La sorveglianza integrata morbillo-rosolia e la sorveglianza della rosolia congenita e in gravidanza in vista dell'obiettivo di eliminazione
Roma 26 giugno 2015

Sorveglianza di laboratorio: l'importanza del campionamento

Melissa Baggieri

Laboratorio di Riferimento Nazionale per Morbillo e Rosolia

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate
Istituto Superiore di Sanità

World Health Organization
REGIONAL OFFICE FOR Europe

Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region

Update December 2012

"Laboratory investigation has a critical role in measles and rubella elimination because of the unreliability of clinical characteristics of these diseases for accurate diagnosis and the need to distinguish endemic and imported viruses".

Diagnosi clinica e importanza della conferma di laboratorio

Forma tipica del morbillo:

- febbre elevata
- mucosite (congiuntivite, raffreddore, tosse)
- macchie di Köplik
- esantema maculo-papulare confluente

Forma tipica della rosolia:

- esantema micropapuloso non confluente
- febbre moderata

nel 50% dei casi

- linfoadenite, con flogosi e tumefazione dei linfonodi nucali e laterocervicali
- artralgie

nel 25% dei casi si presenta senza esantema,
nel 25% dei casi in forma asintomatica.

La natura aspecifica dei segni prodromici e l'esistenza di casi lievi rendono la diagnosi clinica poco affidabile se usata come unico criterio diagnostico per il morbillo.
Per quanto concerne la rosolia nel 50% dei casi l'infezione si presenta in forma sub-clinica o asintomaticsa, e esistono inoltre numerosi altri agenti che causano sintomatologia simile alla rosolia. In questi casi l'infezione può essere confermata solo tramite diagnosi di laboratorio.

Una valutazione di laboratorio è fondamentale per la conferma dei casi clinici di morbillo/rosolia.

Metodi impiegati per la conferma di laboratorio

Diagnosi sierologica

- Ricerca di anticorpi IgM specifici per morbillo/rosolia
- Sieroconversione delle IgG

Diagnosi molecolare

- Ricerca del genoma del virus morbillo/rosolia

Isolamento virale

- Isolamento del virus morbillo/rosolia

«WHO manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, second edition 2007»

indicazioni dettagliate per il prelievo, la conservazione e il trasporto dei campioni: delinea i requisiti per una sorveglianza di laboratorio efficace offrendo una descrizione dettagliata delle procedure per corretta diagnosi e caratterizzazione genetica di ceppi wild-type di morbillo e rosolia.

La raccolta dei campioni clinici nei tempi ottimali garantisce la corretta interpretazione dei risultati e conferma della diagnosi.

Clinical samples for measles and rubella collection and recommended time* of collection

Clinical samples	Assays	0–4 days	5–7 days	8–28 days
Serum/dry blood spots	IgM/IgG	✓	✓	✓
	Virus detection	✓	✓	✗
Whole blood	Virus isolation	✓	✗	✗
	Virus detection	✓	✗	✗
Nasopharyngeal secretions	Virus isolation	✓	✗	✗
	Virus detection	✓	✓	✗
Urine	Virus isolation	✓	✗	✗
	Virus detection	✓	✓	✗
Oral fluid	IgM/IgG	✓	✓	✓
	Virus isolation	✓	✓	✗
	Virus detection	✓	✓	✓

*Time measured in days after the onset of rash.

Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region

Come previsto dalla Circolare sulla Sorveglianza Integrata, 2013

Per la conferma di laboratorio dei casi sospetti di morbillo/rosolia le ASL possono avvalersi:

- dei laboratori di Riferimento Sub-nazionali nelle regioni in cui sono presenti, con cui dovrà concordare le modalità di prelievo e di trasporto dei campioni.

