



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII  
INSTITUTUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ  
NATIONAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH



Str. Dr.A. Leonte, Nr. 1 - 3, 050463 Bucuresti, ROMANIA  
Tel: \*(+40 21) 318 36 20, Director: (+40 21) 318 36 00, (+40 21) 318 36 02, Fax: (+40 21) 312 3426

---

**CENTRUL NAȚIONAL de SUPRAVEGHERE și CONTROL AL BOLILOR TRANSMISIBILE**  
Tel.: (+40 21) 317 9702 Fax: (+40 21) 318 3634 ; E-mail: [cnscht@insp.gov.ro](mailto:cnscht@insp.gov.ro)

# Aspecte privind investigațiile de laborator pentru COVID-19, integrate cu cele pentru gripă, în sezonul 2020-2021

# ILI - Algoritm de recoltare și investigare



Ritm de recoltare

Săptămâna 40 → până la debutul sezonului gripal

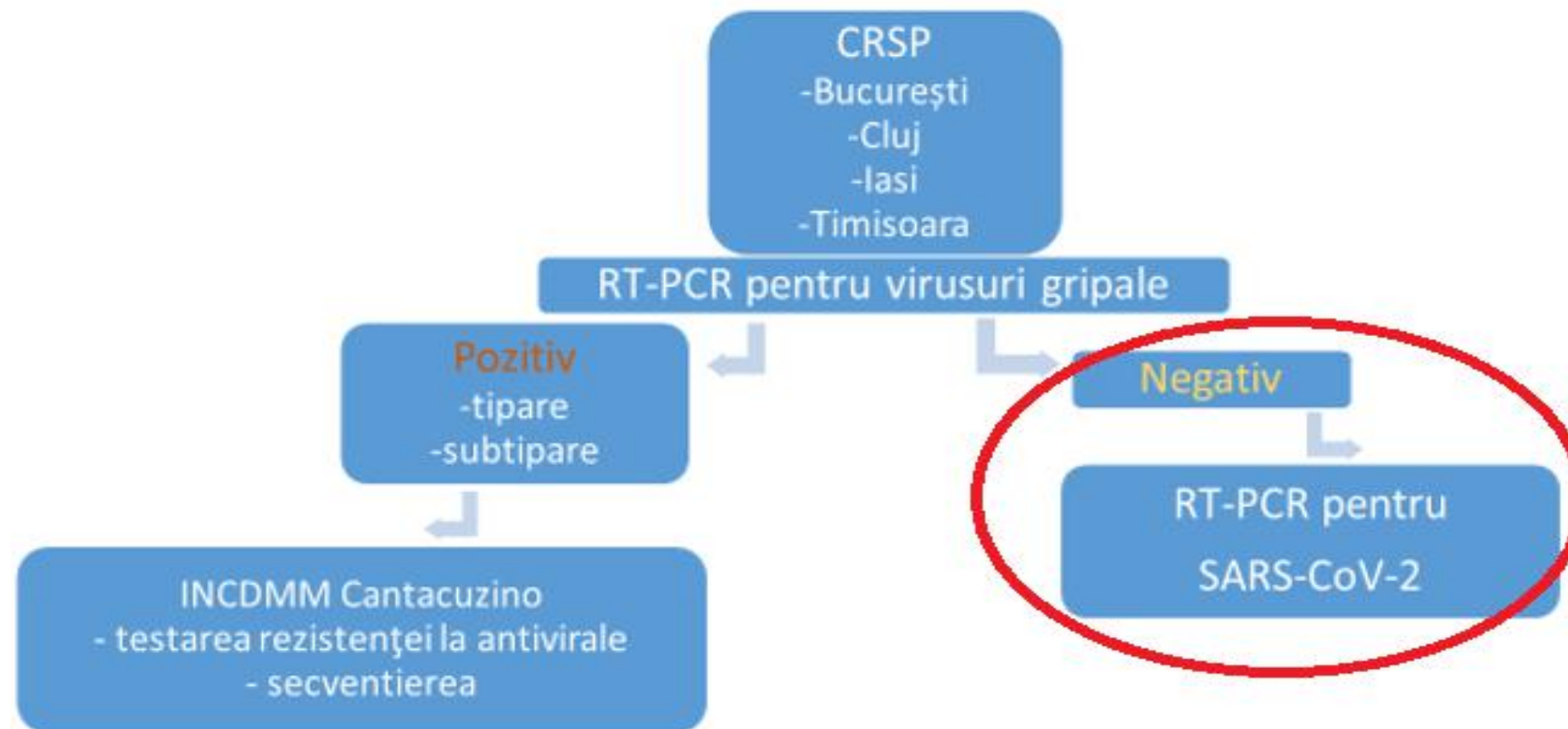


După debutul sezonului gripal, algoritmul de recoltare stabilit de CNSCBT

Sezonul gripal 2020-2021      Pandemia de COVID-19

un grad mai mare de severitate a infecțiilor respiratorii acute

abordarea integrată a celor două etiologii în cadrul supravegherii epidemiologice a infecțiilor respiratorii acute





