

### **Guida Pratica per Utenti (GPU)**

1. Obiettivo.....	2
2. Il laboratorio di Virologia .....	2
2.1 la mission .....	2
2.2 la sede e l'équipe.....	2
2.3 dotazione strumentale .....	2
2.4 gli utenti e la tipologia di prestazioni .....	3
3. L'organizzazione dell'attività diagnostica e le aree.....	3
3.1 Sierologia.....	3
3.2 Caratterizzazione molecolare .....	4
3.3 Ricerca e identificazione di agenti virali .....	5
3.4 Laboratori di Biosicurezza.....	5
4. Attività di diagnostica avanzata .....	6
5. Attività didattica e di ricerca .....	6
6. L'informazione.....	7
6.1 La richiesta degli esami .....	8
6.1.1 da utenti interni e Ambulatori .....	8
6.1.2 da utenti esterni (Ospedali, Enti e altre Istituzioni).....	8
6.2 Campioni biologici.....	9
TABELLA 1 - ISTRUZIONI PER LA RACCOLTA DEI CAMPIONI .....	10
6.3 Scelta dei contenitori .....	11
TABELLA 2 - PROVETTE/ TEST .....	11
6.4 Trasporto e consegna dei campioni .....	12
6.4.1 Modalità di trasporto .....	12
6.4.2 Orari di consegna dei campioni.....	13
6.5 Tempi di risposta.....	13
6.6 Consegna dei referti.....	13
TABELLA 3 - RECAPITI UTILI .....	14

#### **Note ultima revisione**

- Aggiornamento delle informazioni generali contenute nel documento
- Inserimento/aggiornamento della citazione degli allegati alla GPU.

<i>Redatto da</i>		<i>Verificato da</i>		<i>Approvato da</i>	
<i>Funzione: UQ</i>		<i>Funzione:</i>		<i>Funzione:DIR</i>	
<i>Data:</i> 02/18	<i>Firma:</i> A. Amendola	<i>Data:</i> 02/18	<i>Firma:</i>	<i>Data:</i> 02/18	<i>Firma:</i> MR Capobianchi

## **Guida Pratica per Utenti**

### **1. Obiettivo**

La presente Guida ha lo scopo di fornire agli **utenti** dell'INMI (**reparti di degenza e DH INMI, Ambulatori e Day Service INMI, Ospedali ed Istituzioni esterne**) le indicazioni sugli esami effettuabili presso il Laboratorio di Virologia (**Allegato 1** Sinottico esami e **Allegato 2** Elenco Esami), sulle modalità di richiesta degli stessi, di consegna dei campioni al Laboratorio, sui tempi di risposta e la modalità di consegna dei referti per i pazienti interni ricoverati, per i cittadini che si rivolgono agli Ambulatori, per i pazienti di altri Enti, Ospedali, ed Istituzioni.

Le istruzioni per gli Ospedali e le Istituzioni esterne sono estratte dalla **Procedura per l'accettazione dei campioni diagnostici provenienti da utenti esterni** (delib. aziendale n. 999 del 27/12/2005). La presente GPU e gli Allegati sono scaricabili dal sito [www.inmi.it](http://www.inmi.it)

### **2. Il laboratorio di Virologia**

Il Laboratorio è certificato secondo la norma UNI EN ISO 9001:2008 per le attività diagnostiche e per la gestione dei Laboratori di Biosicurezza e relativa attività di formazione - *Sistema di Gestione della Qualità (SGQ) dal 2003*. Il prodotto diagnostico è costantemente monitorato attraverso il controllo di qualità (CQ) interno e la verifica esterna di qualità (VEQ).

#### **2.1 la mission**

Il Laboratorio garantisce l'attività assistenziale e di ricerca nell'area della virologia; interagisce con le UO cliniche per individuare i percorsi diagnostici più appropriati, in rapporto ai bisogni assistenziali e di ricerca; organizza e conduce attività di sperimentazione diagnostica innovativa; fornisce supporto diagnostico H24 a livello nazionale per le infezioni virali emergenti, a livello regionale per lo screening infettivologico dei donatori di organo/tessuto.

#### **2.2 la sede e l'équipe**

Il laboratorio ha sede presso il Padiglione Baglivi dell'INMI.

L'équipe è composta da: direttore, dirigenti biologi, capotecnico e operatori tecnici sanitari, infermiera professionale e ausiliari. Fanno parte dell'équipe anche biologi e tecnici ricercatori con contratto di collaborazione scientifica, che si dedicano principalmente ad attività di ricerca.

#### **2.3 dotazione strumentale**

Il Laboratorio possiede una dotazione strumentale di altissimo livello tecnologico. La maggior parte dei sistemi diagnostici sono interfacciati con il sistema gestionale WLab: i risultati dei test, eseguiti dallo strumento direttamente su provetta madre, vengono trasmessi, previo controllo dell'operatore, al sistema gestionale per la validazione tecnica e clinica, e per la refertazione.