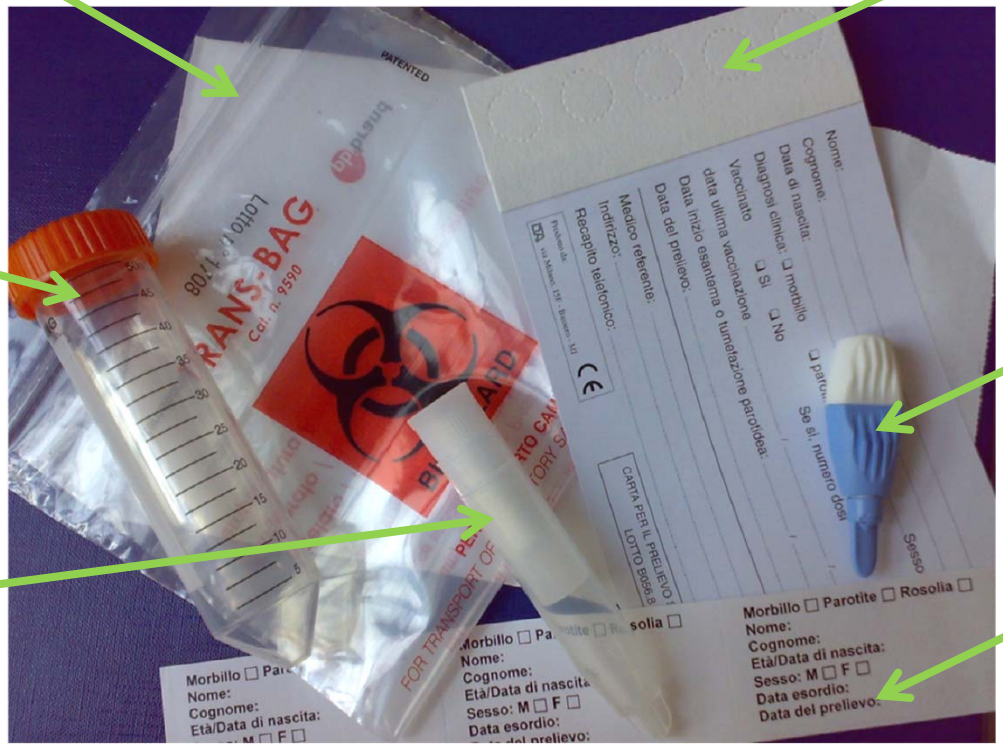
- del Laboratorio di Riferimento Nazionale, che mette a disposizione delle ASL i kit per la raccolta dei campioni e il ritiro degli stessi.

KIT PER IL PRELIEVO

Bustina Biohazard

Talloncino per il prelievo di sangue capillare

Provetta per urina



Lancetta per il prelievo di sangue capillare

Etichette adesive

“Salivette” per il prelievo di saliva

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

REGIONE _____ **ASL** _____ **COMUNE** _____

DATI ANAGRAFICI DEL PAZIENTE

Cognome e nome ..... ***Sesso*** M ☐ F ☐

Nato il ...../...../..... a ..... Provincia .....

Domicilio: Comune ..... Provincia .....

Residenza *(se diversa da domicilio)*:
Comune ..... Provincia .....

DIAGNOSI CLINICA

Morbillo ☐ Rosolia ☐ Parotite ☐

STATO VACCINALE
Precedente vaccinazione contro morbillo, rosolia e parotite

☐ No ☐ Non so, non ricordo
☐ Si, 1 dose ☐ Si, 2 dosi ☐ Si, non ricordo le dosi
☐ Si solo Morbillo ☐ Si solo Parotite ☐ Si solo Rosolia

Se si, quando ha effettuato l'ultima dose (gg/mm/aaaa): ____ /____ /____
(gg/mm/aaaa)

DATI CLINICI

Data di comparsa dell'esantema o della tumefazione parotidea: ____ /____ /____
(gg/mm/aaaa)

Tipo di prelievo: Sangue ☐ Saliva ☐ Urine ☐ Altro ☐ (Specificare: .....)

Data del prelievo (gg/mm/aaaa): / /

Medico referente (a cui inviare i risultati di laboratorio):

Nome ..... **Cognome** .....

Indirizzo

Struttura: .....

Via ..... Comune:..... Provincia .....

N° di telefono ..... N.Fax: .....

Email: .....