MINISTERUL SĂNĂȚII  
INSTITUTUL NAȚIONAL DE SĂNĂȚATE PUBLICĂ  
NATIONAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH



Str. Dr.A. Leonte, Nr. 1 - 3, 050463 Bucuresti, ROMANIA  
Tel: \*(+40 21) 318 36 20, Director: (+40 21) 318 36 00, (+40 21) 318 36 02, Fax: (+40 21) 312 3426

CENTRUL NAȚIONAL de SUPRAVEGHERE și CONTROL AL BOLILOR TRANSMISIBILE  
Tel.: (+40 21) 317 9702 Fax: (+40 21) 318 3634 ; E-mail: [cnsct@insp.gov.ro](mailto:cnsct@insp.gov.ro)

## Diagnosticarea unui caz de SARI într-o unitate sentinelă



se va recolta o singură probă biologică/caz



CRSP: București, Cluj, Timișoara, Iași

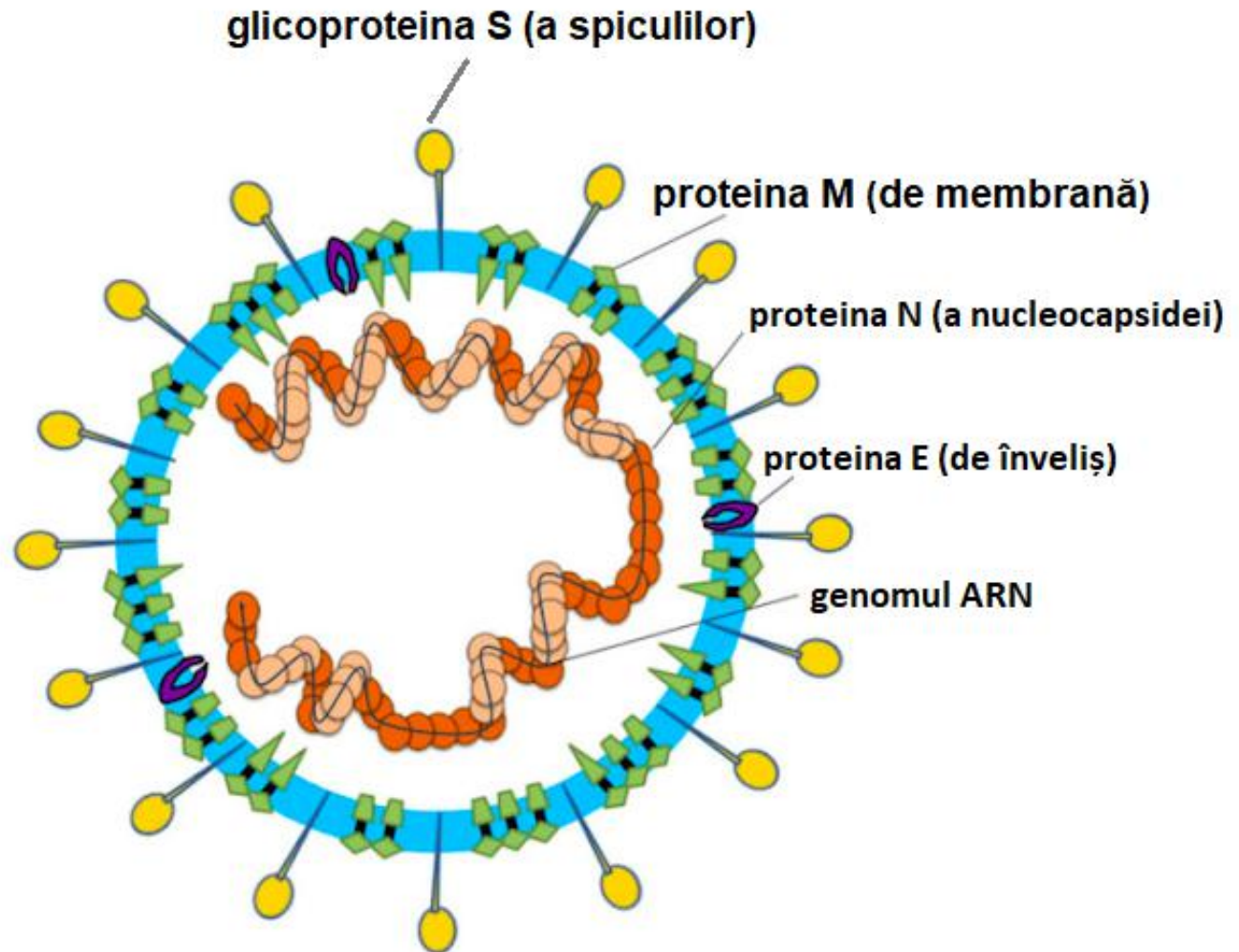


RT-PCR pentru detecția virusurilor gripale și SARS-CoV-2

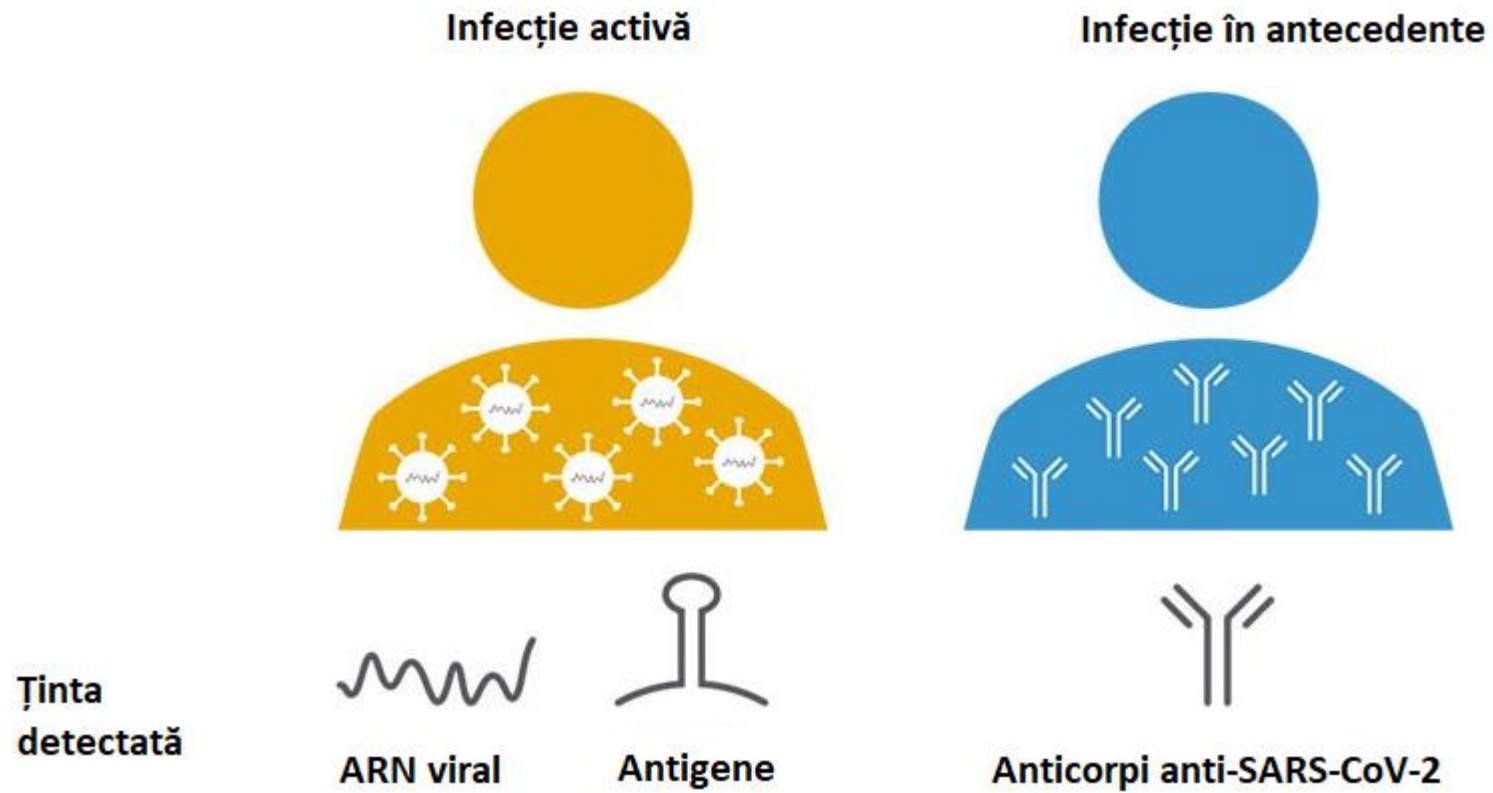
COVID-19 (*Coronavirus infectious disease – 2019*)