In particolare, per gli esami sierologici:

- la maggior parte degli esami viene eseguita su sistemi diagnostici ad alta processività, completamente automatizzati (chemiluminescenza); i test meno frequenti e quelli di seconda battuta o conferma si eseguono su analizzatori a minor processività, parzialmente automatizzati (ELISA, Blot)

Per gli esami molecolari:

- i test più frequenti (carica virale HIV, HCV e HBV) vengono eseguiti con metodiche Real Time su sistemi diagnostici completamente automatizzati, ad alta processività, con fase di estrazione integrata nel sistema

- le altre determinazioni molecolari ed il sequenziamento nucleotidico vengono eseguiti su analizzatori automatizzati, a minor processività
- la più recente introduzione nel parco tecnologico è un sistema di sequenziamento ad alta processività di ultima generazione, basato su piattaforma 454, utilizzato al momento in ambito di ricerca, principalmente nel campo della caratterizzazione molecolare dei virus.

## 2.4 gli utenti e la tipologia di prestazioni

Il laboratorio svolge attività diagnostica routinaria e avanzata per:

- **utenti interni** (UO degenza ordinaria, DH e Day Service), a prenotazione diretta degli esami tramite il collegamento in rete con il programma gestionale
- **utenti ambulatoriali**, ad accesso diretto dell'utente, con impegnativa SSN del medico (di base o specialista), al CUP del Poliambulatorio che esegue i prelievi e prenota gli esami tramite il programma gestionale
- **altri Ospedali e Istituzioni**, sia della Regione Lazio che di altre Regioni italiane, con richiesta degli esami tramite modulo aziendale (Allegato A2) e consegna dei campioni, tramite corrieri autorizzati, presso l'Accettazione del Laboratorio

Inoltre, il Laboratorio svolge **attività H24 in urgenza** per:

- il **Coordinamento Regionale Trapianti Lazio (CRT)**, per il quale esegue in maniera centralizzata gli esami per l'accertamento della sicurezza infettivologica delle donazioni di organo/tessuto. La centralizzazione ha consentito l'unificazione del flusso informativo relativo ai test eseguiti in urgenza, ed ha rappresentato una svolta importante nella gestione delle fasi preliminari all'attività trapiantologica della Regione
- il **Centro Nazionale Trapianti (CNT)**, per il quale svolge attività di consulenza virologica, ed offre la disponibilità ad eseguire esami non facilmente reperibili nei laboratori che assistono i centri trapianto (es. ricerca molecolare e sierologica per virus emergenti, come il virus West Nile)
- **utenti interni** (UO degenza INMI) ed **altri Ospedali**, per i quali esegue accertamenti microbiologici urgenti (liquor, test per malaria, antigeni batterici urinari)

## 3. L'organizzazione dell'attività diagnostica e le aree

Il laboratorio garantisce l'identificazione e la caratterizzazione di agenti virali (**Allegato 1** Sinottico esami e **Allegato 2** Elenco esami) utilizzando metodi colturali, sierologici e molecolari.

L'attività si articola in quattro grandi aree:

- Sierologia
- Caratterizzazione molecolare
- Ricerca e identificazione di agenti virali
- Laboratori di biosicurezza

### 3.1 Sierologia

I test sierologici vengono utilizzati per la diagnosi di malattie virali attraverso la ricerca di parti di virus (antigeni virali) o di anticorpi verso i vari componenti proteici dei virus stessi.

- ✓ antigeni virali (es. HBsAg, HIVp24, HCVAg)
- ✓ anticorpi (es. CMV IgG/IgM, VZV IgG/IgM)

La diagnosi viene in genere effettuata con metodi basati su chemiluminescenza, ELISA, IF, FC, etc.

Gli anticorpi rilevabili possono essere totali oppure distinti nelle frazioni IgG e IgM. Tale distinzione è utile principalmente per le infezioni a decorso acuto; in genere l'interpretazione dei risultati è la seguente:

IgG - IgM - : stato di suscettibilità all'infezione

IgG - IgM + : fase iniziale acuta (possibile aspecificità se non compaiono le IgG in prelievi successivi)

IgG + IgM + : fase acuta

IgG + IgM - : infezione pregressa

aumento IgG in inf. pregressa (a volte anche IgM) : riattivazione di infezioni latenti o reinfezione

Sono disponibili, inoltre, test accessori o di conferma della presenza delle IgG o IgM, basati su metodi in **Western Blot o ImmunoBlot**.

### **Menu disponibile**

- ✓ Test di screening per HIV di quarta e quinta generazione (HIV Ab/AgCombo)
- ✓ Test di screening per virus epatitici (HAV, HBV, HCV, HDV, HEV)
- ✓ Sierologia per diagnosi e screening di infezioni in ambito prenatale-connatale (CMV e Rosolia); test di avidità delle IgG
- ✓ Sierologia per diagnosi e screening per Morbillo, Parotite, Parvovirus B19
- ✓ Pannello sierologico per virus erpetici (EBV, VZV, HSV-1 e 2, HHV-6, HHV-8)
- ✓ Pannelli per la ricerca di anticorpi fissanti il complemento (FC) per Virus cardiotropi, enterotropi, neurotropi, pneumotropi
- ✓ Test di conferma o test accessori basati su WB o IB per HIV, CMV ed EBV
- ✓ Ricerca di anticorpi per virus emergenti/riemergenti (es.: Chikungunya, Dengue, Hantavirus, West Nile, e altri), basati su IF, ELISA e neutralizzazione

### **3.2 Caratterizzazione molecolare**

L'area riguarda la **ricerca e la quantificazione** di acidi nucleici virali (RNA o DNA) in cellule, liquidi biologici, biopsie, prelievi autoptici, etc.