Raccolta del campione: il sangue

- Prelievo venoso
- Dried capillary blood

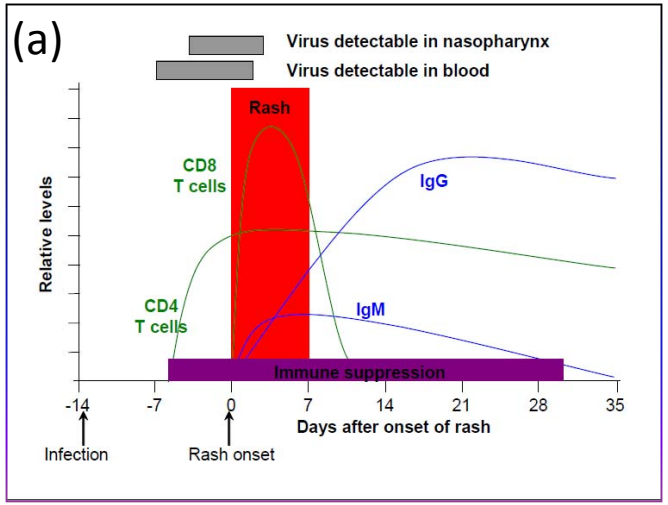
Timing of blood sampling for measles and rubella IgM/IgG

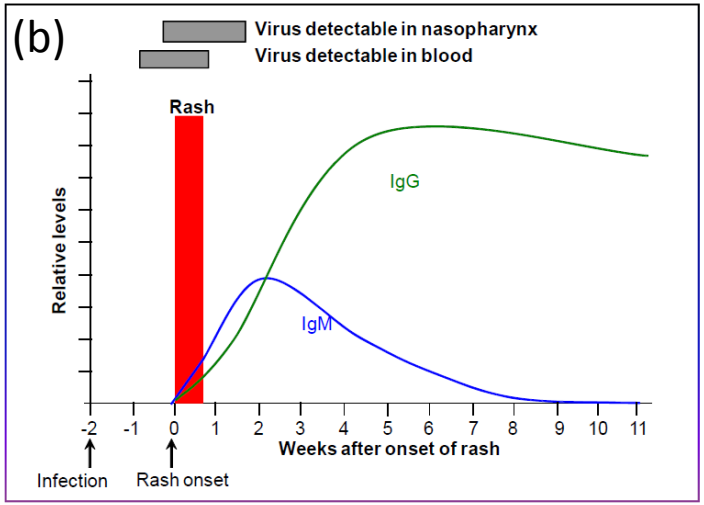
Ideale: 4-28 gg dopo l'insorgenza dell'esantema

Possibile: campione prelevato al 1° contatto con il paziente fino a 28 giorni dopo l'insorgenza dell'esantema è considerato adeguato.

Timing of blood sampling for measles and rubella isolation/detection

Ideale: 0-4 gg dopo l'insorgenza dell'esantema





Immune responses in measles (a) and rubella (b) infection

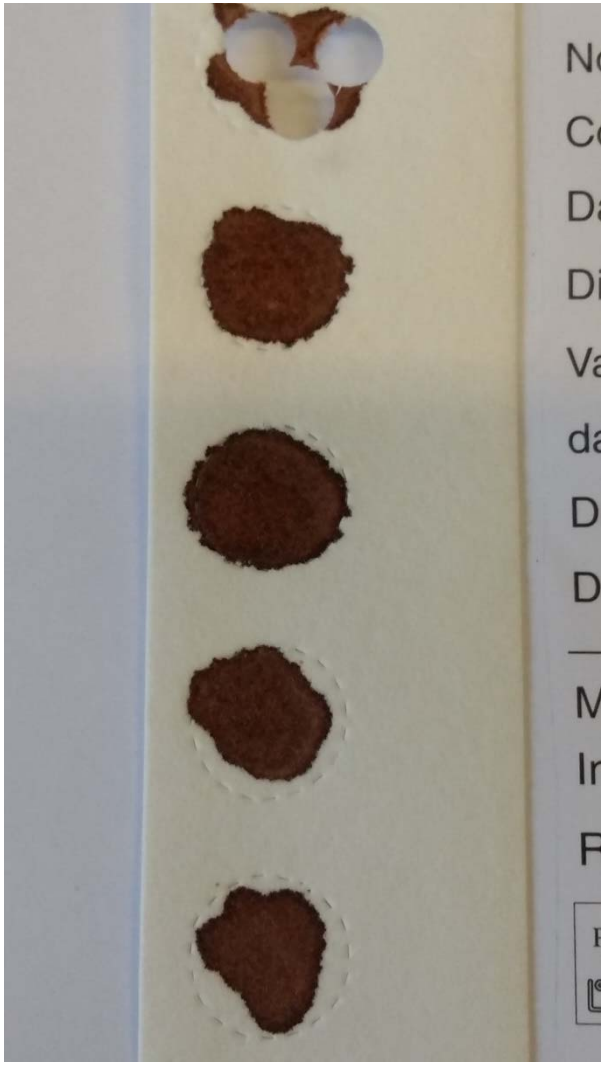
Dried capillary bloodspots

Raccogliere le gocce di sangue su carta da filtro standard (es. Whatman S & S No. 903) che comprenderà appositi cerchi di 14-15 mm entro cui collocare le gocce di sangue, e lo spazio per inserire i dati del paziente.

