



LINEE GUIDA PER IL CONTROLLO DI QUALITA' E LA STANDARDIZZAZIONE IN VIROLOGIA



LINEE GUIDA PER IL
CONTROLLO DI QUALITA' E LA
STANDARDIZZAZIONE IN VIROLOGIA

Comitato di studio:

Luisa Barzon
Donato Boscia
Mauro Delogu
Antonietta Cavallaro
Luigi Tagliaferro (coordinatore)
Oliviero E. Varnier



Indice

1. Scopo
2. Introduzione
3. Criteri di adozione delle linee guida
4. Fase pre-analitica
5. Fase analitica
6. Fase post-analitica
7. Controllo (assicurazione) di qualità
 - CQI
 - VEQ
 - assicurazione della qualità
8. Standardizzazione
 - verifica
 - validazione
9. Allegati
10. Glossario
11. Referenze

Con il contributo di:

Dr.ssa Paola Menegazzi - Lecce

Dr.ssa Isabella Martini - Genova

1 Scopo



Queste linee guida (LLGG) si propongono di fornire al laboratorio di Virologia ed agli operatori del settore i principi generali per giungere ad un risultato analitico accurato. Obiettivo principale è quello di abituare i virologi ad una oculata valutazione e conoscenza dei punti critici relativi ad ogni passaggio del processo produttivo dell'esame di laboratorio, dal momento della raccolta del campione, al suo trasporto, passando per l'assicurazione della qualità nell'esecuzione della prova. Il tutto per arrivare ad un dato analitico certo e che riproduca il più possibile le condizioni di partenza del campione.

2 Introduzione



La continua diffusione delle tecnologie di laboratorio impiegate nell'identificazione e nel dosaggio dei patogeni virali e dei loro marcatori indiretti, unita alla sempre più crescente "domanda di qualità", induce il personale di laboratorio all'uso di tutti quei criteri e norme comportamentali deputati a garantire l'accuratezza del risultato di prova.

Come previsto dalle vigenti norme ISO e come richiesto dai vari Enti Accreditanti, ciascuna fase della filiera produttiva finalizzata alla refertazione di un dato analitico, sia esso per fini diagnostici che per scopi di ricerca, deve sottendere a precisi criteri di rintracciabilità e di verifica, atti a garantire che il risultato finale sia il meno possibile condizionato dalle comunque presenti variabili esterne, come: *addestramento degli operatori, qualità dei reagenti, strumentazione, campioni, appropriatezza delle tecniche in uso.*

In questo modo l'obiettivo di ciascuna prova di laboratorio è finalizzato a garantire un dato analitico economicamente vantaggioso, accurato, riproducibile, confrontabile con quello ottenuto dai diversi laboratori, tempestivo ed immodificabile.

E' chiaro che l'assicurazione della qualità, intesa come *processo totale che può garantire la qualità del dato di laboratorio*, e la standardizzazione delle procedure analitiche non riguardano solo la fase analitica, ma si estendono a tutto l'arco procedurale che va dal prelievo del campione alla comunicazione del dato. Poco c'entra la procedura analitica di laboratorio se l'errore è intercorso nella fase pre- o post-analitica, determinando un prelievo di campione non idoneo, condizioni di trasporto inappropriate, una non corretta interpretazione del risultato od un errore di immissione dello stesso.

A tale scopo il Comitato di Studio per il "Controllo di qualità e la standardizzazione in virologia" della *Società Italiana di Virologia* ha inteso promulgare queste Linee Guida, scegliendo fra quelle proposte dalle varie *Joint Commission* internazionali (*CLSI, JCHAO*, ecc.), secondo precisi criteri di seguito illustrati.

Va precisato, inoltre, che le seguenti Linee Guida hanno tenuto in considerazione le peculiarità dei vari settori interessati, passando per la virologia vegetale, la virologia veterinaria e la virologia umana, e le diversità procedurali, annoverando le analisi sierologiche, colturali, bio-molecolari e di microscopia diretta, con l'intento di unificarne i criteri di assicurazione di qualità e standardizzazione, nel rispetto di quanto espresso in precedenza.

3 Criteri di adozione delle linee guida

Destinatari delle linee guida

L'elaborazione delle LLGG rientra tra le attività della SIV, con il fine ultimo di promuovere una elevata qualità in termini di accuratezza e precisione delle prestazioni erogate dai laboratori di Virologia. I destinatari della presente linea guida sono, per quanto riguarda la parte pre-analitica, i medici di base, i pediatri di libera scelta, i medici ospedalieri, gli infermieri. Per la parte analitica i destinatari sono gli infermieri, medici, biologi, tecnici che operano in un laboratorio di virologia.

Necessità delle LLGG

- Ampia variabilità di comportamenti
- Carenza di letteratura spesso frammentaria

Metodologia

Queste LLGG sono state realizzate da un *panel* multidisciplinare composto da biologi, veterinari, medici microbiologi, infettivologi.

Il *panel* si è incontrato più volte per predisporre la stesura delle linee guida. In particolare per definire una strategia di ricerca ed una metodologia di valutazione dei documenti, modalità di diffusione delle LLGG e definizione degli indicatori di monitoraggio. Non era presente un esperto esterno di metodologia, ma personale del gruppo di lavoro appositamente formato mediante corsi dedicati.

Letteratura

Per la bibliografia sono state consultate le seguenti banche dati:

Medline (versione PubMed);
Embase;
Cochrane Library;

i seguenti siti:

PNLG (www.pnlg.it)
SIGN (www.sign.ac.uk)

Inoltre è stato consultato il CDC e CLSI. La parola chiave utilizzata era: *collection AND virus AND guidelines*.