- La **determinazione quantitativa** dei genomi virali con metodi altamente sensibili e standardizzati serve per il monitoraggio del livello della carica virale in relazione all'utilizzo di protocolli terapeutici per alcune malattie quali l'AIDS o le Epatiti, o al monitoraggio delle infezioni post-trapianto, ed è utile nella stadiazione e valutazione della necessità di iniziare, modificare o interrompere una terapia
- Per alcuni virus, principalmente nei casi in cui non sono disponibili metodi commerciali standardizzati, sono disponibili **metodi quantitativi e qualitativi** elaborati in house sulla base dei dati di letteratura o di esperienza originale, che utilizzano PCR (DNA) e RT-PCR (RNA) in formato classico o real-time
- La **tipizzazione** virale viene eseguita in genere mediante sequenziamento di prodotti di PCR, amplificazione in real-time PCR o ibridazione su array, e viene impiegata per l'identificazione e caratterizzazione di varianti, l'identificazione di genotipi, la ricerca di mutazioni associate a resistenza, etc.

### **Menu disponibile**

Il pannello offerto per la diagnosi virologica molecolare comprende la quasi totalità dei virus di importanza medica nell'uomo. Si riportano alcune applicazioni salienti:

- ✓ **Determinazione quantitativa**  
HIV-1, HIV-2, HCV, HBV  
CMV, EBV e BKV  
HSV-1 e 2, VZV, HHV-6, HHV-8, JCV, Parvovirus B19
- ✓ **Determinazione qualitativa**  
HDV, HEV, GBV-C, TTV, ADV, Enterovirus, V. influenzali, Morbillo, Parotite, Rosolia, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus, HTLV I/II, JEV, TBE, WNV, YFV, Alkhurma e altri virus rari/emergenti
- ✓ **Tipizzazione virale**  
Sequenziamento per determinazione di genotipo e farmaco-resistenza: HIV, HCV, HBV e per l'identificazione/caratterizzazione di virus emergenti (Dengue, WNV, ecc.); sequenziamento o ibridazione su array per l'HPV; amplificazione in real-time ceppo-specifiche per la tipizzazione dell'influenza A e per la genotipizzazione di HCV.

### **Pannelli molecolari**

In considerazione del fatto che spesso le malattie virali si presentano con sintomi simili che non possono essere collegati ad uno specifico agente, e allo scopo di favorire l'appropriatezza della richiesta, il laboratorio ha predisposto **pannelli di esami molecolari** raggruppati per presentazione clinica e tropismo.

- ✓ **Virus Cardiotropi** (Enterovirus, Parvovirus B19, ADV, CMV, EBV, HHV-6)
- ✓ **Virus Enterotropi** (ADV, Enterovirus, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus)
- ✓ **Virus Neotropi** (JCV, CMV, EBV, HSV-1 e 2, VZV, Enterovirus, Morbillo, Parotite)
- ✓ **Virus Respiratori** (Influenza A e B, ADV e Bocavirus, Coronavirus e Parainfluenza 1-4, Rinovirus e Enterovirus, RSV e Metapneumovirus)

### **3.3 Ricerca e identificazione di agenti virali**

L'area riguarda principalmente i metodi colturali per l'isolamento virale. Comprende anche la ricerca di anticorpi specifici mediante saggi di neutralizzazione.

E' un approccio di alta specializzazione, impiegato soltanto in laboratori particolarmente attrezzati, dotati di strutture ad elevato livello di biocontenimento, e di personale esperto in virologia classica. Tale approccio utilizza un pannello di colture cellulari di origine umana o animale che consente la moltiplicazione di un eventuale agente virale presente nel campione biologico; inoltre, esso risulta particolarmente utile quando si vuole ricercare un agente eziologico in un quadro definito per sindrome oppure quando, come ad esempio nella reinfezione o riattivazione da CMV, si vuole dare un significato diagnostico alla positività dei test di biologia molecolare.

### **Menu disponibile**

- Coltivazione e identificazione di virus su vari substrati cellulari (Fibroblasti diploidi, Vero, Hep2, MDCK, A549)
- Isolamento rapido del CMV mediante Shell Vials
- Titolazione di anticorpi neutralizzanti, per conferma di diagnosi in caso di test di screening cross reattivi e/o per controllo vaccinazione (Flavivirus, Poliovirus, e altri virus)

### **3.4 Laboratori di Biosicurezza**

Sono nati in risposta all'esigenza di creare un ambiente idoneo per quelle attività diagnostiche e di ricerca che richiedono particolari misure di protezione per gli operatori e per l'ambiente; il loro

utilizzo è progressivamente cresciuto sull'onda delle emergenze infettivologiche che hanno caratterizzato gli ultimi anni.

Tali laboratori sono inseriti in un contesto normativo e scientifico di livello internazionale, e sono partner in alcuni network di cooperazione sopranazionale finalizzati al potenziamento delle capacità diagnostiche delle reti di laboratori in ambito internazionale.

Nei laboratori di Biosicurezza, a scopo diagnostico, viene eseguita l'iniziale manipolazione e la inoculazione su colture cellulari di materiali biologici provenienti da pazienti sospetti di albergare virus di livello 3 e 4. Gli isolati virali così ottenuti vengono caratterizzati con metodi biologici (all'interno dei laboratori di biosicurezza) o, dopo averne inattivato l'infettività, con metodi molecolari, in condizioni di biocontenimento meno stringenti.