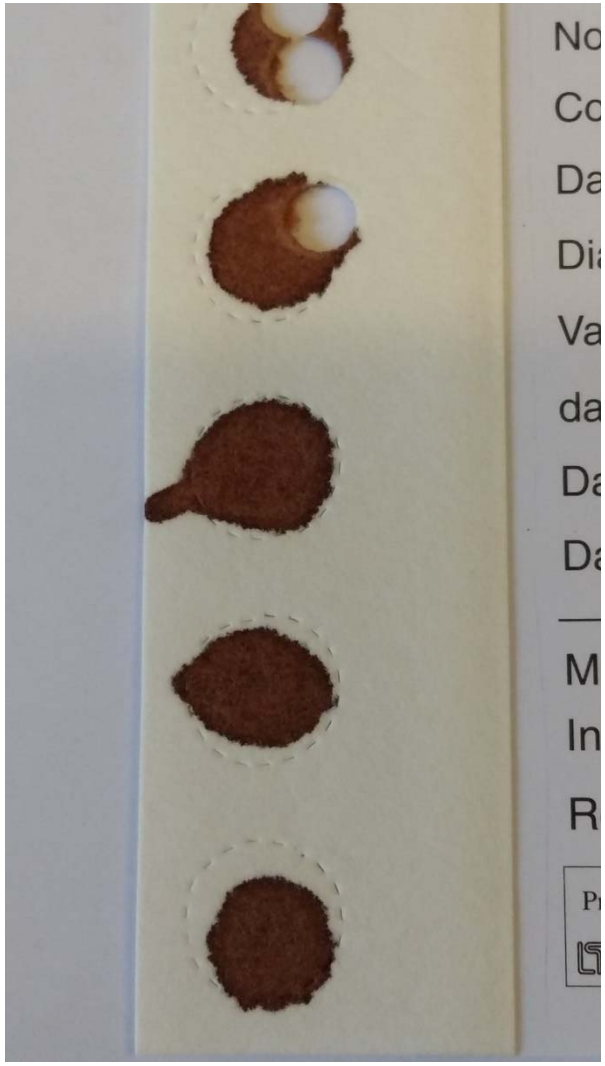
Gli spottini vanno fatti asciugare all'aria, racchiusi in busta e conservati a 4°C fino all'invio al laboratorio che effettuerà il test.

Corretto campionamento

I



II



Errato campionamento

I

II

Raccolta del campione: urine

Raccogliere 10-50 ml di urina in contenitore sterile e conservare a 4°C (preferibile la prima urina della mattina in quanto contiene la maggior quota di cellule di sfaldamento delle vie urinarie in cui si trova il virus in fase acuta).

L'urina intera o centrifugata deve essere conservata a 4°C fino all'invio al laboratorio che effettuerà il test.