In particolare la ricerca si è focalizzata su linee guida e reviews, fra cui sono stati presi in considerazione anche i seguenti testi:

Clinical Microbiology Procedures handbook H.D.Haisenberg...2° edizione 2007.....Murrey?.....

Criteri di selezione e strumenti per la valutazione metodologica

Le LLGG sono state sviluppate adattando alla realtà italiana il documento CLSI MM13-A *Collection, Transport, Preparation, and Storage of specimens for molecular Methods; Approved Guideline*.

Tale LG è stata valutata applicando i criteri dello strumento AGREE (Appraisal of guidelines for research & Evaluation) (AGREE)

Livello di prova e forza delle raccomandazioni

Sulla base della metodologia del GRADE, si è passati alla gradazione delle prove stesse e alla formulazione delle raccomandazioni. In particolare ogni raccomandazione è distinta in raccomandazione forte o debole.

Raccomandazioni generali

RACCOMANDAZIONI FORTI	<ul style="list-style-type: none"> • Il laboratorio deve predisporre di una <i>Istruzione Operativa</i> (IO) per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni • Il medico richiedente deve compilare la scheda di richiesta esame utilizzando il nome del paziente, N° identificativo, data di nascita, data e ora raccolta campione, di spedizione, il tipo di campione, le notizie cliniche più rilevanti. In laboratorio deve essere registrata la data di arrivo del campione e la temperatura di conservazione • Non analizzare i campioni di sangue emolizzati, congelati • Utilizzare come anticoagulante EDTA e ACD • Il DNA deve essere purificato prima di essere congelato (Utilizzare provette in polyallomer) • Il DNA purificato può essere conservato a 2-8° per 26 settimane, 7 anni a -20°, e almeno 7 anni a -80° • Il prelievo di sangue per ricerca virus ad RNA deve essere eseguito con provetta contenente uno stabilizzante • Il campione di tessuto deve essere raccolto direttamente in un contenitore contenente lo stabilizzante o in azoto liquido. In quest'ultimo caso il campione deve essere trasportato in ghiaccio secco e non deve essere scongelato più volte prima dell'estrazione di RNA. Conservare a -80°
RACCOMANDAZIONI DEBOLI	<p>Indicare nella scheda di richiesta esame:</p> <ul style="list-style-type: none"> • la razza del paziente • il nome della persona che ha raccolto il campione

Come *campione uretrale* utilizzare tampone con punta in poliestere; come *campione cervicale* utilizzare tampone con punta in poliestere e rayon, conservati e trasportati secondo prescrizione della ditta produttrice.

Utilizzare una quantità di *tessuto* di 1-2 g e congelarlo in azoto liquido. Se ciò non fosse possibile trasportare il campione in ghiaccio. Tessuti ipocellulari richiedono una quantità maggiore di tessuto (se la biopsia è rappresentata da un pezzo grosso di tessuto perché utilizzata per altri esami, avvolgere il tessuto

in una garza imbevuta da soluzione fisiologica). Mettere il tessuto il prima possibile in una soluzione stabilizzante (per RNA *transcripts* alcuni minuti o secondi)

Le raccomandazioni della casa produttrice kit non sono generalizzate ma riferite alla singola prova del kit.

Per la ricerca di virus a RNA come HIV, HCV il sangue deve essere centrifugato. Se la provetta non contiene il gel separatore il plasma deve essere separato in un'altra provetta entro 4 ore. Il plasma separato è stabile 5 giorni a 2-8 °C e per un tempo più lungo a -20/70 °C.

Il BAL deve essere trasportato entro 24 ore dalla raccolta, altrimenti deve essere refrigerato per 72 ore a 2-8°C o a -70°C per periodi più lunghi. I campioni per micobatteri devono essere decontaminati e "digested" prima di essere congelati.

Il midollo osseo deve essere aspirato in una siringa contenente EDTA. Il personale del laboratorio deve essere avvisato immediatamente dell'arrivo del midollo. Il campione deve essere conservato temporaneamente a 2-8°C prima di essere processato per l'estrazione del DNA. Questa deve avvenire entro 72 ore. Se il tempo di esecuzione è più lungo, eliminare gli eritrociti e conservare a -20°C.

Se si congela il campione senza eliminare gli eritrociti questi emolizzeranno rilasciando l'eme che è un potente inibitore di PCR.

Se si ricercano virus a RNA il materiale deve essere posto il prima possibile in un contenitore contenente una soluzione RNA stabilizzante. Se ciò non fosse possibile mettere immediatamente il campione in ghiaccio secco e trasportare in laboratorio. L'estrazione dell'RNA deve avvenire in entro 1-4 ore.

Cellule buccali o fluido orale

Per la ricerca di virus a DNA eseguire un tampone a secco o un lavaggio e trasportare a temperatura ambiente (stabile per una settimana).

Per la ricerca di virus a RNA aggiungere anche una soluzione RNA stabilizzante.

Buffy coat

Se il DNA non viene estratto dal sangue entro 3 giorni dalla raccolta, il *buffy coat* deve essere isolato e stoccato a -70°C.

In caso di ricerca di virus a RNA l'estrazione dell'RNA deve avvenire entro 4 ore, alternativamente le cellule devono essere messe in una soluzione RNA stabilizzante. In caso di eosinofilia, alti livelli di ribonucleasi endogena possono essere responsabili di notevoli problemi.

