contenitore sterile a tenuta ermetica utilizzando le precauzioni per la protezione da aerosol

Personale Sanitario DPI per il prelievo

- camice monouso impermeabile con manica lunga
- guanti monouso
- mascherina facciale filtrante tipo FFP2 o FFP3
- protezione per gli occhi (occhiali a maschera o schermo facciale)
- cuffia monouso per i capelli.



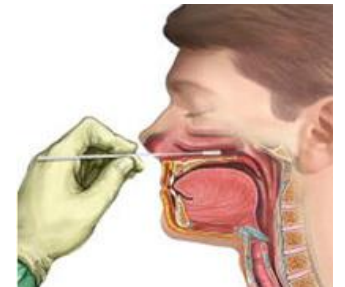
Tampone faringeo

- Invitare il paziente a piegare la testa all'indietro e aprire bene la bocca;
- se necessario, usare un abbassalingua sterile;
- inserire il tampone tra i pilastri tonsillari e dietro l'ugola;
- strofinare le zone tonsillari
- evitare che il tampone si contamini con la saliva, evitando il contatto del tampone con la lingua, le guance o le arcate dentarie.



Tampone nasale

- Invitare il paziente ad assumere una posizione eretta con la testa leggermente inclinata all'indietro;
- inserire il tampone nella narice e spingerlo lungo la cavità nasale per circa 2,5 cm in modo da raggiungere la parte posteriore del rinofaringe.
- ruotarlo delicatamente perché si ricopra abbondantemente con il secreto nasale
- ripetere eventualmente la manovra nell'altra narice.



Una volta terminato il tampone il bastoncino va inserito nel terreno di trasporto



Per praticità **I TAMPONI** di uno stesso soggetto possono essere stemperati e raccolti nella stessa provetta contenente terreno di trasporto per virus

Si possono utilizzare Kit di raccolta pronti all'uso contenenti terreno di trasporto (provette da 3ml)

In alternativa utilizzare tamponi preferibilmente in poliestere tipo dracon e provette a chiusura ermetica (tappo a vite) contenenti 2/3 ml di terreno per colture cellulari tipo MEM o RPMI, o PBS, oppure soluzione fisiologica.





Etichettatura

Su ogni campione deve essere apposta un'etichetta riportante

1. nome cognome e data di nascita del paziente
2. data del prelievo
3. tipo di campione

Conservazione

I campioni devono essere inviati immediatamente al laboratorio o in alternativa possono essere conservati in frigo (+4°C) per un tempo < 48 ore

Se il campione non può essere processato entro 48 ore va conservato a -80°C

Modalità di confezionamento e spedizione

Materiale biologico, categoria B codice UN3373:

- triplo imballaggio, formato da: un imballo esterno, uno intermedio ed uno interno a tenuta stagna, in modo da impedire la fuoriuscita del contenuto anche in caso di incidente durante il trasporto.
- Il pacco deve essere provvisto di un'etichetta che riporti i dati del mittente e del destinatario (nominativo, indirizzo, telefono, e-mail). Inserire le schede dei pazienti opportunamente compilate.
- Trasporto refrigerato (utilizzando i siberini) o ghiaccio secco per campioni congelati.



Diagnosi di conferma di Covid-19

Laboratorio Nazionale di Riferimento per Covid-19 presso l'ISS

I campioni vengono registrati con protocollo interno ed identificati con un codice alfanumerico



Sistema sorveglianza integrata ISS

Laboratorio	Codice del tampone	Alfanumerico
	data prelievo	gg/mm/aaaa
	laboratorio Regionale che ha fatto analisi risultata positiva	Lista Laboratori riferimento regionale + altro
	Sequenza genomica effettuata	Si/No
	se si specificare se inviata ad ISS	Si/No
	data conferma ISS	gg/mm/aaaa
	Conferma ISS	Si/No

I campioni vengono aliquotati. Una parte viene utilizzata per la conferma diagnostica mentre le altre vengono conservate per ulteriori indagini molecolari o virologiche.