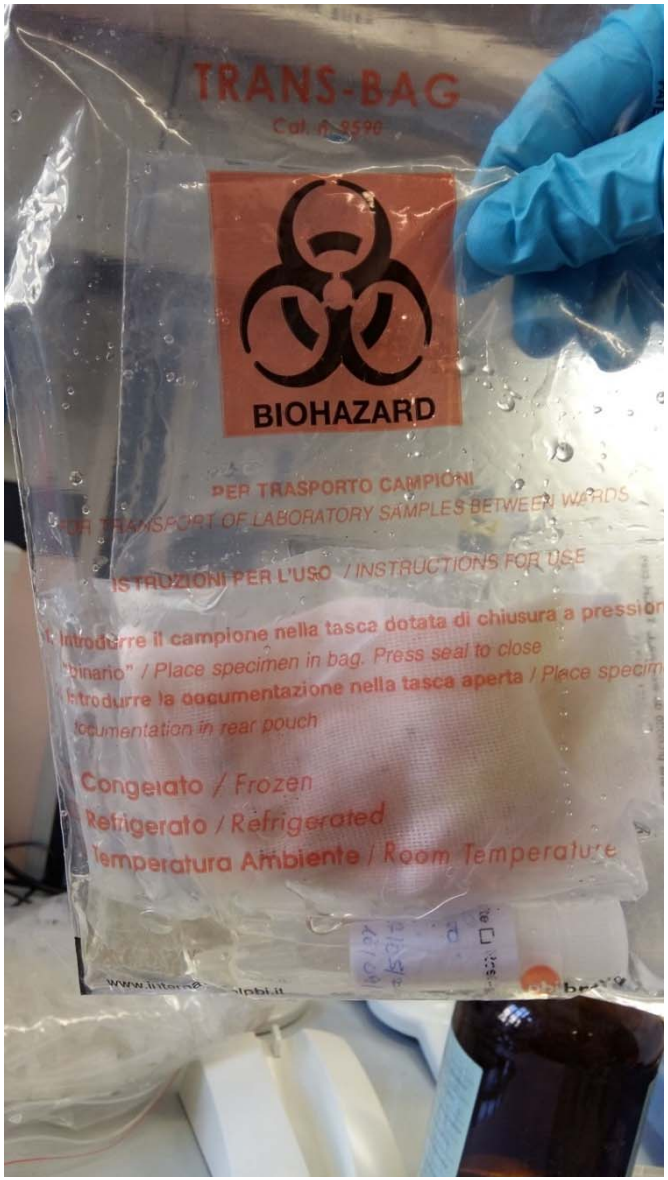
Timing of urine sampling for measles and rubella isolation/detection

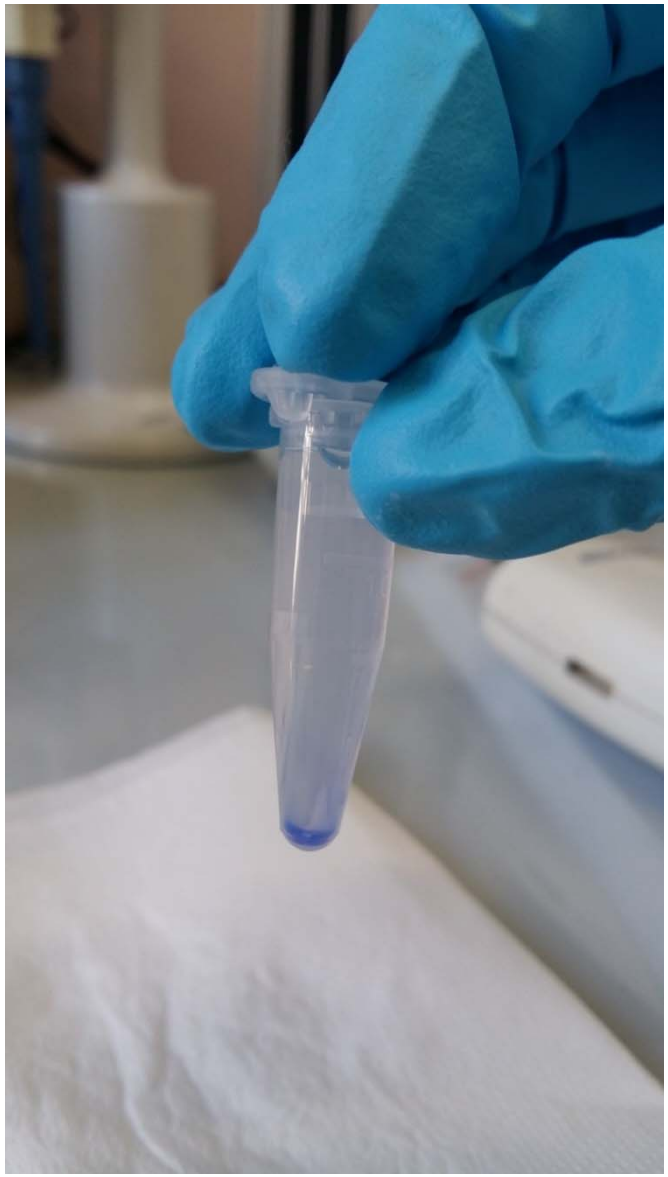
Ideale per l'isolamento: 0-4 gg dall'insorgenza dell'esantema

