



Istituto Superiore di Sanità

Rapporto ISS COVID-19 • n. 11/2020

Raccomandazioni per il corretto prelievo, conservazione e analisi sul tampone oro/nasofaringeo per la diagnosi di COVID-19

Gruppo di Lavoro ISS Diagnostica e sorveglianza microbiologica
COVID-19: aspetti di analisi molecolare e sierologica

versione 7 aprile 2020

Raccomandazioni per il corretto prelievo, conservazione e analisi sul tampone oro/nasofaringeo per la diagnosi di COVID-19

Versione del 7 aprile 2020

Gruppo di Lavoro ISS Diagnostica e sorveglianza microbiologica COVID-19: aspetti di analisi molecolare e sierologica

Paola Stefanelli, Dipartimento Malattie infettive, Istituto Superiore di Sanità (Coordinatore GdL)
Alessandra Ciervo, Dipartimento Malattie infettive, Istituto Superiore di Sanità
Maria Capobianchi, UOC Laboratorio di Virologia, INMI "L. Spallanzani", IRCCS, Roma
Concetta Castilletti, UOC Laboratorio di Virologia, INMI "L. Spallanzani", IRCCS, Roma
Maria Carla Re, Dipartimento Medicina Specialistica Diagnostica e Sperimentale, Università di Bologna
Paola Affanni, Centro di Riferimento per la Sorveglianza Virologica,
Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma
Maria Eugenia Colucci, Centro di Riferimento per la Sorveglianza Virologica,
Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma
Andrea Crisanti, Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova
Andrea Orsi, UO Igiene Ospedale Policlinico San Martino IRCCS, Genova
Giancarlo Icardi, Dipartimento Scienze della Salute, Università di Genova
Fabio Tramuto, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico "Giaccone" Palermo
Giada Rossini, Microbiologia e Virologia, Policlinico Sant'Orsola Malpighi, Bologna
Fausto Baldanti, Dipartimento Medicina Diagnostica e Microbiologia, San Matteo, Pavia
Luigi Bertinato, Segreteria Scientifica Presidenza, Istituto Superiore di Sanità

Istituto Superiore di Sanità

Raccomandazioni per il corretto prelievo, conservazione e analisi sul tampone oro/nasofaringeo per la diagnosi di COVID-19. Versione del 7 aprile 2020.

Gruppo di Lavoro ISS Diagnostica e sorveglianza microbiologica COVID-19: aspetti di analisi molecolare e sierologica 2020, ii, 7 p. Rapporti ISS COVID-19 n. 11/2020

Questo documento descrive il tipo di campione e le modalità di campionamento necessari per la diagnosi di malattia respiratoria acuta da COVID-19 e il relativo test diagnostico. Vengono, inoltre, riportati per i campioni richiesti per i test diagnostici, le regole per l'imballaggio e il trasporto che tengono conto delle istruzioni per la biosicurezza degli operatori. Per la conferma diagnostica di COVID-19 sono necessari test microbiologici mediante l'uso della Real-time PCR. Infine, è allegato un manuale per il campionamento del tampone seguendo le corrette modalità di biosicurezza.

Istituto Superiore di Sanità

Recommendations for sampling, storing and analysis of oro/nasopharyngeal swab for COVID-19 diagnosis. Version of April 7, 2020.

ISS ISS Working group Diagnostics and microbiological surveillance of COVID-19: aspects of molecular and serological analysis

2020, ii, 7 p. Rapporti ISS COVID-19 n. 11/2020 (in Italian)

This document describes the samples required for establishing a diagnosis of COVID-19 acute respiratory disease and the molecular test. Samples required for diagnostic testing, the rules for packaging and transportation, taking into account biosafety instructions for the operators, are also reported. Microbiology testing through the use of Real-time PCR is required for the confirmed diagnosis of COVID-19. Finally, a manual for sampling the swab is attached following the correct biosecurity procedures.