SARS-CoV-2 (coronavirusul sindromului respirator acut sever 2)

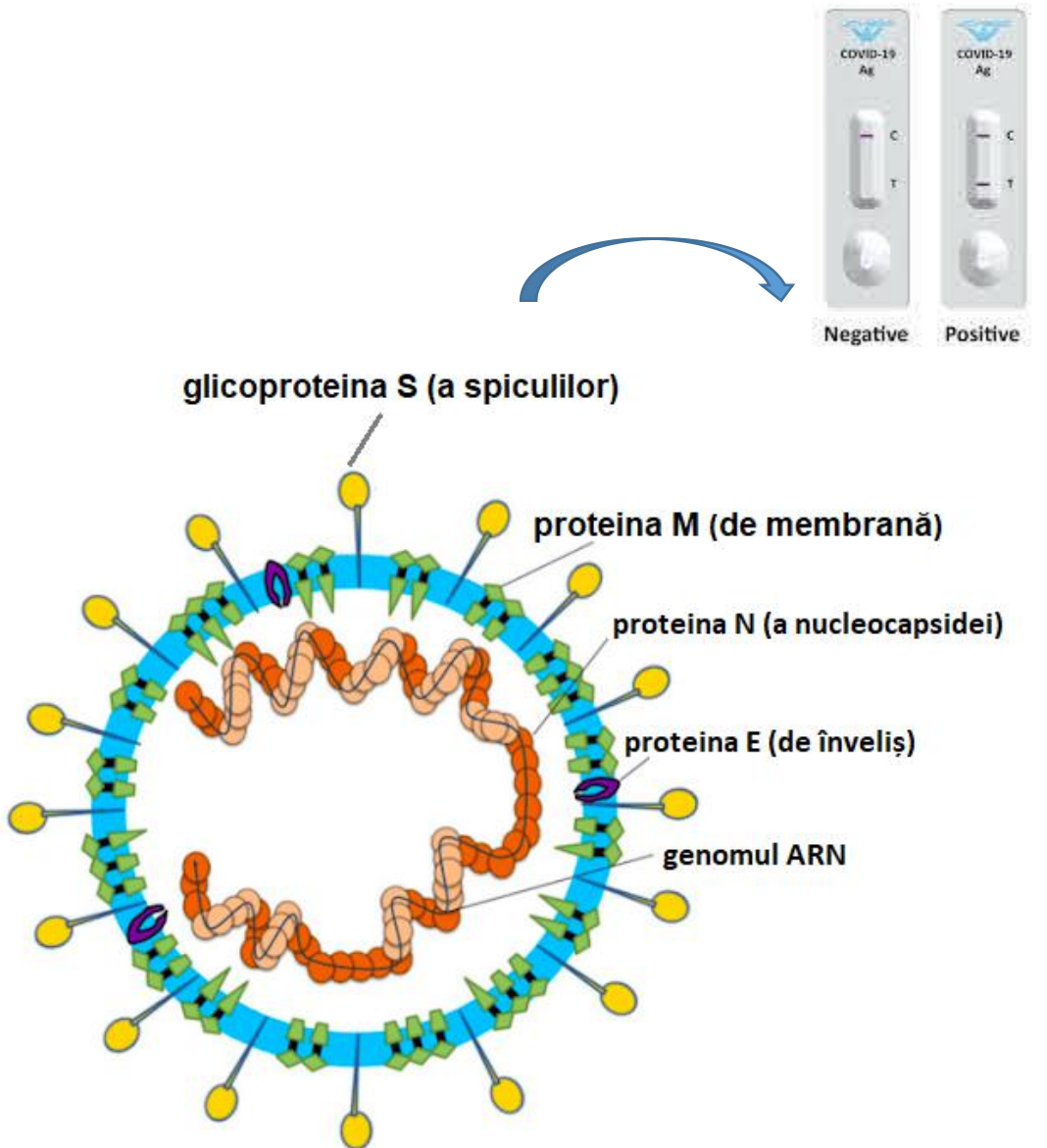
- genul  
*Betacoronavirus*
- subgenul  
*Sarbecovirus*