#### **4. Attività di diagnostica avanzata**

Le attività diagnostiche svolte dal Laboratorio comprendono, oltre al pannello completo di **esami virologici routinari** basati su metodi immunometrici, numerosi **esami ad elevato contenuto tecnologico**, utilizzati da utenti esterni ambulatoriali e da numerose Istituzioni del Lazio e di altre Regioni:

- isolamento virale e caratterizzazione biologica e molecolare degli isolati
- esami che necessitano di condizioni di elevato biocontenimento (BSL3 e 4)
- esami basati sul sequenziamento genico, utilizzato per l'identificazione e la caratterizzazione di varianti virali
- test genotipici e fenotipici virali per la ricerca di mutazioni associate a resistenza (HIV, HBV ed HCV) e per la determinazione del tropismo (HIV)
- esami molecolari finalizzati alla gestione di eventi epidemici, comprendenti la caratterizzazione molecolare e l'analisi filogenetica per l'identificazione di cluster nosocomiali di infezioni virali
- test genotipici per la rilevazione di polimorfismi legati alla resistenza a terapie antivirali

Riguardo ai virus emergenti/riemergenti ed ai virus responsabili di malattie rare, l'elenco degli esami **Menu diagnostico per i principali virus emergenti (Allegato 3)**, con le relative istruzioni e gli eventuali moduli da compilare, è scaricabile dal sito [www.inmi.it](http://www.inmi.it). Tali esami sono richiedibili previo contatto diretto con il Laboratorio.

L'esperienza e la qualificazione acquisita nel corso degli anni, unica nel panorama nazionale, ha reso possibile lo sviluppo di **percorsi diagnostici di eccellenza**, tra i quali:

- ✓ Menu di laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle epatiti virali (inclusa la determinazione di genotipo e la valutazione di farmacoresistenza)
- ✓ Diagnostica virologica nel monitoraggio dei trapianti
- ✓ Menu di laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio dell'infezione da HIV (inclusa la determinazione di genotipo e la valutazione di tropismo e di farmacoresistenza)
- ✓ Diagnosi eziologica delle infezioni respiratorie ad eziologia virale
- ✓ Diagnosi di virus emergenti e riemergenti

#### **5. Attività didattica e di ricerca**

L'attività di formazione impegna il laboratorio di Virologia sia nella organizzazione che nella partecipazione ad eventi formativi.

Molti degli eventi promossi hanno conseguito l'accreditamento ECM. In particolare, sono stati svolti numerosi eventi formativi relativi alle emergenze infettivologiche, condotti in collaborazione

con l'UOC Microbiologia e Banca Biologica, ed è sempre attivo il programma di formazione continua per gli operatori destinati alle attività nei laboratori di biosicurezza.

Il direttore ed i dirigenti del laboratorio svolgono regolarmente attività di docenza in corsi formativi e di aggiornamento per dirigenti, personale infermieristico e tecnico-sanitario dell'Istituto, su tematiche di laboratorio correlate alla clinica. Sono, inoltre, relatori invitati in Corsi di formazione, Congressi Nazionali ed Internazionali nei settori di eccellenza dell'Istituto.

Tutto il personale partecipa, in ruolo di discente, a corsi di aggiornamento formativo organizzati dall'Istituto ed a corsi di aggiornamento su strumenti evoluti e tecnologie innovative.

Il laboratorio coniuga, nell'ambito delle malattie infettive, le attività di assistenza con la ricerca scientifica, svolta in collaborazione con altre UO dell'INMI.

Le aree di ricerca riguardano: HIV, epatiti, HPV, patogeni emergenti, patogenesi delle infezioni virali, meccanismi di difesa antivirale, innovazione diagnostica, biosicurezza.

Oltre ai temi indicati, il laboratorio fornisce supporto alle sperimentazioni cliniche ed alle altre attività di ricerca condotte nell'Istituto, fornendo tutta la gamma necessaria di attività diagnostica virologica routinaria ed avanzata.

Si elencano più in dettaglio alcuni temi di ricerca:

- ✓ Fattori virali coinvolti nella patogenesi e nella risposta alle terapie dell'infezione da HIV, HCV ed HBV
- ✓ Fattori dell'ospite che condizionano l'andamento naturale e la risposta alle terapie nell'infezione da HIV, HCV ed HBV
- ✓ Caratterizzazione molecolare e filogenetica di virus coinvolti in episodi di trasmissione nosocomiale
- ✓ Allestimento e validazione di metodi diagnostici innovativi per le infezioni virali, con particolare riferimento ai metodi molecolari
- ✓ Studi dei reservoir virali nelle infezioni croniche
- ✓ Infezioni nell'ospite immunocompromesso, inclusi i soggetti trapiantati o esposti a terapie immunosoppressive
- ✓ Caratterizzazione molecolare e biologica di patogeni nuovi ed emergenti
- ✓ Sviluppo di percorsi integrati per la biosicurezza

## **6. L'informazione**

L'elenco degli esami è riportato nel "**Sinottico Esami**" (**Allegato 1**), che indica, ove univoca, anche la tipologia del campione; informazioni più ampie, relative anche alle sezioni di riferimento e ai tempi di risposta, sono fornite nel "**Elenco degli esami virologici**" (**Allegato 2**).