Per informazioni su questo documento scrivere a: paola.stefanelli@iss.it

Citare questo documento come segue:

Gruppo di Lavoro ISS Diagnostica e sorveglianza microbiologica COVID-19: aspetti di analisi molecolare e sierologica. *Raccomandazioni per il corretto prelievo, conservazione e analisi sul tampone oro/nasofaringeo per la diagnosi di COVID-19. Versione del 7 aprile 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 11/2020).

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Redazione e grafica a cura del Servizio Comunicazione Scientifica (Sandra Salinetti e Paola De Castro) (Immagini di Cosimo Marino Curianò).

© Istituto Superiore di Sanità 2020
viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma



Indice

Destinatari del rapporto	ii
Acronimi	ii
Introduzione.....	1
Campioni biologici per diagnosi di COVID-19.....	1
Campioni delle basse vie respiratorie	1
Tamponi oro-faringeo e nasale	1
Prelievo	2
DPI	2
Vestizione operatore	2
Svestizione operatore	2
Smaltimento rifiuti.....	2
Esecuzione	3
Tampone oro-faringeo.....	3
Tampone nasale	3
Etichettatura	4
Conservazione.....	5
Modalità di confezionamento e spedizione.....	5
Diagnosi molecolare per COVID-19	5
Bibliografia.....	6
Allegato	7
Corretto prelievo del tampone oro/nasofaringeo seguendo le modalità di biosicurezza	7

Destinatari del rapporto

I principali destinatari di questo rapporto sono gli operatori sanitari coinvolti nell'emergenza COVID-19.

Acronimi

COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
DPI	Dispositivi di Protezione Individuale
FFP2	Filtrante Facciale Protezione dalla Polvere media > 94%
FFP3	Filtrante Facciale Protezione dalla Polvere alta > 99%
ISS	Istituto Superiore di Sanità
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> coronavirus che causa la COVID-19

Introduzione

Nel dicembre 2019, in Cina, precisamente nella città di Wuhan (provincia di Hubei) è stata individuata nell'uomo una forma di polmonite atipica sostenuta da un nuovo coronavirus identificato come SARS-CoV-2 (1, 2).

I coronavirus sono virus provvisti di capsidi a singolo filamento di RNA a senso positivo (ssRNA+) di circa 30 kilo basi che codifica per 7 proteine virali. Al microscopio elettronico a trasmissione, i virioni appaiono sferici con una forma a "corona". Questo particolare aspetto è dovuto alla presenza della proteina "spike" rappresentata dalla glicoproteina (S). Le proteine strutturali aggiuntive comprendono: l'*envelope* (E), la proteina di matrice (M) e il nucleocapside (N) (1).

L'agente eziologico della malattia COVID-19 è stato ritrovato in vari distretti delle vie respiratorie superiori e inferiori come faringe, rinofaringe, espettorato e fluido bronchiale (3). L'RNA virale è stato riscontrato con frequenza variabile anche nelle feci e nel sangue di pazienti COVID-19. Tuttavia, la possibilità di infezione a partire da questi materiali è al momento controversa (3-5).

La diagnosi di laboratorio di SARS-CoV-2 in un caso sospetto necessita di una corretta esecuzione, trasporto e conservazione del campione e di utilizzare metodiche molecolari sensibili e specifiche.

Campioni biologici per diagnosi di COVID-19

Per la diagnosi di infezione da SARS-CoV-2 il campione di elezione è un campione delle vie respiratorie.

Questo può essere delle alte vie respiratorie (tamponi nasale, tamponi oro-faringeo, tamponi naso-faringeo) e più raramente, ove disponibili, delle basse vie respiratorie: aspirato endo-tracheale o lavaggio bronco-alveolare (*Broncho-Alveolar Lavage*, BAL).

Il campione delle basse vie respiratorie è da preferire per una maggiore concentrazione di virus nei casi di polmonite.