Liquor

Virus a DNA: trasportati a 2-8°C. Se non processati immediatamente metterle il campione a -20/-70°C.

Virus a RNA: messo immediatamente in ghiaccio secco; l'RNA deve essere estratto entro 1-4 ore o congelare dopo avere rimosso i globuli rossi. Se il campione viene congelato deve essere trasportato al laboratorio in ghiaccio secco.

Tessuto

Per l'estrazione del DNA il tessuto deve essere messo immediatamente in ghiaccio secco e trasportato in laboratorio, dove deve essere conservato a 2-8°C per non più di 24 ore prima di essere processato. Alternativamente il tessuto può essere *snap frozen* al momento del campionamento.

In genere il DNA nel tessuto è stabile per 24 ore a 2-8°C, per 2 settimane a -20°C, e per 2 anni a -70°.

Il tessuto ematico deve essere lavato con soluzione fisiologica.

Per l'estrazione dell'RNA il tessuto deve essere o *snap frozen* o messo in una soluzione stabilizzante, altrimenti deve essere processato entro un'ora. La prima modalità è la migliore e l'RNA dura 2 anni a -70°C. L'RNA purificato è meglio conservarlo precipitato in etanolo a -70°C.

Il tessuto deve essere conservato in un contenitore maneggiato con i guanti.

4 Fase pre-analitica



Nella elaborazione delle linee guida il comitato di studio ha ritenuto opportuno suddividere la diagnostica virologica nei due principali filoni:

- *Indiretta*
 - ricerca di anticorpi verso antigeni virali
 - valutazione della risposta cellulo-mediata dell'ospite
- *Diretta*
 - ricerca di antigeni virali
 - isolamento virale
 - ricerca di acidi nucleici virali
 - ricerca di particelle virali

DIAGNOSTICA VIROLOGICA INDIRETTA

4.1 Ricerca di anticorpi verso antigeni virali

Ricerca di anticorpi verso antigeni virali				
	Sangue intero	Plasma	Siero	
Raccolta				
Trasporto				
Treatmento pre-stoccaggio				
Conservazione				

4.2 Valutazione della risposta cellulo-mediata dell'ospite

Valutazione della risposta cellulo-mediata dell'ospite		
	Sangue intero	
Raccolta		
Trasporto		
Trattamento pre-stoccaggio		
Conservazione		

DIAGNOSTICA VIROLOGICA DIRETTA

4.3 Ricerca di antigeni virali

4.4 Isolamento virale

4.4.1 Raccolta del campione

Il rispetto delle corrette modalità di raccolta, conservazione ed invio dei campioni biologici è condizione preliminare e necessaria per una corretta diagnostica microbiologica; i campioni da esaminare devono, quindi, essere prelevati seguendo scrupolosamente i criteri sotto indicati.

La raccolta del materiale deve avvenire prima dell'inizio della terapia farmacologica. La ricerca effettuata dopo la somministrazione di farmaci antivirali è un'operazione irrazionale. Infatti, anche nei casi in cui la terapia antivirale non abbia determinato la completa eliminazione dell'agente patogeno, è probabile che il farmaco contenuto nel materiale raccolto continui ad esercitare nel terreno di coltura la sua attività, impedendo lo sviluppo e quindi l'evidenziazione del patogeno. Se il paziente è in trattamento e non è possibile interrompere la terapia, occorre avvertire tempestivamente il laboratorio, poiché alcuni accorgimenti (diluizione del materiale, aggiunta di sostanze al terreno, eccetera) possono attenuare l'azione antivirale del farmaco e favorire l'isolamento virale.

La raccolta deve essere effettuata in condizioni idonee dal punto di vista igienico e va eseguita secondo le caratteristiche peculiari del campione stesso, sia che esso abbia una matrice umana, veterinaria o vegetale: si raccomanda di indossare gli adeguati Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) selezionati in funzione della manovra da compiere (guanti, mascherina, visor, camice monouso, ecc.). Al termine del prelievo è necessario trattare adeguatamente (decontaminare, sanificare, disinfettare e/o sterilizzare) lo strumentario riutilizzabile necessario alla raccolta dei campioni biologici e eliminare negli appositi contenitori aghi, taglienti e altri strumenti monouso eventualmente utilizzati. Lavare le mani prima e dopo il prelievo del campione e dopo aver eliminato i guanti.

La raccolta deve essere effettuata in condizioni di sterilità, è molto importante cercare di evitare ogni contaminazione endogena o esogena del campione. In molti casi le patologie infettive sono sostenute da "patogeni opportunisti" che, a differenza di quelli classici, fanno parte della flora residente di alcuni distretti corporei e dell'ambiente. Il materiale biologico può essere contaminato da flora residente in altri

distretti con cui viene a contatto prima o durante il prelievo (contaminazioni endogene); per esempio, l'essudato bronchiale può essere inquinato ad opera della flora orofaringea nella fase di espettorazione; l'urina può essere inquinata ad opera dei batteri dei genitali esterni durante la minzione, eccetera. La presenza di un'eventuale agente contaminante può comportare una erronea valutazione in merito alla presenza del target in esame.

Devono essere previsti e stabiliti criteri di accettabilità per ogni tipologia di campione; questi fanno parte integrante delle *Procedure Operative Standard (POS)* del laboratorio e devono descrivere il tipo di contenitore da utilizzare per la raccolta del campione, il tipo di terreno di trasporto (Viral Transport Medium - VTM), se previsto, l'indicazione delle principali sostanze da evitare, poiché in grado di invalidare le successive analisi ecc.