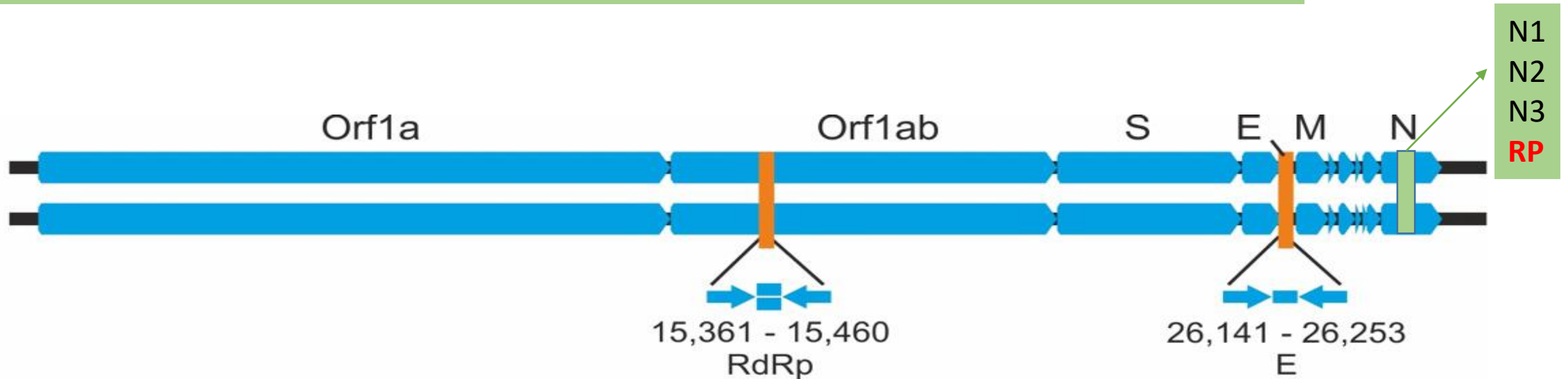


La prima fase dell'analisi consiste nell'estrazione e purificazione degli acidi nucleici (RNA) tramite kit commerciali.

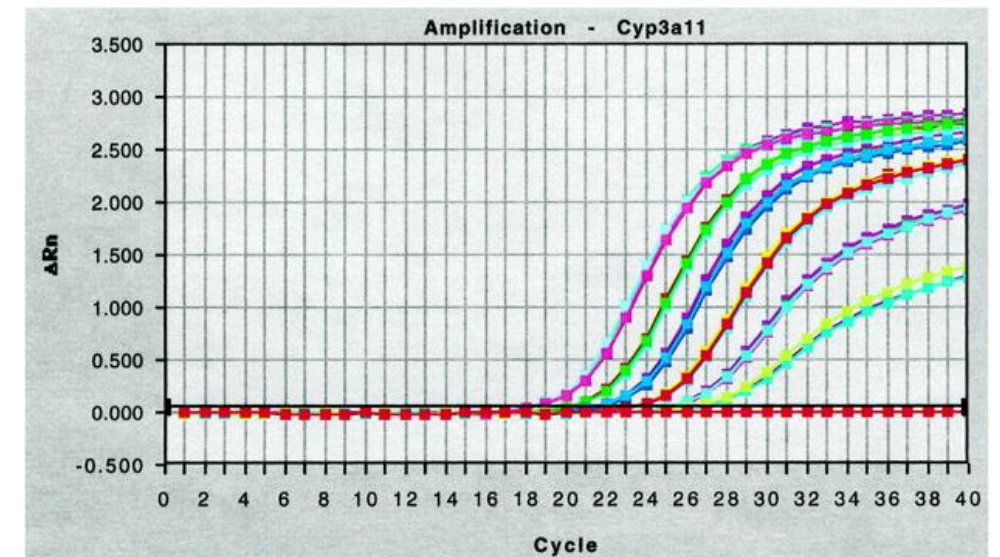
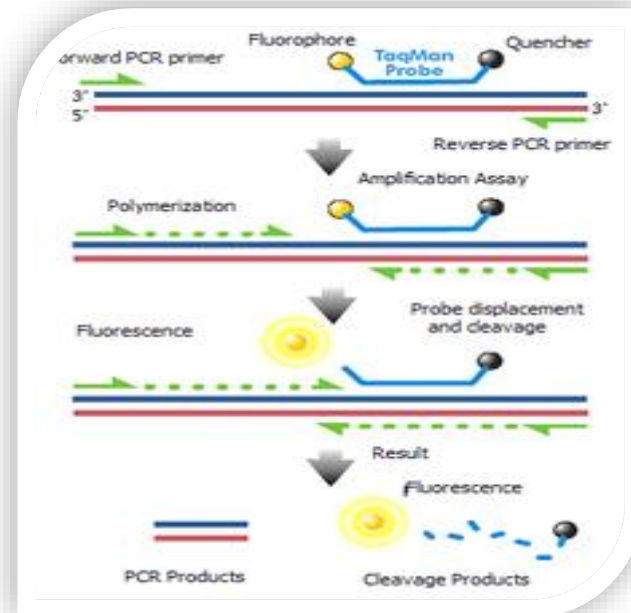
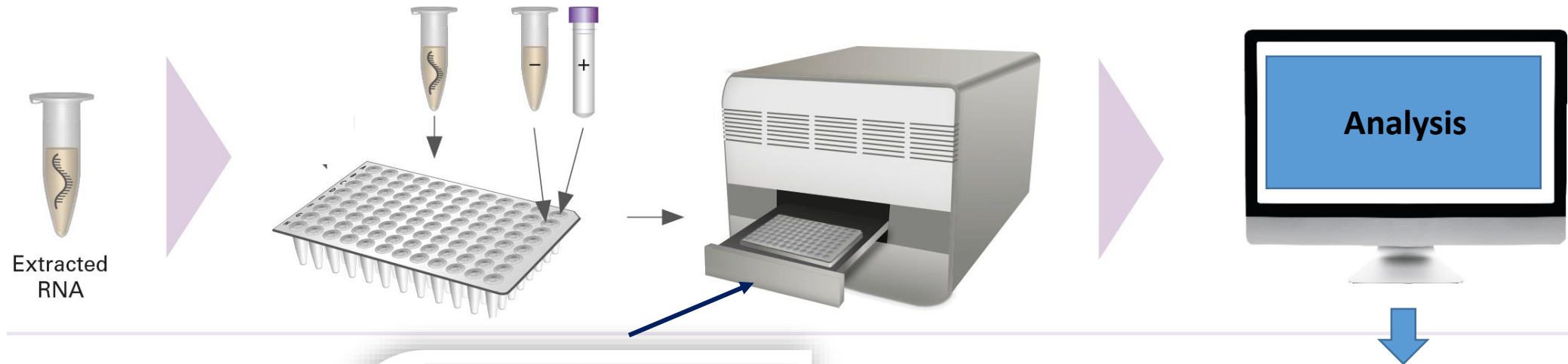
La seconda fase consiste nell'individuazione della presenza dell'RNA virale di Sars-CoV-2.