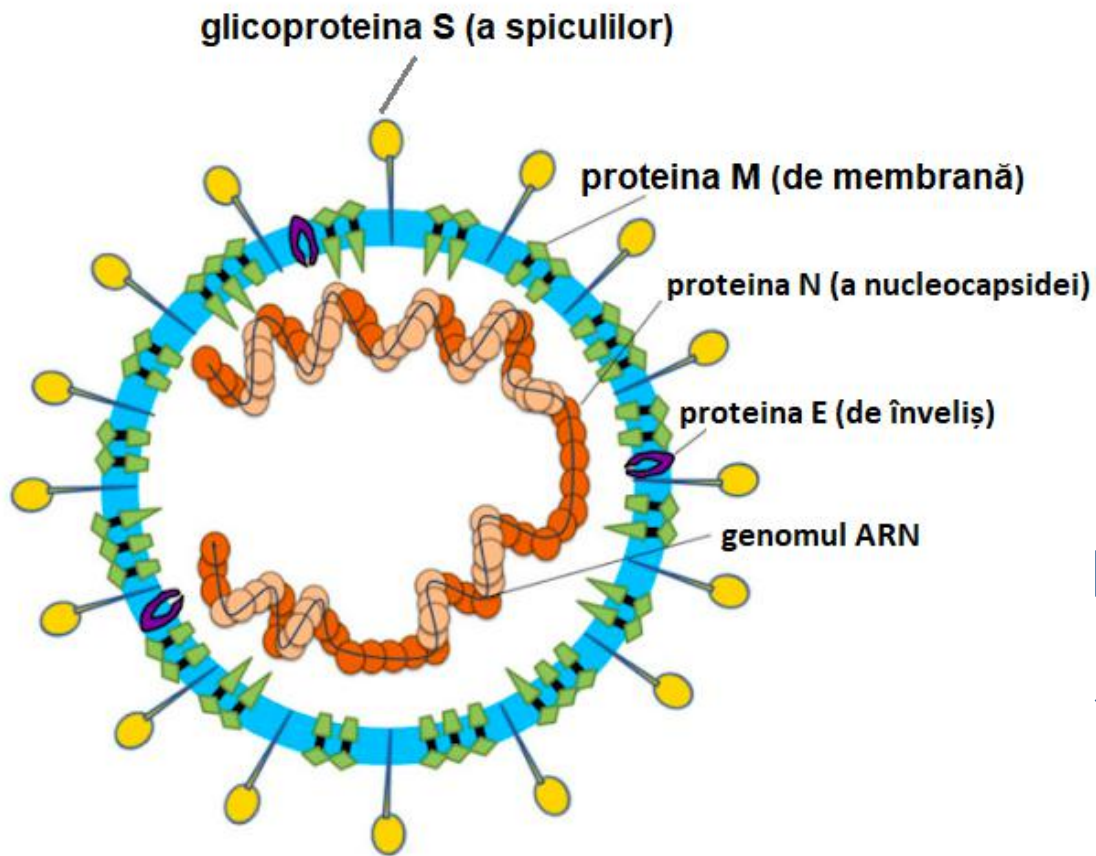
# Investigații de laborator pentru COVID-19



## Teste rapide pentru detecția antigenului SARS-CoV-2



- nu realizează amplificarea țintei detectate
- mai puțin sensibile decât RT-PCR → riscul rezultatelor fals-negative
- performanțe bune în cazul probelor cu încărcătură virală mare → testarea persoanelor simptomatice, aflate la debutul infecției.
- pot apărea rezultate fals pozitive prin reacții încrucișate cu alte virusuri.