Campioni delle basse vie respiratorie

I campioni delle basse vie respiratorie vengono prelevati in un contenitore sterile, indossando gli opportuni DPI e minimizzando la possibilità di generare aerosol. Per tale motivo, non è consigliato il prelievo dell'espettorato indotto.

Tamponi oro-faringeo e nasale

Il prelievo del tampone oro-faringeo e nasale è una procedura che consiste nel prelievo delle cellule superficiali della mucosa della faringe posteriore o della rinofaringe, mediante un piccolo bastoncino ovattato, simile ad un cotton fioc (attualmente sono disponibili dei tamponi in materiale sintetico capaci di trattenere molto più materiale organico rispetto ai tamponi di ovatta).

Il prelievo viene eseguito in pochi secondi ed ha un'invasività minima, originando al più un impercettibile fastidio nel punto di contatto. La semplicità del prelievo non significa però che possa essere eseguito da chiunque, ma da personale addestrato e specializzato che deve garantire la corretta esecuzione della procedura evitando sia la contaminazione del campione che la raccolta solo del tratto più esterno delle fosse nasali, procedura che inficerebbe il risultato del test molecolare.

Prelievo

Per ragioni di contenimento da potenziale contagio, la procedura deve essere svolta dal personale addestrato utilizzando opportuni DPI.

DPI

- Guanti monouso.
- Camice monouso impermeabile con manica lunga.
- Cuffia per capelli monouso.
- Mascherina monouso FFP2/FFP3.
- Protezione per gli occhi (occhiali o schermo facciale di protezione).
- Controllare l'integrità dei DPI prima di indossarli.

Vestizione operatore

- Togliere monili o altro oggetto personale.
- Effettuare l'igiene delle mani con acqua e sapone o in alternativa con soluzione alcolica.
- Indossare il primo paio di guanti.
- Indossare il camice.
- Raccogliere i capelli e indossare la cuffia.
- Indossare la mascherina FFP2/FFP3.
- Indossare gli occhiali o schermo facciale.
- Indossare un secondo paio di guanti.

Svestizione operatore

Al termine della procedura evitare qualsiasi contatto tra i DPI potenzialmente contaminato e mucose o cute.

- Rimuovere il camice.
- Sfilare il primo paio di guanti.
- Rimuovere gli occhiali.
- Rimuovere la mascherina facendo attenzione a non toccarla nella parte anteriore ma maneggiarla posteriormente prendendo l'elastico tra le dita e facendo scorrere verso la parte superiore della testa.
- Rimuovere il secondo paio di guanti.
- Detergere le mani con acqua e sapone o in alternativa con soluzione alcolica.

Smaltimento rifiuti

I DPI utilizzati e il materiale da scartare deve essere considerato come rifiuto infetto e gettato nell'apposito contenitore. I rifiuti devono essere trattati e smaltiti seguendo le procedure del materiale infetto categoria B UN 3291.

Esecuzione

Tampone oro-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.
- Una volta terminato il tampone il bastoncino va inserito nella provetta contenente il terreno di trasporto e spezzato.