Protocollo Corman et al (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2)

Protocollo US CDC (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-detection-instructions.html>)



Allestimento del saggio molecolare Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction





ABI ViiA7 Real Time PCR System



7500 Real-Time PCR System



Stratagene MX3005P



CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System



LightCycler 480



Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases

Interim guidance
19 March 2020



0009774-20/03/2020-DGPRE-DGPRE-P



Ministero della Salute

DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE SANITARIA
UFFICIO 5 PREVENZIONE DELLE MALATTIE TRASMISSIBILI E PROFILASSI INTERNAZIONALE

OGGETTO: Annullamento e sostituzione della Circolare del Ministero della Salute n. 0009480 del 19 marzo 2020 “COVID-19: rintraccio dei contatti in ambito di sorveglianza sanitaria e aggiornamento delle indicazioni relative alla diagnosi di laboratorio di casi di infezione da SARS-CoV-2.”

- I laboratori di riferimento regionali devono svolgere funzione di coordinamento per i laboratori aggiuntivi identificati dalle regioni a effettuare la diagnosi SARS-CoV-2, fornendo il supporto e le indicazioni necessarie secondo specifici piani regionali. Quale criterio per la valutazione delle capacità diagnostiche per infezione da COVID-19 dei nuovi laboratori arruolati dalle regioni si ritiene sufficiente un riscontro dei risultati di diagnosi riguardanti i loro primi 5 campioni positivi e 10 campioni negativi con quanto rilevato presso i laboratori di riferimento regionali.
- Laddove vi sia ancora una limitata trasmissione di COVID-19, la conferma della diagnosi di campioni positivi può essere effettuata dallo stesso laboratorio che esegue la diagnosi SARS-CoV-2 mediante un test RT-PCR che utilizzi un secondo gene target di SARS-CoV-2.
- In aree con diffusa trasmissione COVID-19 è considerata sufficiente quale diagnosi di laboratorio la positività al test RT-PCR rilevata su un singolo gene target di SARS-CoV-2. Test di conferma devono essere effettuati solo per i campioni in cui il risultato è difficilmente interpretabile o il ciclo soglia in RT-PCR è maggiore di 35. In questi casi si raccomanda di ripetere il test su una nuova raccolta di campione.

- Viene richiesto il solo invio di un numero rappresentativo di campioni clinici al Laboratorio di Riferimento Nazionale in ISS, previo accordo, al fine di monitorare l'epidemiologia molecolare di SARS-CoV-2.
- Tutti i campioni risultati positivi SARS-CoV-2 in pazienti deceduti devono essere conservati congelati a -80°C presso la struttura che effettua il prelievo e/o la diagnosi di laboratorio e inviati successivamente al Laboratorio di Riferimento Nazionale in ISS su espressa richiesta.

Si rappresenta, inoltre, che, nei laboratori autorizzati per le analisi dei tamponi, la presentazione di campioni afferenti a personale sanitario dovrà ottenere priorità assoluta e la comunicazione del risultato dovrà avvenire in un arco di tempo massimo di 36 ore.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Task Force ISS-DMI-Gruppo di coordinamento

Giovanni Rezza

Paola Stefanelli

Maria Rita Castrucci

Alessandra Ciervo

Flavia Riccardo

Antonino Bella

Patrizio Pezzotti