Il **menù diagnostico per i principali virus emergenti** e le relative istruzioni sono contenuti nell'**Allegato 3**. Tra le istruzioni sono inclusi i moduli di segnalazione, che vanno compilati dai richiedenti, avendo cura di concordare con il referente del Laboratorio le modalità di invio dei campioni ed i tempi di refertazione.

Alcuni esami inclusi nel menù ordinario richiedono la compilazione di alcuni moduli, come di seguito specificato.

Il "**Sinottico Sierologia HIV**" (**Allegato 4**) va compilato con i dati anagrafici aggiuntivi, necessari alla registrazione del test in quanto previsti dalla normativa vigente in materia, e deve sempre accompagnare il campione.

Inoltre, anche se la prenotazione degli esami avviene per via informatica, vanno compilati i moduli di richiesta di genotipo/farmaco resistenza per HIV [**Scheda Genotipo HIV** (**Allegato 5**) o **Scheda**

**Genotipo HIV** per l'Ambulatorio (**Allegato 5B**), genotipo/farmaco resistenza per HBV [**Scheda Genotipo HBV (Allegato 6)**] e genotipo/farmaco resistenza per HCV [**Scheda HCV resistenze (Allegato 8)**].

L'**Allegato 7** contiene le "Istruzioni operative per l'invio di campioni di pazienti con sospetta infezione da Virus Ebola", in riferimento alla epidemia verificatasi recentemente in Africa. Tali istruzioni operative, corredate da materiale illustrativo (Il virus e la diagnosi), vengono aggiornate in tempo reale direttamente alla pagina [http://www.inmi.it/procedure\\_operative\\_virus\\_ebola.html](http://www.inmi.it/procedure_operative_virus_ebola.html) del sito dell'Istituto.

## **6.1 La richiesta degli esami**

### **6.1.1 da utenti interni e Ambulatori**

Gli esami vengono richiesti da parte delle **UO interne informatizzate** (per i pazienti interni) e del **Poliambulatorio** (per i pazienti ambulatoriali) tramite trasmissione in rete.

Gli operatori delle suddette strutture procedono direttamente all'accettazione degli esami, utilizzando il programma WLab: inseriscono i dati anagrafici nella scheda informatizzata del paziente, selezionano i test e indicano, ove richiesto, la tipologia del campione. Stampano, inoltre, le etichette con codice a barre, relative alle varie provette o agli altri contenitori per i campioni, applicandole prima di procedere al prelievo. Compilano inoltre, ove richiesti, i moduli che vanno consegnati insieme ai campioni.

Gli operatori della Virologia acquisiscono dalla rete tutte le richieste di esami.

Qualora non sia possibile effettuare la procedura informatizzata, la richiesta di esami deve pervenire al Laboratorio di Virologia in forma cartacea, con il **Sinottico Esami** (Allegato 1) e con gli eventuali altri moduli (**Sinottico Sierologia HIV**, **Scheda Genotipo HIV**, **Scheda Genotipo HBV**, **Scheda HCV resistenze**), secondo gli esami richiesti. I moduli devono essere accuratamente compilati e firmati.

### **6.1.2 da utenti esterni (Ospedali, Enti e altre Istituzioni)**

**Gli utenti esterni** richiedono gli esami tramite il modulo aziendale, **Allegato A2** e il **Sinottico esami** (Allegato 1) compilato in ogni sua parte, con tutti i dati richiesti, compreso il numero di telefono e di fax della struttura richiedente. Gli esami richiesti tramite Allegato A2 vengono compensati secondo il **Tariffario Istituzionale**, periodicamente aggiornato.

E' essenziale che i dati anagrafici del paziente siano completi e riportati con grafia chiara. E' necessario che sull'Allegato A2 non si adottino richieste generiche, quali "esami virologici o ricerche virali" ma che venga consultato, a tale scopo, l'**Elenco degli esami virologici** (Allegato 2), che riporta anche la tipologia di campione e di provette da utilizzare, oppure che venga contattato in caso di dubbio il personale del laboratorio al fine di identificare l'esame più opportuno.

L'**Allegato A2** deve essere firmato dal medico e dal Direttore Sanitario della struttura richiedente. Qualora esista una specifica Convenzione tra la struttura richiedente e l'INMI, la firma del Direttore Sanitario non è necessaria. L'indicazione del medico richiedente è utile per un eventuale contatto, in caso servissero chiarimenti o ulteriori informazioni.

L'**Allegato A2** può essere anticipato via fax al Laboratorio (fax 06 55170676 o 06 5594555). Se il richiedente desidera ricevere il referto tramite fax, è necessario che tale esigenza venga **esplicitamente segnalata e sottoscritta sul modulo Allegato A2**, con l'indicazione del numero di fax ricevente. La sottoscrizione di tale richiesta comporta l'implicita assicurazione che il fax sia custodito e inaccessibile a persone non autorizzate alla consultazione di dati sensibili.



## **6.2 Campioni biologici**

### ***Principali tipologie di campioni per analisi sierologiche***

Gli anticorpi vengono generalmente ricercati nel sangue o, più raramente, nel liquor; in occasioni particolari, è possibile effettuare la ricerca anche in altri liquidi biologici.