4.4.1.1 Matrice del campione

L'isolamento virale può essere eseguito a partire da diverse tipologie di campioni: umani, animali, vegetali. La selezione dei campioni per l'isolamento virale può avvenire sulla base della sindrome clinica e/o dei sintomi/manifestazioni del soggetto coinvolto, oppure sulla base del sospetto di infezione virale. Le tabelle che seguono hanno il compito di fornire indicazioni pratiche sul corretto trattamento in fase pre-analitica, delle diverse matrici di campione.

4.4.1.2 Etichettatura e raccolta del campione

I campioni biologici devono essere raccolti, etichettati, maneggiati e conservati nel rispetto della *privacy* vigente, secondo che si tratti di prelievi di origine umana, animale o vegetale.

I campioni destinati ad isolamento virale devono essere identificati mediante un'etichetta contenente almeno:

- codice di identificazione o nome
- data di prelievo

Ciascun campione deve essere accompagnato da un modulo di richiesta contenente:

- nome (paziente, animale o altro)
- data di nascita
- richiesta di isolamento virale con indicazioni circa il sospetto diagnostico.
- tipologia del campione
- informazioni di rilievo, per esempio: precedenti indagini virologiche e/o batteriologiche, eventuale terapia in corso (se possibile).
- nome del richiedente (se possibile)
- nome del prelevatore (se possibile)

I campioni fetali devono essere etichettati con il nome della madre, descrivendone la tipologia (villi coriali, liquido amniotico, sangue funicolare, ecc.). Per quanto possibile è bene evitare la contaminazione con fluidi o tessuti di origine materna. Le quantità minime consigliate sono di 10 ml per il liquido amniotico e di 15 mg per i villi coriali.

Per i campioni tissutali e le biopsie deve essere indicata la quantità di materiale fornita, la quantità ottimale, normalmente, è intorno a 1-2 g.

Tutte le indicazioni fornite dall'etichettatura e dal modulo di accompagnamento del campione biologico dovranno essere trascritte in un'apposita scheda per la successiva gestione delle richieste di indagine microbiologica.

Per la raccolta del campione da alcuni distretti anatomici, vengono tradizionalmente utilizzati sistemi, disponibili in commercio, costituiti da un tampone caratterizzato da un *core* centrale di fibra sintetica superavvolta attorno ad una sottile asta in plastica o alluminio. Il tampone può essere raccolto "a secco" oppure possono essere utilizzati tamponi combinati a sistemi di trasporto liquido; in questo caso nel bulbo della provetta in cui viene inserito il tampone, è contenuta una soluzione di trasporto (Viral Transport Medium- VTM), sterile, la cui composizione è appositamente studiata per la conservazione di virus (es. n.1: tampone triptosio fosfato, gelatina animale, cloramfenicolo, cicloesamide; es n.2: Tryptose Phosphate Broth, di-sodio fosfato, mono-sodio fosfato, gentamicina e anfotericina B).

4.4.2 Trasporto e conservazione del campione

Il trasporto dei campioni in microbiologia deve avvenire in tempi e condizioni che non alterino le caratteristiche microbiologiche del materiale prelevato. Le modalità di trasporto rappresentate nelle tabelle successive costituiscono delle linee guida generiche e devono essere, eventualmente, integrate o sostituite da particolari indicazioni emesse dalle ditte fornitrici dei sistemi di raccolta e trasporto dei campioni.

Il laboratorio deve fornire al corriere responsabile ogni indicazione sulle corrette modalità di trattamento e trasporto del campione. E' importante segnalare la data e l'ora del ritiro del campione, della spedizione, del ricevimento e, ove possibile, delle condizioni e della temperatura di arrivo. I campioni prelevati, identificati adeguatamente attraverso l'etichetta, devono essere trasportati tramite sacchetto per trasporto provette con cestino per trasporto provette, oppure attraverso contenitore Biotransport. In caso di trasporto tramite sacchetto, è fortemente raccomandato l'uso di guanti da parte del personale addetto allo scopo di prevenire la trasmissione di patogeni infettanti in caso di fuoriuscita accidentale del materiale biologico. E' necessario trattare adeguatamente (decontaminare, sanificare, disinfettare e/o sterilizzare) lo strumentario riutilizzabile necessario al trasporto e alla conservazione dei campioni biologici.

4.4.2.1 Raccomandazioni per una corretta modalità di conservazione dei campioni destinati all'isolamento virale.

L'attendibilità e l'accuratezza di un test di isolamento virale dipende moltissimo da fattori legati alla raccolta, al trasporto ed alla conservazione dei materiali biologici sui quali si esegue l'indagine, in particolar modo è necessario che siano rispettati i tempi e le condizioni di conservazione dei materiali. La prolungata conservazione può causare la morte dei virus meno resistenti; inoltre, alcune specie, possono moltiplicarsi a spese di altre, alterando il naturale equilibrio tra i microrganismi presenti nel materiale e causare valutazioni errate. In linea di principio il campione deve essere mantenuto a 4°-8°C e inviato tempestivamente al laboratorio; se per ragioni organizzative non è possibile inviare immediatamente i campioni, è indispensabile utilizzare, quando possibile, adeguati terreni di trasporto (Viral Transport Medium- VTM), oppure conservare materiali secondo le modalità indicate nelle tabelle successive.