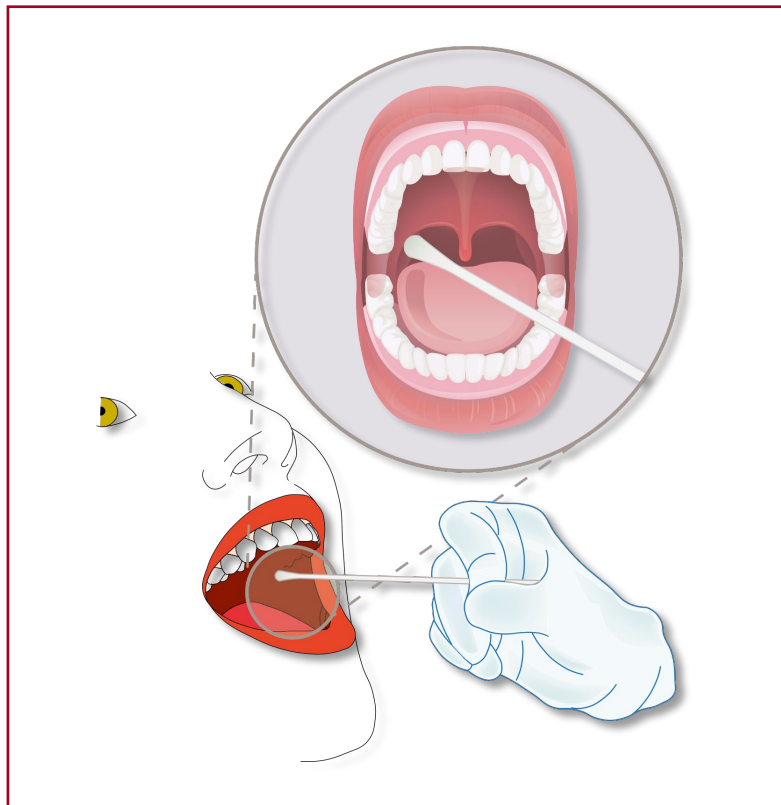


FIGURA 1. Tampone oro-faringeo

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 della rinofaringe.
- Ruotarlo delicatamente perché si ricopra abbondantemente con il secreto nasale

- Ripetere la manovra nell'altra narice.
- Una volta terminato il tampone il bastoncino va inserito nella provetta contenente il terreno di trasporto e spezzato.

I tamponi non vanno conservati a secco o introdotti in altri preparati per microbiologia.