- Sangue (in genere senza anticoagulanti, in provetta da siero)
- Liquor
- Altri liquidi biologici

### ***Principali tipologie di campioni per analisi virologiche e di biologia molecolare***

- Sangue (periferico o, più raramente, midollare) con o senza anticoagulanti
- Urina
- Tampone faringeo o nasofaringeo; Tampone oculare; Tampone uretrale; Tampone vaginale; Tampone cutaneo; Tampone rettale; Altri tamponi
- Feci
- Espettorato, Broncolavaggio (BAL)
- Biopsie
- Liquor
- Liquido amniotico
- Essudati
- Altri liquidi biologici

**TABELLA 1 - ISTRUZIONI PER LA RACCOLTA DEI CAMPIONI**

<b>Sangue periferico o midollare</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 5 ml di sangue in provetta con EDTA (tappo lilla) per <i>Antigenemia CMV, Isolamento virale, PCR e RT-PCR</i></li> <li>▪ 7 ml di sangue in provetta con EDTA (tappo lilla grande) per <i>Viremia HIV, HBV, HCV e WNV</i></li> <li>▪ 7 ml di sangue in provetta senza additivi (tappo giallo) per <i>PCR, RT-PCR, Ricerca di anticorpi</i></li> </ul>
<b>Tamponi</b> (faringeo, oculare, uretrale, cutaneo, rettale, etc.)	<p>Utilizzare appositi tamponi (preferenzialmente floccati) con terreno di trasporto per virus.</p> <p>Il Laboratorio è in grado di fornire, su richiesta, il materiale di trasporto adeguato; in alternativa può essere utilizzato 1 ml di soluzione fisiologica sterile. <b>In ogni caso non devono essere usati terreni di trasporto per batteriologia.</b></p> <p>Effettuare il prelievo in condizioni di asepsi tenendo separati campioni provenienti da zone anatomiche diverse; bagnare la punta del tampone nel terreno di trasporto e strofinare il tampone sulla sede prescelta per il prelievo, cercando di raccogliere materiale biologico. Inserire il tampone nella provetta contenente il terreno, spezzare il bastoncino se troppo lungo, richiudere il tappo, e trasportare al più presto in laboratorio, mantenendo il campione a +4°C.</p> <p>Il tampone nasofaringeo per la ricerca di virus influenzale e altri virus respiratori richiede un volume di terreno di trasporto 2 ml.</p>
<b>Prelievo di liquido vescicolare</b>	<p>Effettuare il prelievo in condizioni di asepsi; utilizzare una siringa sterile da insulina, pungere la vescicola e aspirarne il contenuto. Depositare il liquido vescicolare in una provetta contenente terreno di trasporto per virus, lavando ripetutamente l'ago e la camera interna della siringa con lo stesso terreno di trasporto.</p> <p>Se la lesione è aperta, il prelievo va eseguito mediante tampone (vedi sopra). Trasportare al più presto in laboratorio, mantenendo il campione a +4°C.</p>
<b>Feci</b>	<p>Raccogliere un piccolo quantitativo di feci nell'apposito contenitore. Trasportare al più presto in laboratorio, mantenendo il campione a +4°C.</p>
<b>Broncolavaggio (BAL)</b>	<p>Effettuare il prelievo in condizioni di asepsi; utilizzare soluzione fisiologica sterile, eventualmente addizionata con antibiotici e porre il materiale in contenitore sterile. Trasportare al più presto in laboratorio, mantenendo il campione a +4°C.</p>
<b>Biopsie</b>	<p>Effettuare il prelievo in condizioni di asepsi, tenendo separati campioni provenienti da tessuti o zone diversi.</p> <p>Porre i campioni in 1-2 ml di soluzione fisiologica sterile addizionata di antibiotici o di terreno di trasporto per virus. Non va utilizzata soluzione fissativa. I campioni autoptici vanno raccolti entro 24 ore dal decesso.</p>
<b>Liquor, Urine, Essudati, Liquido amniotico e altri Liquidi biologici</b>	<p>Raccogliere i campioni con modalità di asepsi in contenitore sterile. Inviare al più presto al laboratorio, mantenendo i campioni a +4°C. Non sono necessari terreni di trasporto.</p>

### 6.3 Scelta dei contenitori

La scelta dei contenitori (provette) per la raccolta e l'invio dei campioni varia a seconda dei test richiesti.

Nell'accettazione degli esami con trasmissione in rete, la tipologia delle provette viene indicata direttamente dal programma, che consente anche la stampa delle corrispondenti etichette con il codice a barre. Per maggiore completezza, nella **Tabella 2** vengono riportate le principali tipologie di contenitori utilizzati dalla Virologia, per singolo esame o per gruppi di esami, e la tipologia dei campioni.

In tale tabella, i test sono raggruppati in modo che ad ogni gruppo di esami corrisponda una sola provetta per la raccolta del relativo campione, in quantità sufficiente per eseguire tutti gli esami ad essa collegati. Ad esempio, per eseguire tutti gli esami per la determinazione dei *markers* dell'epatite A, B, C, delta ed E è sufficiente una sola provetta (Sierologia Epatite, provetta da siero). Gli utenti interni, in genere, ritirano i contenitori presso la Farmacia; particolari tipologie di contenitori (es. provettine per biopsie, provette con terreno di trasporto per virus, provette con soluzione fisiologica, etc.) possono essere ritirate, su richiesta, presso la Virologia.