I terreni di trasporto consentono di mantenere il campione, opportunamente refrigerato a 4°-8°C, fino a 48 h dal prelievo, ma è importante sottolineare che, per alcune tipologie di materiale (Vedi tabella sotto) non è possibile l'utilizzo di VTM.

Campioni che possono essere raccolti in VTM	Campioni che non possono essere raccolti in VTM
Tampone (eccetto tampone fecale e tampone rettale); campione ottenuto mediante raschiatura (es. raschiatura cornea/congiuntiva); aspirato respiratorio (es. aspirato nasofaringeo ottenuto tramite catetere); lavaggio respiratorio (es. lavaggio nasale); Broncolavaggio (BW) e Lavaggio Broncoalveolare (BAL); Tessuto, Biopsia e agoaspirato.	Feci, liquor (CSF), urine, fluidi corporei (liquido amniotico, liquido pleurico, liquido pericardico, ecc.)
espettorato (VTM opzionale)	Tampone fecale, tampone rettale

4.5 Ricerca di acidi nucleici virali

4.5.1 Raccolta del campione

Un trattamento appropriato del campione biologico garantisce l'accuratezza del dato qualitativo o quantitativo nella fase analitica.

La raccolta deve essere effettuata in condizioni idonee dal punto di vista igienico (uso di guanti, ecc.) e va eseguita secondo le caratteristiche peculiari del campione stesso, sia che esso abbia una matrice umana, veterinaria o vegetale.

Qualsiasi campione deve essere raccolto, trasportato e conservato seguendo indicazioni precise secondo le sue caratteristiche ed il tipo di indagine analitica da svolgere (vedi tabelle successive).

Nei test basati sulla ricerca ed il dosaggio degli acidi nucleici virali un trattamento inappropriato del campione può comportare inevitabilmente la degradazione dell'acido nucleico e, conseguentemente, una erronea valutazione quantitativa del target in esame.

Devono essere previsti e stabiliti criteri di accettabilità per ogni tipologia di campione; questi fanno parte integrante delle *Procedure Operative Standard (POS)* del laboratorio e devono descrivere il tipo di contenitore da utilizzare per la raccolta del campione, il tipo di anticoagulante (se previsto), l'indicazione delle principali sostanze da evitare, poichè in grado di inibire la reazione di amplificazione del target o del segnale (PCR, LCR, branched-DNA, ecc.).

4.5.1.1 Matrice del campione

Gli acidi nucleici possono essere estratti ed amplificati da diverse tipologie di campioni: umani, animali, vegetali.

Le tabelle che seguono hanno il compito di fornire indicazioni pratiche sul corretto trattamento del campione.

4.5.1.2 Etichettatura e raccolta del campione

I campioni biologici devono essere raccolti, etichettati, maneggiati e conservati nel rispetto della *privacy* vigente, secondo che si tratti di prelievi di origine umana, animale o vegetale.

I campioni destinati ad indagini bio-molecolari devono essere identificati mediante un'etichetta contenente almeno:

- codice di identificazione
- data di prelievo
- ora di prelievo
- tipologia del campione
- nome del prelevatore (facoltativo)

Ciascun campione deve essere accompagnato da un modulo di richiesta contenente:

- nome (paziente, animale o altro)
- data di nascita
- informazioni di rilievo (se possibile)
- nome del richiedente (se possibile)

L'uso di guanti durante le operazioni di raccolta, trasporto, trattamento e conservazione del campione è fortemente raccomandato, allo scopo di prevenire la trasmissione di patogeni infettanti e la contaminazione da cellule esfoliative da parte di personale addetto ad ognuna delle operazioni menzionate.

Laddove previste dovranno essere eventualmente fornite le procedure relative a particolari precauzioni da osservare durante la raccolta del campione (es.: la raccolta di campioni cervicali per il test di HPV-DNA prima del trattamento con acido acetico, il tipo di anticoagulante da usare per i prelievi ematici, aspirati linfonodali o altro).

Per i campioni tissutali e le biopsie, solo nel caso non fossero possibili altri tipi di prelievo, oltre alle esatte modalità di trasporto e di conservazione, deve essere indicata la quantità ottimale, normalmente intorno a 1-2 g.

I campioni fetali devono essere etichettati con il nome della madre, descrivendone la tipologia (villi coriali, liquido amniotico, sangue funicolare, ecc.). Per quanto possibile è bene evitare la contaminazione con fluidi o tessuti di origine materna. Le quantità minime consigliate sono di 10 ml per il liquido amniotico e di 15 mg per i villi coriali.

4.5.2 Trasporto e conservazione del campione

Le modalità di trasporto rappresentate nelle tabelle successive costituiscono delle linee guida generiche e devono essere, eventualmente, integrate o sostituite da particolari indicazioni emesse dalle ditte fornitrici dei sistemi di raccolta e trasporto dei campioni o dei kit di biologia molecolare.

Il laboratorio deve fornire al corriere responsabile ogni indicazione sulle corrette modalità di trattamento e trasporto del campione. È importante segnalare la data e l'ora del ritiro del campione, della spedizione, del ricevimento e, ove possibile, delle condizioni e della temperatura di arrivo.

In ragione del fatto che gli acidi nucleici virali sono più o meno labili secondo la loro natura (DNA o RNA), è importante che durante il trasporto il campione non sia sottoposto a condizioni che lo rendano facilmente degradabile. Peraltro, pur facendo riferimento, come detto in precedenza, alle istruzioni dei costruttori, nel caso di test *home-brewed* il laboratorio deve fornire ogni indicazione sul corretto trasporto.