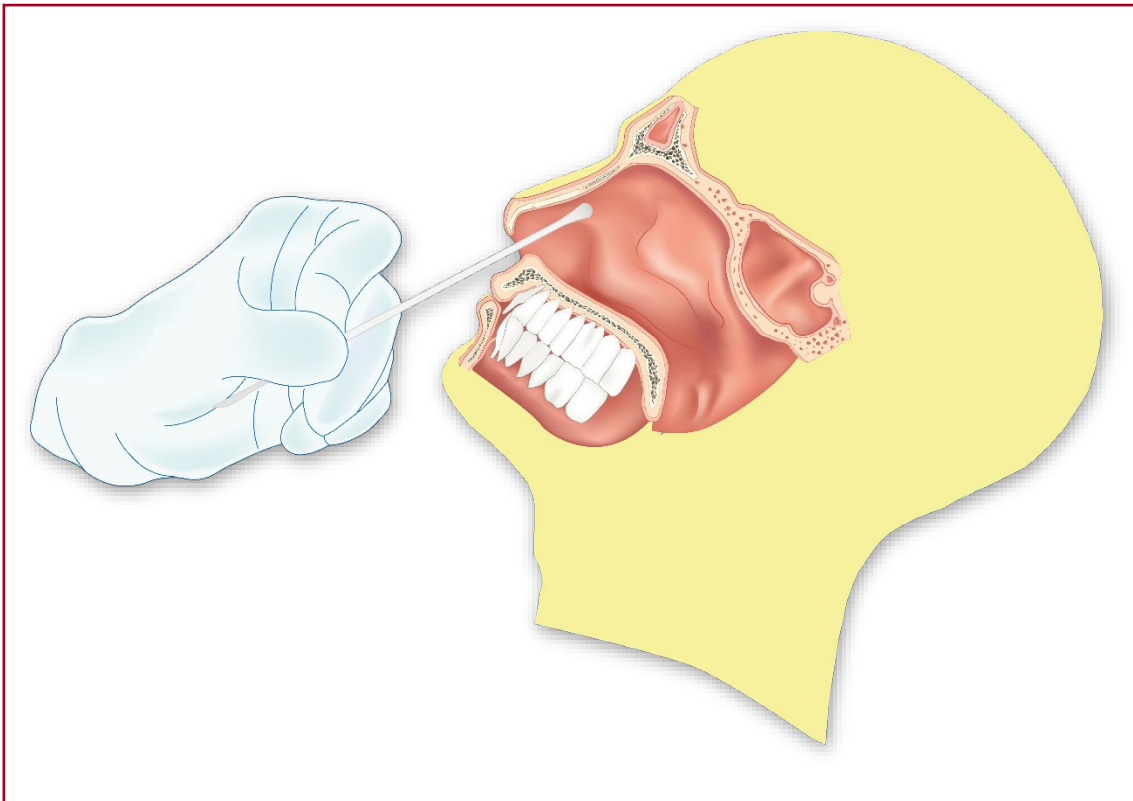


FIGURA 2. Tampone nasale

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 molecolare per COVID-19

Sulle base delle raccomandazioni da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e dello European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), la manipolazione dei campioni biologici viene eseguita utilizzando opportuni DPI e ad un livello di biosicurezza 2 (BSL2).

Dal materiale biologico viene effettuata l'estrazione e la purificazione dell'RNA per la successiva ricerca dell'RNA virale utilizzando una metodica molecolare rapida: Reverse Real-Time PCR (rRT-PCR).

I reagenti fondamentali per eseguire il test rRT-PCR, ovvero i primer oligonucleotidici e le sonde, sono state disegnate su regioni conservate del genoma virale SARS-CoV-2.

La rRT-PCR mediante il processo di retrotrascrizione permette la sintesi di una molecola di DNA a doppio filamento (cDNA) a partire da uno stampo di RNA a cui segue una amplificazione per PCR.

Tecnicamente questa procedura applica una "one-step real-time RT-PCR", in cui la retrotrascrizione e l'amplificazione in PCR sono effettuate consecutivamente nella stessa provetta di reazione.

L'utilizzo di sonde rende questo test estremamente specifico, infatti il segnale fluorescente viene rilevato solo in conseguenza dell'appaiamento della sonda alla sequenza bersaglio. Le sonde tipicamente usate possono essere di due tipi: sonde idrolitiche o di ibridazione. Il bersaglio genico, qualora fosse presente nel campione il genoma virale, viene amplificato e intercettato dalla sonda molecolare. La chimica del saggio si basa sulla quantità di prodotto che viene amplificato ad ogni ciclo termico e dalla quantità di segnale fluorescente che viene accumulato proporzionalmente. La fluorescenza può essere misurata ad ogni stadio dell'amplificazione mediante la visualizzazione in tempo reale sullo schermo collegato allo strumento (Figura 3).

I protocolli diagnostici sono quelli suggeriti sul sito dell'OMS (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>)

La durata dell'analisi in Real time PCR è di circa 1 ora e 30 minuti a cui andranno giunti i tempi di estrazione dell'RNA, per un totale di circa 4 ore (nel calcolo del tempo necessario per l'esecuzione del test bisogna tenere in considerazione anche il momento di accettazione e preparazione del campione e le fasi di validazione del test

e refertazione, questo, essendo influenzato dalla numerosità dei campioni, potrebbe influenzare sensibilmente i tempi di esecuzione).