**TABELLA 2 - PROVETTE/ TEST**

<b>Provetta/contenitore</b>	<b>Test, gruppo test/provetta</b>
<i>Provetta sangue 7 ml (T. giallo virologia)</i>	Sierologia Virus (incluso FC e Neutralizzazione)
<i>Provetta sangue 7 ml (T. giallo virologia)</i>	Sierologia HIV
<i>Provetta sangue 7 ml (T. giallo virologia)</i>	Sierologia Epatite
<i>Provetta sangue con EDTA, 7 ml (T. lilla grande)</i>	HBV DNA Quantitativa - HBV genotipo e farmacoresistenze
<i>Provetta sangue con EDTA, 7 ml (T. lilla grande)</i>	HCV RNA Quantitativa - HCV genotipo e farmacoresistenze
<i>Provetta sangue 7 ml (T. giallo virologia)</i>	PCR e RT-PCR di TTV, GBV-C e HDV
<i>Provetta sangue 7 ml (T. giallo virologia)</i>	PCR, RT-PCR siero (Parvovirus B19, Adenovirus)
<i>Provetta sangue con EDTA, 7 ml (T. lilla grande)</i>	HIV RNA Quantitativa - HIV genotipo e farmacoresistenze
<i>Provetta sangue con EDTA, 5 ml (T. lilla piccola)</i>	PCR, RT-PCR sangue (JCV, HHV6, HHV8, Virus della Rosolia)
<i>Provetta sangue con EDTA, 5 ml (T. lilla piccola)</i>	CMV Quantitativa
<i>Provetta sangue con EDTA, 5 ml (T. lilla piccola)</i>	EBV Quantitativa
<i>Provetta sangue con EDTA, 5 ml (T. lilla piccola)</i>	BKV Quantitativa, JCV Quantitativa
<i>Provetta sangue con EDTA, 5 ml (T. lilla piccola)</i>	CMV Antigenemia, Isolamento sangue
<i>Provetta sangue con EDTA, 5 ml (T. lilla piccola)</i>	HIV DNA provirale; HTLV 1/2

## 6.4 Trasporto e consegna dei campioni

### 6.4.1 Modalità di trasporto

I prelievi devono essere eseguiti e mantenuti in condizioni di asepsi e la consegna al Laboratorio deve essere effettuata nel più breve tempo possibile dopo il prelievo.

- I *campioni di sangue* vanno trasportati a temperatura ambiente; è fortemente raccomandato che la consegna venga effettuata nello stesso giorno del prelievo
- I *campioni di liquor ed altri liquidi biologici* diversi dal sangue, che devono essere sottoposti a test di biologia molecolare (*PCR, sequenziamento, etc.*) o a ricerca e caratterizzazione di virus mediante metodo biologico (*isolamento virale*), vanno trasportati a freddo (+4°C) o in ghiaccio e devono essere consegnati al più presto al Laboratorio
- I *campioni non liquidi* non devono in nessun caso essere mantenuti a secco fino alla consegna, ma devono essere introdotti in idonei terreni di trasporto (terreno di trasporto per virus o Soluzione Fisiologica), per affrontare il trasporto in condizioni idonee

Per gli altri Ospedali e Istituzioni esterne:

- **In caso di spedizione o di tragitto lungo**, i campioni di sangue per *indagini sierologiche*, vanno sierati: è consigliabile spedire sieri (a +4°C) piuttosto che sangue intero, che può emolizzare
- Nell'impossibilità di recapitare i *campioni di liquor ed altri liquidi biologici* nei tempi e con le modalità indicate, è possibile congelarli a  $\leq 20^{\circ}\text{C}$  e poi trasportarli in Laboratorio in ghiaccio secco o con altro refrigerante. I ripetuti scongelamenti compromettono gravemente l'esito dei test biologici e molecolari. Un trasporto *non conforme* alle indicazioni può dare luogo a dei risultati falsamente negativi. Per il sangue, il congelamento della provetta di raccolta è accettabile se la provetta contiene il gel separatore e dopo centrifugazione. In caso contrario, è necessario separare la parete liquida da analizzare, che può essere congelata. Per dubbi o ulteriori chiarimenti su casi particolari rivolgersi al laboratorio
- Nel caso di *prelievi autoptici*, i campioni liquidi vanno inviati secondo quanto sopra indicato; i tessuti devono essere conservati sterilmente a  $-80^{\circ}\text{C}$  e inviati in ghiaccio secco per garantire l'integrità degli acidi nucleici. L'opportunità di inserire i tessuti in liquido di trasporto prima del congelamento va discussa con gli operatori del Laboratorio. E' comunque controindicato l'invio di campioni prelevati dopo le prime ore dal decesso, in quanto l'integrità degli acidi nucleici è fortemente compromessa

I campioni che presentano Non-Conformità verranno accettati con riserva. La Non-Conformità, se comporta la non eseguibilità dell'analisi, sarà segnalata nel più breve tempo possibile ai richiedenti; in caso di non conformità minore, la rilevazione verrà comunque comunicata agli interessati mediante una nota allegata al referto.

Per informazioni più approfondite, quali modalità di etichettatura dei campioni diagnostici per la spedizione, criteri di accettabilità, criteri di rilevazione e trattamento delle Non Conformità, si rimanda alla **Procedura aziendale per l'accettazione dei campioni diagnostici provenienti da utenti esterni.**

#### **6.4.2 Orari di consegna dei campioni**

Il Laboratorio di Virologia è in funzione H24, ed è in grado di accettare i campioni durante tutto l'orario di apertura per i reparti INMI e per tutti i campioni con carattere di urgenza provenienti dai reparti INMI e dalle strutture esterne convenzionate.