4.5.2.1 Raccomandazioni per una corretta modalità di raccolta, trasporto e conservazione del campione

L'attendibilità e l'accuratezza dei test molecolari dipende molto da fattori legati alla raccolta, al trasporto ed alla conservazione dei materiali biologici. Nel caso di identificazione e dosaggio di acidi nucleici virali, sia il ciclo di replicazione del virus, sia il tipo di cellula in cui esso replica possono essere importanti per determinare il tipo di campione, il sistema di raccolta e la procedura analitica.

Nel caso il campione sia costituito da DNA purificato, questo deve essere tenuto a temperature al di sotto di 0 °C, se conservato per lunghi periodi, per ridurre al minimo l'azione degradante degli enzimi DNAasi. Il contenitore deve essere di plastica idrofobica, ben chiuso, preferibilmente con una guarnizione di gomma per prevenire l'evaporazione. Non tutti i contenitori hanno le stesse caratteristiche: i tubi di polipropilene possono assorbire e legare il DNA, soprattutto ad alta forza ionica.

Il DNA purificato può essere conservato tranquillamente in tampone Tris-EDTA fino a 26 settimane a temperatura ambiente, a 2-8 °C per almeno un anno in assenza di DNAasi contaminanti, fino a 7 anni a -20 °C ed oltre 7 anni a temperature uguali o inferiori a -70 °C.

Per ciò che concerne l'identificazione ed i dosaggi quantitativi di RNA, va tenuto presente che, dopo la raccolta del campione, possono verificarsi sia fenomeni di degradazione, sia fenomeni di induzione genica, entrambi possibili cause di alterazione del profilo di espressione genica. Questi fenomeni possono avvenire entro pochi minuti nei campioni tissutali come nei fluidi biologici.

Si raccomanda, perciò, laddove possibile, di conservare i campioni prelevati direttamente in contenitori muniti di stabilizzanti per RNA. Campioni già congelati devono essere trasportati in ghiaccio secco e non scongelati fino all'estrazione dell'RNA.

Indipendentemente dalla durata della conservazione, è raccomandata una temperatura di -70 °C o inferiore, dal momento che l'attività ribonucleasica continua anche a -20 °C.

Si consiglia l'uso di refrigeratori e congelatori *frost-free* privi di cicli di sbrinamento.

4.5.2.2 Conservazione degli acidi nucleici

DNA

Il DNA è una molecola relativamente stabile ed è possibile estrarlo dal sangue anche se quest'ultimo è conservato a temperatura ambiente fino a otto giorni. Una volta isolato, il DNA è stabile per almeno un anno. Il contenitore deve avere preferibilmente composizione a base poliallomerica (il polipropilene e ancor più il polietilene tendono a legare il DNA). Generalmente viene conservato in soluzione: è possibile utilizzare acqua distillata quando la reazione di PCR viene eseguita entro pochi giorni dall'estrazione, altrimenti si preferisce il tampone Tris-EDTA (pH 7.2), in grado di limitare le variazioni di pH e la degradazione spontanea del DNA.

Il DNA conserva le sue caratteristiche nel tempo, tuttavia è raccomandabile una conservazione a -70 °C, possibilmente diviso in aliquote, qualora dovessero essere richieste più prove di laboratorio. In questo modo si riducono le possibilità di contaminazione e si garantisce una maggior accuratezza analitica.

RNA

L'RNA è una molecola estremamente labile. Una volta purificato si conserva meglio come precipitato in etanolo a temperature uguali o inferiori a -70 °C. Per la conservazione occorre usare tubi di plastica sterili, idrofobici, non maneggiati senza guanti, trattati con acqua al dietilpirocarbonato (DEPC), allo scopo di eliminare le RNAasi. Un pH alcalino (7.1-7.5) è più efficace di quello acido o neutro. L'RNA purificato è stabile fino a 3 ore dopo il primo scongelamento; cicli ripetuti di congelamento-scongelamento degradano l'RNA.

4.6 Ricerca di particelle virali

CAMPIONI DI ORIGINE UMANA

Ago-aspirato					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile con VTM	contenitore sterile <i>nuclease free</i> con EDTA o sodio citrato	a) contenitore sterile <i>nuclease free</i> con EDTA o sodio citrato e immediata refrigerazione in ghiaccio umido (max 4 ore) in assenza di stabilizzante per RNA b) contenitore sterile <i>nuclease free</i> con stabilizzante	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	a 2-8 °C	a) in ghiaccio umido (max 4 ore) b) a 2-8 °C	
Trattamento pre-stoccaggio			lisi degli eritrociti, ove prevista	lisi degli eritrociti, ove prevista	
Conservazione		2-8°C per 24 ore, -80 °C per periodi più lunghi	2-8°C per 72 ore, -20 °C per periodi più lunghi	-70°C (in assenza di stabilizzante per max 4 settimane)	

Aspirato bronchiale, espettorato, lavaggio bronco-alveolare (BAL)					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile con VTM (VTM opzionale per espettorato)	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	2-8°C, max 24 h	2-8°C, max 6 h	
Trattamento pre-stoccaggio		eventuale trattamento fluidificante espettorato	fluidificazione	fluidificazione	
Conservazione		2-8°C per 24 ore, -80 °C per periodi più lunghi	2-8°C per 72 ore, -70°C per periodi più lunghi	-70°C	