## RT-PCR (*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*)

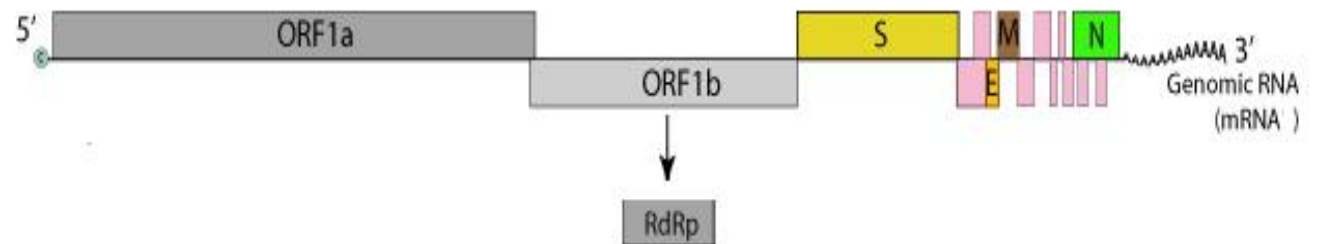


Amplificarea țintei –  
sensibilitate și specificitate  
mari



Evidențiere virus:

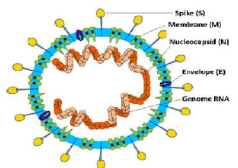
- chiar și in probe cu încărcătură virală mică
- chiar și la asimptomatici



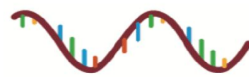


# Confirmarea infecției cu SARS-CoV-2: *Real Time* RT-PCR

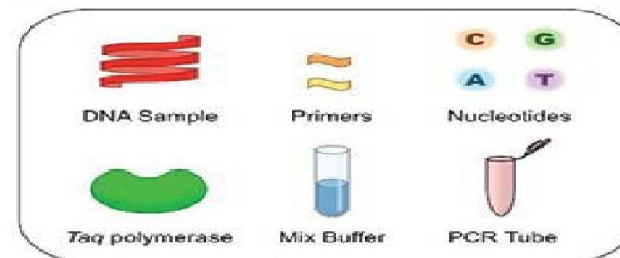
Prelevarea probei



Extracție ARN

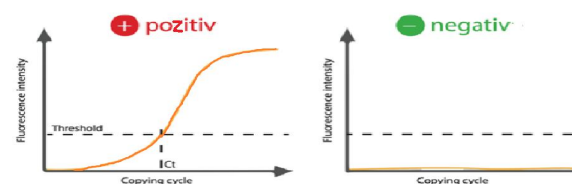
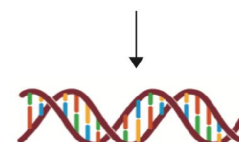
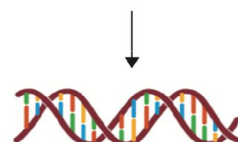


Revers transcriere



Reactia PCR

termociclor



Real Time

# Conditii de biosiguranta in laborator



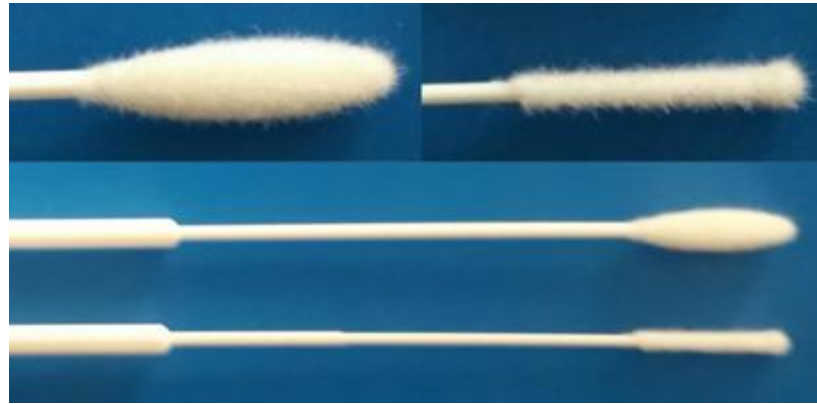
- Probele destinate diagnosticului molecular SARS-CoV-2 vor fi manipulate cu respectarea aceluiași măsuri de biosiguranță ca cele aplicabile în cazul diagnosticului molecular de gripă.
- Extracția acizilor nucleici trebuie să se facă în hotă de biosiguranță în laboratoare de nivel BSL-2.