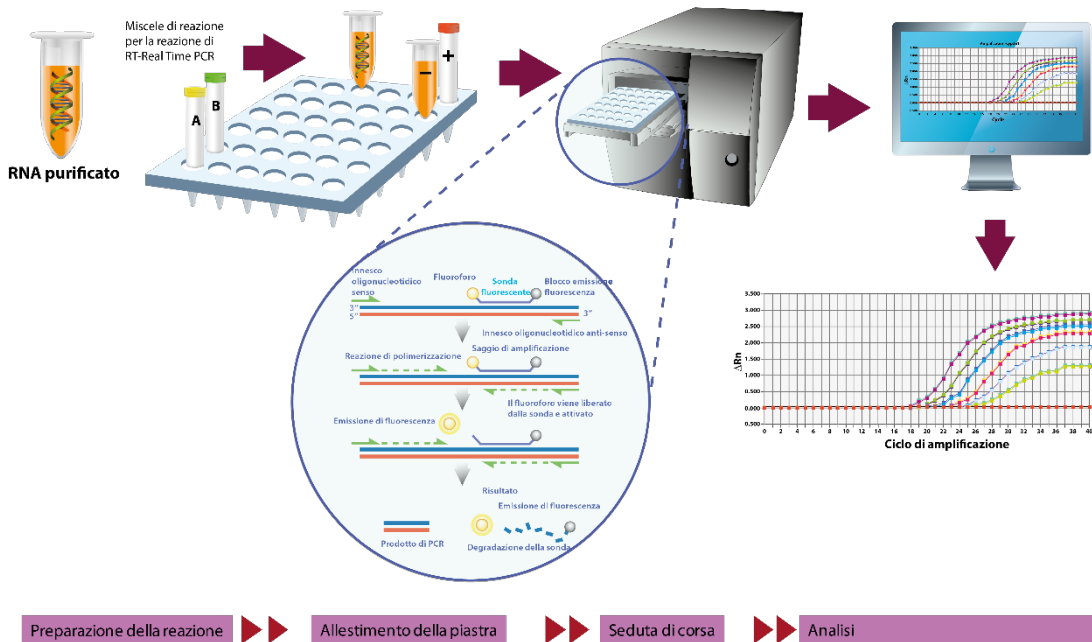


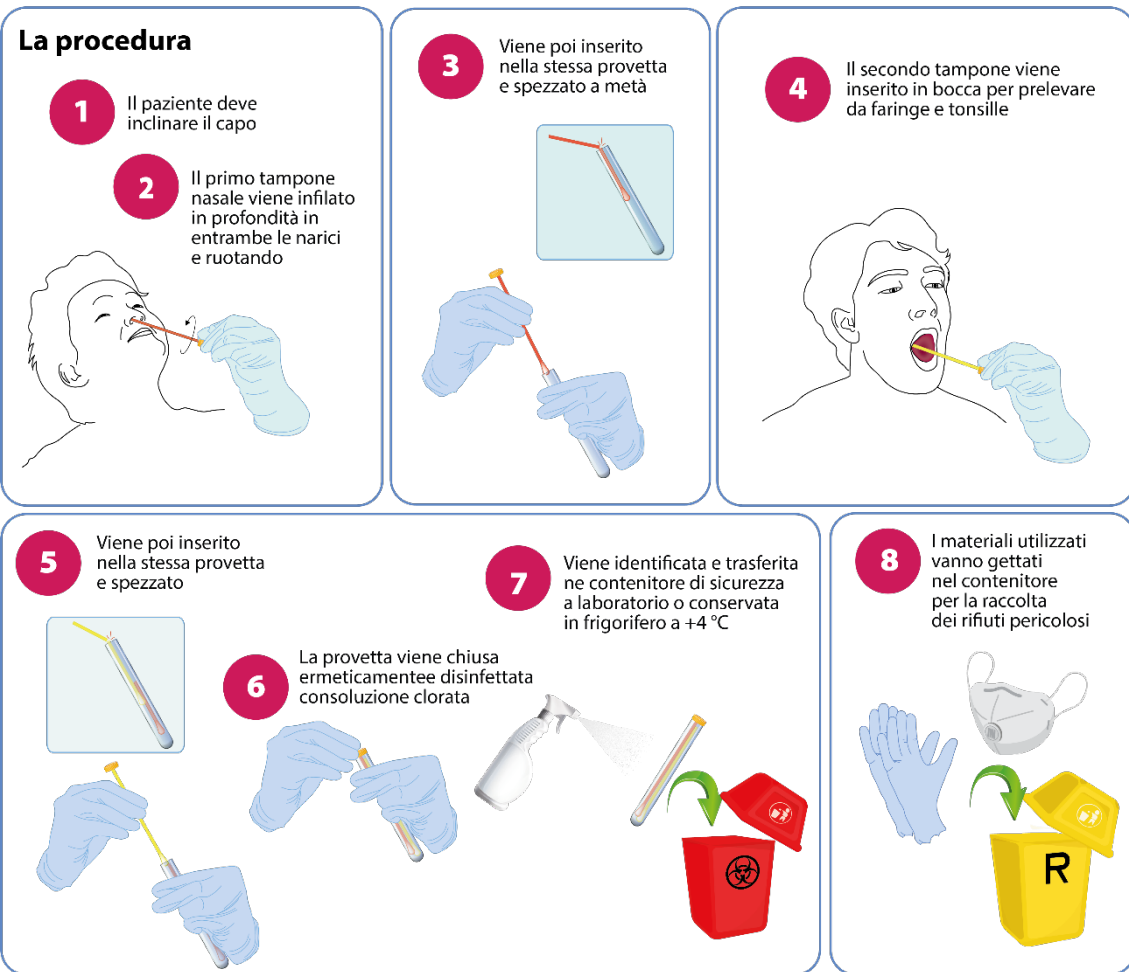