Aspirato midollare					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile con VTM	contenitore sterile <i>nuclease free</i> con EDTA o sodio citrato	a) contenitore sterile <i>nuclease free</i> con EDTA o sodio citrato e immediata refrigerazione in ghiaccio umido (max 4 ore) in assenza di stabilizzante per RNA b) contenitore sterile <i>nuclease free</i> con stabilizzante	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	a 2-8 °C	a) in ghiaccio umido (max 4 ore) b) a 2-8 °C	
Trattamento pre-stoccaggio			lisi degli eritrociti, ove prevista	lisi degli eritrociti, ove prevista	
Conservazione		2-8°C per 24 ore, -80 °C per periodi più lunghi	2-8°C per 72 ore, -20 °C per periodi più lunghi	-20/-70°C	

Buffy coat					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	a) contenitore sterile <i>nuclease free</i> e immediata refrigerazione in ghiaccio umido (max 4 ore) b) contenitore sterile <i>nuclease free</i> con stabilizzante	
Trasporto		da effettuarsi a 2-8°C e entro 4 ore dalla separazione dei leucociti	2-8°C <i>Buffy coat</i> utilizzati per colture con EBV: in ghiaccio secco	a) in ghiaccio umido entro 4 ore dal prelievo o in ghiaccio secco per tempi più lunghi b) temperatura ambiente	
Trattamento pre-stoccaggio		trasferire i leucociti in terreno di coltura per congelamento			
Conservazione		azoto liquido	-20/-70°C	a) -20/-70°C b) temperatura ambiente	

Campioni di origine fetale (liquido amniotico, sangue funicolare, villi coriali, ecc.)					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile con o senza VTM a seconda tipologia campione	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	contenitore sterile <i>nuclease free</i> e immediata refrigerazione in ghiaccio umido (max 4 ore)	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	a 2-8°C	in ghiaccio umido entro 4 ore dal prelievo in ghiaccio secco	
Trattamento pre-stoccaggio					
Conservazione		2-8°C per 72 ore, -80 °C per periodi più lunghi	a 2-8°C per 24 ore -20/-70°C	-20/-70°C	

Cellule buccali e fluidi orali					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile con VTM	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	contenitore sterile <i>nuclease free</i> con eventuale soluzione stabilizzante per RNA o terreno di trasporto specifico	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	temperatura ambiente	a 2-8°C; a temperatura ambiente solo in presenza di soluzione stabilizzante o di terreno di trasporto	
Trattamento pre-stoccaggio					
Conservazione		2-8°C per 24 ore, -80 °C per periodi più lunghi	temperatura ambiente fino a 7 giorni -20/-70°C per periodi più lunghi	2-8°C fino a 24 ore -20/-70°C per periodi di tempo più lunghi	

Colture cellulari					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile per coltura cellulare contenente terreno di coltura specifico e completo	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	
Trasporto		a) temperatura ambiente per cellule in coltura b) ghiaccio secco per cellule crioconservate	a temperatura ambiente o refrigerata nel mezzo di coltura a seconda del tipo cellulare	a temperatura ambiente o refrigerata nel mezzo di coltura a seconda del tipo cellulare	
Trattamento pre-stoccaggio		trasferire le cellule in terreno di coltura per congelamento	separazione mediante centrifugazione della sospensione cellulare	separazione mediante centrifugazione della sospensione cellulare	
Conservazione		azoto liquido	-20/-70°C	-20/-70°C	

Feci					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	
Trasporto		temperatura ambiente; trasporto entro le 24 h	temperatura ambiente fino a 4 ore 2-8°C entro 24 ore	temperatura ambiente fino a 4 ore 2-8°C entro 24 ore	
Trattamento pre-stoccaggio					
Conservazione			2-8°C per 24 ore -20/-70°C per periodi più lunghi	2-8°C per 24 ore -70°C per periodi più lunghi	

Liquor cefalo-rachidiano					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	contenitore sterile <i>nuclease free</i> e immediata refrigerazione in ghiaccio umido (max 4 ore)	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	a 2-8°C	in ghiaccio umido entro 4 ore dal prelievo in ghiaccio secco	
Trattamento pre-stoccaggio					
Conservazione		2-8°C per 24 ore, -80 °C per periodi più lunghi	-20/-70°C	-20/-70°C	

Liquido seminale					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	2-8°C entro 24 ore	2-8°C entro 24 ore	
Trattamento pre-stoccaggio					
Conservazione		2-8°C per 24 ore, -80 °C per periodi più lunghi	2-8°C per 24 ore -20/-70°C per periodi più lunghi	2-8°C per 24 ore -70°C per periodi più lunghi	

Plasma					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile	contenitore sterile <i>nuclease free</i> con anticoagulante EDTA o sodio citrato (evitare eparina)	contenitore sterile <i>nuclease free</i> con anticoagulante EDTA o sodio citrato (evitare eparina) ed eventuale soluzione stabilizzante per RNA	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	2-8°C	2-8°C	
Trattamento pre-stoccaggio			separazione da sangue intero: a) provette senza gel separatore: aliquotare entro 24 ore b) provette con gel separatore: separazione non necessaria	separazione da sangue intero: a) provette senza gel separatore: aliquotare entro 4 ore b) provette con gel separatore: separazione non necessaria	
Conservazione		2-8°C per 24 ore, -80 °C per periodi più lunghi	2-8°C per 72 ore, -20/-70°C per periodi più lunghi	2-8°C fino a 5 giorni -20/-70°C per periodi di tempo più lunghi	