Per i campioni provenienti dalle strutture esterne non urgenti, la consegna di campioni è regolamentata come di seguito: lunedì-sabato dalle 7,30 alle 13,30.

I campioni prelevati al poliambulatorio dell'INMI (entro le ore 12.30) sono trasportati al Laboratorio di Virologia (presso Padiglione Baglivi) a cura degli operatori del Poliambulatorio.

I campioni prelevati in reparti di degenza, DH e DS, e che rientrano nella routine diagnostica, sono trasportati all'Accettazione del Laboratorio di Virologia (presso Padiglione Baglivi) a cura degli operatori dei reparti INMI.

I test virologici eseguibili in urgenza sono gli stessi resi disponibili per i trapianti (markers dell'epatite e *HIV Ab/Ag*, viremie per HBV, HCV, HIV) e gli accertamenti microbiologici urgenti (analisi del liquor, malaria, antigeni batterici urinari).

In caso di particolari esigenze cliniche indifferibili, possono essere eseguiti altri esami, previa valutazione congiunta con il dirigente di turno in relazione all'appropriatezza e alla fattibilità.

#### **6.5 Tempi di risposta**

Nell'"**Elenco degli esami virologici**" (Allegato 2) sono riportati anche i tempi di risposta, indicati **con riferimento ai giorni lavorativi, per pazienti interni** (reparti e DH, **Poliambulatorio** incluso PP e UO) **e per utenti esterni**. Per questi ultimi, in caso di esami multipli, il referto completo viene stampato e consegnato in un'unica soluzione, non appena sono pronti tutti i risultati.

In particolare i tempi di refertazione per il Poliambulatorio sono stati ridotti di due giorni per quasi tutti gli esami. Tale riduzione è stata resa possibile dall'attivazione della firma digitale su WLab. Infatti, dal 4 Novembre 2013, in ottemperanza alle normative italiane ed europee sulla dematerializzazione dei documenti e l'istituzione della firma digitale, il laboratorio di Virologia **non stampa più referti cartacei per il Poliambulatorio ma appone la firma digitale sui referti, pubblicandoli in PDF nel Repository unico** di tutti i laboratori dell'INMI, riducendo di conseguenza i tempi amministrativi richiesti dalla consegna cartacea.

I test sierologici per HIV, invece, continuano ad essere refertati a parte, in cartaceo, non appena pronti, sia per utenti interni che per quelli esterni.

Per particolari necessità, incluso quelle sopraindicate come urgenze, si possono concordare con i dirigenti del Laboratorio tempi e modalità differenti per singoli casi, compatibilmente con i tempi delle procedure analitiche e l'organizzazione del Laboratorio.

#### **6.6 Consegna dei referti**

- **per UO interne**

I referti per i reparti vengono depositati, a cura degli operatori della Virologia, nelle apposite caselle allocate presso la Segreteria dell'ex Laboratorio Analisi, entro le ore 9.00 del giorno successivo alla stampa; il personale addetto, afferente ai Servizi e Reparti che hanno effettuato la richiesta, ritira direttamente i referti.

**I risultati degli esami già validati (ad eccezione della sierologia HIV) sono visibili per le UO interne e gli Ambulatori, attraverso il Web aziendale.** I medici e gli infermieri sono pertanto in grado di accedere ai risultati appena pronti, per acquisire la conoscenza di notizie utili alla gestione dei pazienti in anticipo rispetto alla refertazione formale, che può subire rallentamenti dovuti all'esigenza di completezza del referto finale.

- **Per Poliambulatorio**

I referti pubblicati in pdf e firmati digitalmente dai dirigenti della Virologia vengono stampati direttamente dagli operatori del Poliambulatorio, Prevenzione Prenatale e Unità Operativa.

• **Per Ospedali e Istituzioni**

I referti per gli utenti esterni si ritirano direttamente presso l'Accettazione del Laboratorio di Virologia, dal lunedì al sabato, dalle 8.30 alle ore 13.30. Qualora la struttura esterna segnali esplicitamente sull'*Allegato A2* l'esigenza di ricevere il referto **via fax**, l'Accettazione del laboratorio provvederà alla trasmissione via fax dei referti richiesti. Resta inteso che la richiesta di ricevere il referto via fax comporta l'implicita assicurazione da parte del richiedente che il fax sia custodito e inaccessibile a persone non autorizzate alla consultazione di dati sensibili.

**Per gli esami sierologici relativi ad HIV i referti vengono consegnati esclusivamente in formato cartaceo.**

**TABELLA 3 - RECAPITI UTILI**

	Numero di telefono	Numero di telefono interno
Urgenza H24	06 55170666 Cell: 3204343793	2666
<b>Virologia</b>		
Accettazione	06 55170674 06 55170698 Fax 06 55170 676	2674 2698
Segreteria	06 55170 690 e-mail: segreviro@inmi.it	2690 e-mail: segreviro@inmi.it
Capotecnico: Cocco	06 55170691	2691
<b>Dirigenti</b>		
Abbate	06 55170655	2655
Amendola	06 55170660	2660
Garbuglia, Valli	06 55170692	2692
Bordi, Meschi	06 55170693	2693
Castilletti, Lalle	06 55170694	2694
Forbici	06 55170654	2654
Carletti	06 55170657	2657