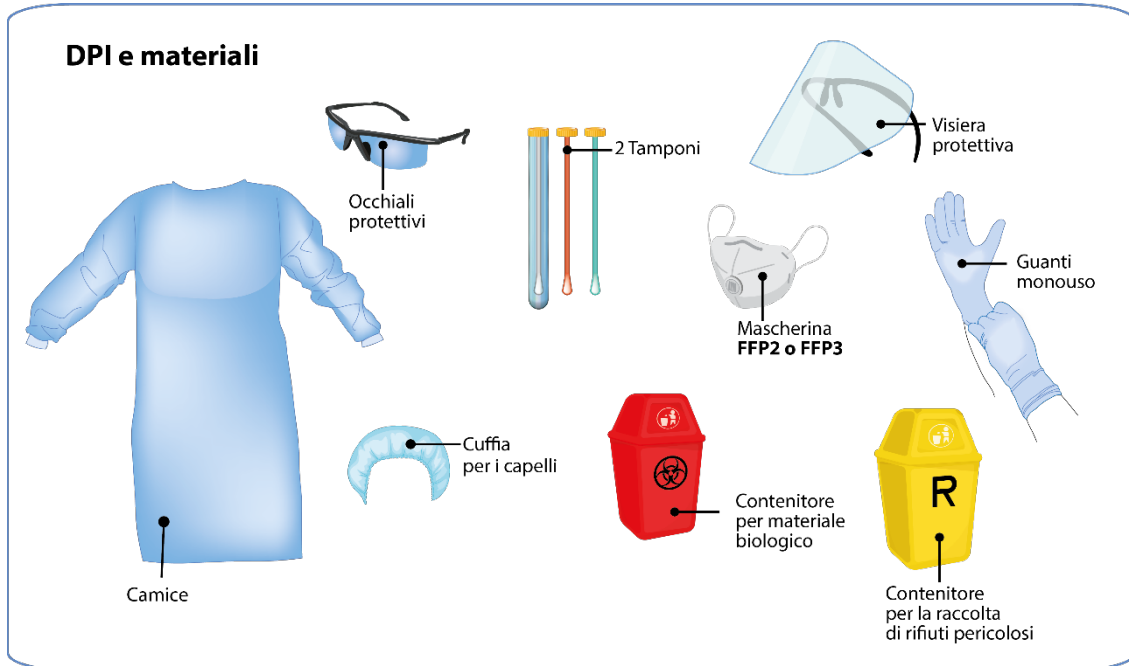
FIGURA 3. Diagnosi molecolare per COVID-19 mediante rRT-PCR