Sangue intero					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile	contenitore sterile <i>nuclease free</i> con anticoagulante EDTA o sodio citrato (evitare eparina)	contenitore sterile <i>nuclease free</i> con anticoagulante EDTA o sodio citrato (evitare eparina) ed eventuale soluzione stabilizzante per RNA	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	2-8°C, max 24 h	2-8°C, max 4 h	
Trattamento pre-stoccaggio					
Conservazione		2-8°C per 24 ore, -80 °C per periodi più lunghi	temperatura ambiente 24 ore 2-8°C per 72 ore, -20/-70°C per periodi più lunghi	-20/-70°C	

RACCOMANDAZIONI FORTI

- Per studi su virus a RNA l'estrazione deve essere fatta entro 4 ore
- Non conservare i campioni di plasma in "frost-free" freezer

Siero					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	contenitore sterile <i>nuclease free</i> ed eventuale soluzione stabilizzante per RNA	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	in ghiaccio secco	in ghiaccio secco	
Trattamento pre-stoccaggio			separazione da sangue intero: a) provette senza gel separatore: aliquotare entro 24 ore b) provette con gel separatore: separazione non necessaria	separazione da sangue intero: a) provette senza gel separatore: aliquotare entro 4 ore b) provette con gel separatore: separazione non necessaria	
Conservazione		2-8°C per 24 ore, -80 °C per periodi più lunghi	2-8°C per 72 ore, -20/-70°C per periodi più lunghi	2-8°C fino a 5 giorni -20/-70°C per periodi di tempo più lunghi	

Spot di sangue intero su carta					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		spot di sangue periferico su carta assorbente (tipo Whatman) asciugata all'aria per 2h e riposta in sacchetto sterile con dissecante	spot di sangue periferico su carta assorbente (tipo Whatman) asciugata all'aria per 2h e riposta in sacchetto sterile con dissecante	non indicato in saggi per RNA	
Trasporto		temperatura ambiente	temperatura ambiente		
Trattamento pre-stoccaggio					
Conservazione		temperatura ambiente fino a 12 - 18 mesi	fino a 12-18 mesi		

Tamponi					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile con VTM	tamponi di rayon o poliestere in contenitore sterile <i>nuclease free</i> a secco o in fisiologica o in terreno di trasporto appropriato secondo le indicazioni del laboratorio	tamponi di rayon o poliestere in contenitore sterile <i>nuclease free</i> a secco o in fisiologica o in terreno di trasporto appropriato secondo le indicazioni del laboratorio	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	temperatura ambiente fino a 4 ore 2-8°C entro 24 ore	temperatura ambiente fino a 4 ore 2-8°C entro 24 ore	
Trattamento pre-stoccaggio			tamponi a secco vanno risospesi in fisiologica o in terreno di trasporto in ogni caso possono essere centrifugati conservando il pellet	tamponi a secco vanno risospesi in fisiologica o in terreno di trasporto in ogni caso possono essere centrifugati conservando il pellet	
Conservazione		2-8°C per 24 ore; per periodi più lunghi, stemperare accuratamente il tampone nel VTM e conservare quest'ultimo a -80°C	2-8°C per 24 ore -20/-70°C per periodi più lunghi	2-8°C per 24 ore -70°C per periodi più lunghi	

Tessuti, biopsie					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile con VTM	contenitore sterile <i>nuclease free</i> e immediata refrigerazione in ghiaccio umido o congelamento (lavare eventuale presenza di sangue con soluzione salina sterile)	contenitore sterile <i>nuclease free</i> se non immediatamente estratto congelamento a -70°C in presenza di stabilizzanti (lavare eventuale presenza di sangue con soluzione salina sterile)	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	in ghiaccio umido o secco	in ghiaccio secco o azoto liquido	
Trattamento pre-stoccaggio					
Conservazione		2-8°C per 24 ore, -80 °C per periodi più lunghi	2-8°C per 24 ore, -20 °C per due settimane -70°C per periodi più lunghi	-70°C	

Tessuti fissati in formalina ed imbevuti in paraffina					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali*		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		campione non utilizzabile			
Trasporto		-	temperatura ambiente	temperatura ambiente	
Trattamento pre-stoccaggio		-			
Conservazione		-	temperatura ambiente	temperatura ambiente	

* Poco raccomandata: da utilizzare solo se non sono disponibili altri tipi di campioni.

Urine					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta		contenitore sterile	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	contenitore sterile <i>nuclease free</i>	
Trasporto		a) temperatura ambiente per trasporto entro 4 h b) 2-8 °C per tempi di trasporto > 4 h	temperatura ambiente fino a 2-4 ore 2-8°C entro 24 ore	temperatura ambiente fino a 2-4 ore 2-8°C entro 24 ore	
Trattamento pre-stoccaggio					
Conservazione		2-8°C per 24 ore, -80 °C per periodi più lunghi	2-8°C per 24 ore -20/-70°C per periodi più lunghi	2-8°C per 24 ore -70°C per periodi più lunghi	

CAMPIONI DI ORIGINE VETERINARIA

Tipo di campione					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta					
Trasporto					
Trattamento pre-stoccaggio					
Conservazione					

CAMPIONI DI ORIGINE VEGETALE

Tipo di campione					
	Tipo di indagine				
	Ricerca di antigeni virali	Isolamento virale	Ricerca di acidi nucleici virali		Ricerca di particelle virali
			DNA virale	RNA virale	
Raccolta					
Trasporto					
Trattamento pre-stoccaggio					
Conservazione					