# Sisteme complet automatizate



- integrează etapele: **Extractie ARN + Amplificare + Detecție**
- nu necesita personal cu expertiză înaltă
- risc minim de contaminare
- permit testarea în centre cu o capacitate de laborator limitată
- utile pentru diagnosticarea rapidă la locul acordării asistenței medicale

# Prelevare :



<https://dst.gov.in/sree-chitra-develops-2-types-swabs-and-viral-transport-medium-covid-19-testing>

- tamponane de Dacron sau poliester;
- tija de plastic ;
- tub cu mediu de transport pentru virusuri (VTM) suplimentat cu antifungice și antibiotice;

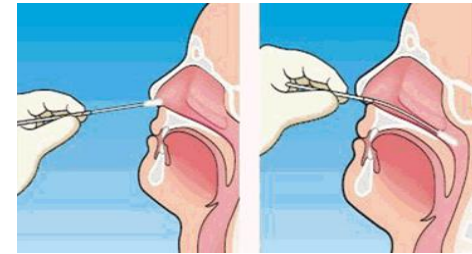


<https://www.cliawaived.com/kaibili-viral-transport-medium-3ml-vial.html>

# Prelevare :

- Momentul prelevării:
  - la debutul infecției
- Probe din tractul respirator superior:

- Exsudat **nazofaringian**



- Exsudat faringian

- *Testarea combinată a probelor nazofaringiene și faringiene crește sensibilitatea detecției virusurilor respiratorii → descărcarea ambelor tampoane de exsudat nazofaringian și faringian, în același tub.*

<https://www.copanusa.com/cdc-recommends-nasopharyngeal-swabs-and-oropharyngeal-swabs-as-suitable-for-upper-respiratory-tract-specimens-for-investigations-of-novel-coronavirus-2019-ncov/>



# Transport și conservare

- Probele vor fi etichetate corespunzător
- **Laboratorul va fi notificat în prealabil!**
  - transport rapid la 2-8°C
  - in caz contrar proba se congeleaza la -70°C (transport pe gheață carbonică)
- Se va evita înghețarea/dezghetarea repetată a probelor.
- Dacă nu este posibilă conservarea la temperatura de -70°C, proba se poate menține la -20°C
- Dacă nu este disponibil VTM, se pot folosi alte soluții, după validare, precum:
  - PBS (tampon fosfat salin),
  - ser fiziologic,
  - MEM (*minimum essential medium*, cu stocare la +4°C timp de 7-14 zile).

## ☐ Stadii avansate de boală

Suspiciune înaltă de infecție și rezultate negative din probele respiratorii superioare

- spută

*Nu se recomandă sputa indusă din cauza riscului crescut de transmitere prin aerosoli și/sau*

- aspirat endotraheal;

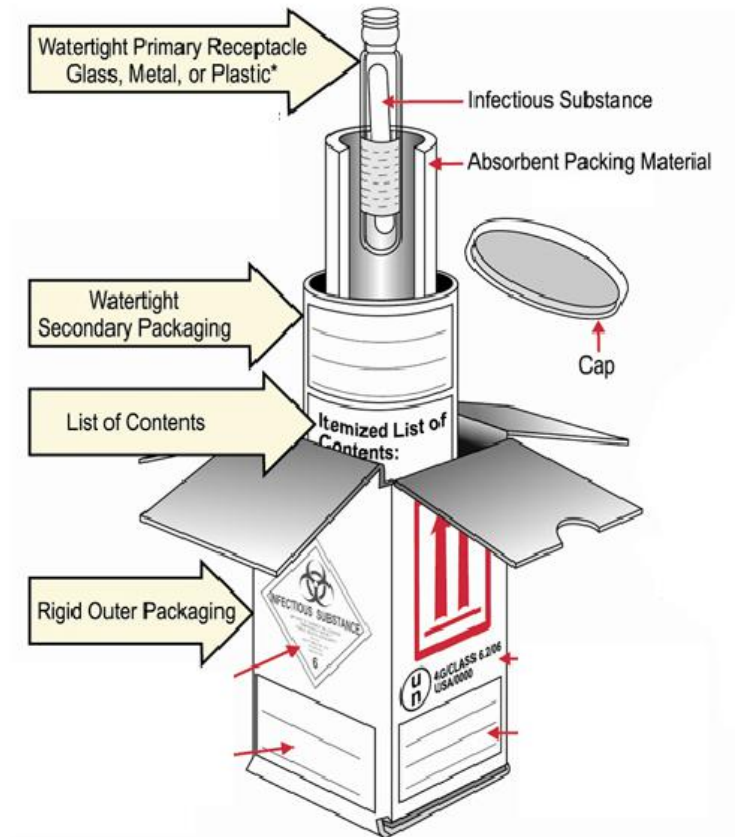
- lavaj bronhoalveolar.