Bibliografia

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;24(10).
2. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;2(10):020-0695.
3. Wang W, Xu Y, Gao R, *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA.* 2020;11(2762997).
4. Chen C, Gao G, Xu Y, *et al.* SARS-CoV-2–Positive Sputum and feces after conversion of pharyngeal samples in patients with COVID-19. *Ann Intern Med.* 2020; [Epub ahead of print 30 March 2020]. doi: <https://doi.org/10.7326/M20-0991>
5. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>

Allegato

Corretto prelievo del tampone oro/nasofaringeo seguendo le modalità di biosicurezza



Rapporti ISS COVID-19

1. Gruppo di lavoro ISS Prevenzione e controllo delle Infezioni.
Indicazioni ad interim per l'effettuazione dell'isolamento e della assistenza sanitaria domiciliare nell'attuale contesto COVID-19. Versione del 7 marzo 2020.
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020 (Rapporto ISS COVID-19, n. 1/2020)
2. Gruppo di lavoro ISS Prevenzione e controllo delle Infezioni.
Indicazioni ad interim per un utilizzo razionale delle protezioni per infezione da SARS-CoV-2 nelle attività sanitarie e sociosanitarie (assistenza a soggetti affetti da covid-19) nell'attuale scenario emergenziale SARS-CoV-2. Versione del 14 marzo 2020.
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020 (Rapporto ISS COVID-19, n. 2/2020)
3. Gruppo di lavoro ISS Ambiente e Gestione dei Rifiuti.
Indicazioni ad interim per la gestione dei rifiuti urbani in relazione alla trasmissione dell'infezione da virus SARS-CoV-2. Versione del 14 marzo 2020.
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020 (Rapporto ISS COVID-19, n.3/2020)
4. Gruppo di lavoro ISS Prevenzione e controllo delle Infezioni.
Indicazioni ad interim per la prevenzione e il controllo dell'infezione da SARS-CoV-2 in strutture residenziali sociosanitarie. Versione del 16 marzo 2020.
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020 (Rapporto ISS COVID-19, n. 4/2020)
5. Gruppo di lavoro ISS Ambiente e Qualità dell'aria indoor.
Indicazioni ad interim per la prevenzione e gestione degli ambienti indoor in relazione alla trasmissione dell'infezione da virus SARS-CoV-2. Versione del 23 marzo 2020.
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 5/2020).
6. Gruppo di lavoro ISS Cause di morte COVID-19.
Procedura per l'esecuzione di riscontri diagnostici in pazienti deceduti con infezione da SARS-CoV-2. Versione del 23 marzo 2020.
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 6/2020).
7. Gruppo di lavoro ISS Biocidi COVID-19 e Gruppo di lavoro ISS Ambiente e Rifiuti COVID-19.
Raccomandazioni per la disinfezione di ambienti esterni e superfici stradali per la prevenzione della trasmissione dell'infezione da SARS-CoV-2. Versione del 29 marzo 2020.
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 7/2020).
8. Osservatorio Nazionale Autismo ISS.
Indicazioni ad interim per un appropriato sostegno delle persone nello spettro autistico nell'attuale scenario emergenziale SARS-CoV-2. Versione del 30 marzo 2020.
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 8/2020).
9. Gruppo di Lavoro ISS Ambiente – Rifiuti COVID-19.
Indicazioni ad interim sulla gestione dei fanghi di depurazione per la prevenzione della diffusione del virus SARS-CoV-2. Versione del 3 aprile 2020.
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 9/2020).

10. Gruppo di Lavoro ISS Ambiente-Rifiuti COVID-19.
Indicazioni ad interim su acqua e servizi igienici in relazione alla diffusione del virus SARS-CoV-2
Versione del 7 aprile 2020.
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 10/2020).

11. Gruppo di Lavoro ISS Diagnostica e sorveglianza microbiologica COVID-19: aspetti di analisi molecolare e sierologica
Raccomandazioni per il corretto prelievo, conservazione e analisi sul tampone oro/nasofaringeo per la diagnosi di COVID-19. Versione del 7 aprile 2020.
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 11/2020).