Tipul probei	Recipient	Transport și conservare
Spută	steril	≤2 zile: 2-8°C,
Lavaj bronho-alveolar	steril cu VTM*	>2 zile: -70°C (transport pe gheață carbonică)
Aspirat endotraheal		

*\*Dacă nu este disponibil VTM, se poate folosi ser fiziologic, dar în acest caz stabilitatea probei la 2-8°C poate fi diferită*

# Măsuri de biosiguranță în cursul manipulării probelor:

- Toate probele vor fi considerate potențial infecțioase și trebuie transportate ca UN3373, „Substanțe biologice categoria B”
- Personalul implicat va utiliza corespunzător echipamentul individual de protecție.
- Personalul care transportă probele trebuie să fie instruit în privința practicilor corecte de manipulare a probelor, precum și a procedurilor de decontaminare.
- decontaminare - se utilizează dezinfectanți activi asupra virusurilor învelite (hipoclorit, alcool, compuși cuaternari de amoniu)



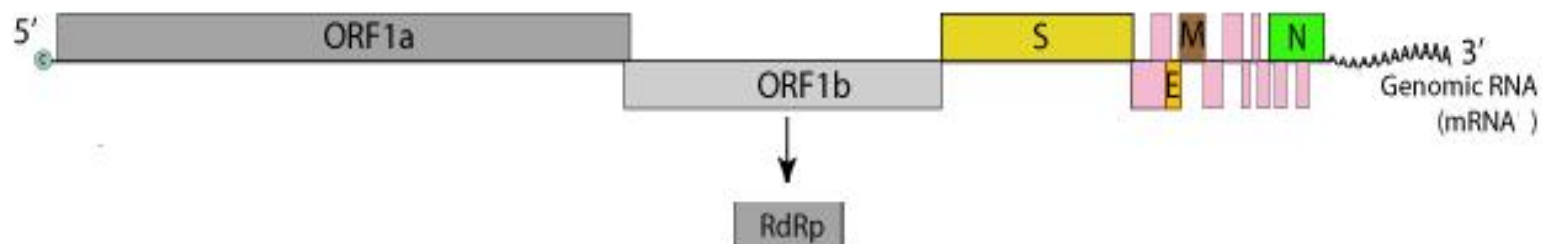


## Probe neconforme:

- tampoane în recipient fără mediu de transport pentru virusuri;
- recipiente necorespunzătoare (deteriorate, cu tubul crăpat sau capacul deschis);
- nerespectarea condițiilor de transport și conservare (timp, temperatură);
- absența etichetei pe eșantionul de analizat;
- absența formularului de însoțire sau formular completat necorespunzător, cu datele de identificare a pacientului absente, incomplete, eronate sau indescifrabile.

# Interpretarea rezultatelor:

- în cazul utilizării truselor comerciale (CE-IVD), interpretarea rezultatelor se face conform instrucțiunilor producătorului.
- ideal, diagnosticul optim presupune detecția a minimum două ținte genice diferite
- în zonele în care virusul este larg răspândit se poate folosi un algoritm de diagnostic simplificat în care *screening*-ul prin *Real Time* RT-PCR al unei singure ținte discriminatorii este suficient.



# Interpretarea rezultatelor:

- Unul sau mai multe rezultate negative (probe prelevate de la nivelul tractului respirator superior), nu exclud posibilitatea infecției cu SARS-CoV-2.
- Un rezultat fals-negativ poate fi explicat prin:
  - prelevare necorespunzătoare, rezultând într-o cantitate redusă de produs patologic ;
  - probă recoltată prea devreme sau prea târziu în cursul infecției;
  - probă manipulată și transportată necorespunzător;
  - mutații ale virusului;
  - prezența inhibitorilor PCR.

# “Troubleshooting”



	Există contaminare cu material genetic sau ampliconi?	A fost eficientă amplificarea in cursul RT-PCR?	A fost eficientă extractia ARN din proba?	Proba a fost recoltată corespunzator?
Posibile probleme	rezultat fals-positiv	rezultat fals-negativ	rezultat fals-negativ	rezultat fals-negativ
Control negativ	<input checked="" type="checkbox"/>			
Control pozitiv		<input checked="" type="checkbox"/>		
Control intern exogen		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Control intern endogen		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

# Soluții:

- În cazul unor rezultate discordante sau invalide se recomandă:
  - recoltarea unei alte probe;
  - secvențierea virusului din proba originală (dacă încărcătura virală este suficient de mare) .
- Dacă nu este posibilă recoltarea unei alte probe, se repetă extracția ARN din proba originală și se retestează de către personal cu experiență.