Ideale per la ricerca del genoma virale: 0-7gg dall'insorgenza dell'esantema

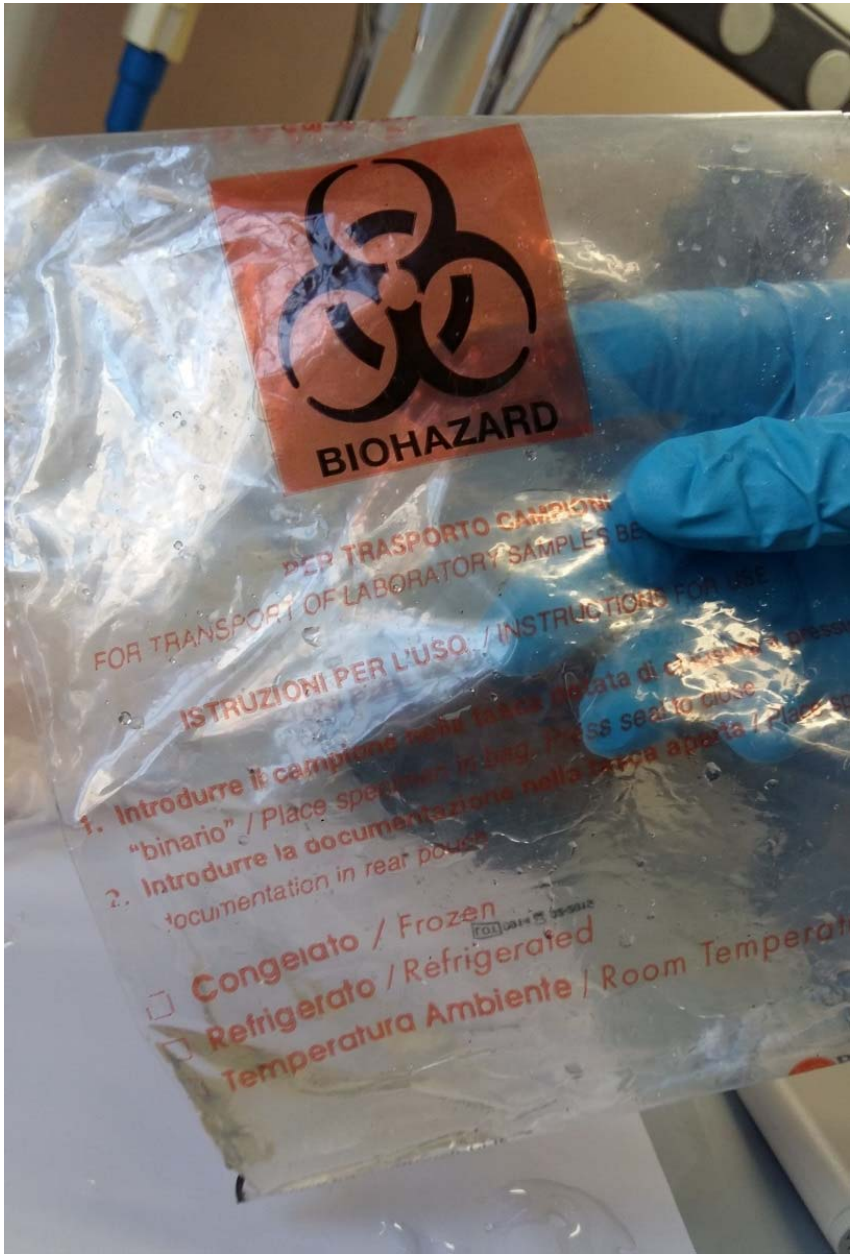
Errato campionamento I

Errato campionamento II





Errato campionamento III



Oral fluid

Fluido orale, o crevicolare, prodotto nel colletto gengivale.

Per il prelievo la bocca deve essere pulita, se si è mangiato da poco sciacquare con acqua ed attendere 10 minuti.

Sfregare il tampone per circa 1 minuto nel colletto gengivale, secondo le istruzioni fornite dal produttore del dispositivo che si sta utilizzando.

Se collezionato entro 7 gg dall'insorgenza dell'esantema, può essere usato per l'analisi in RT-PCR.

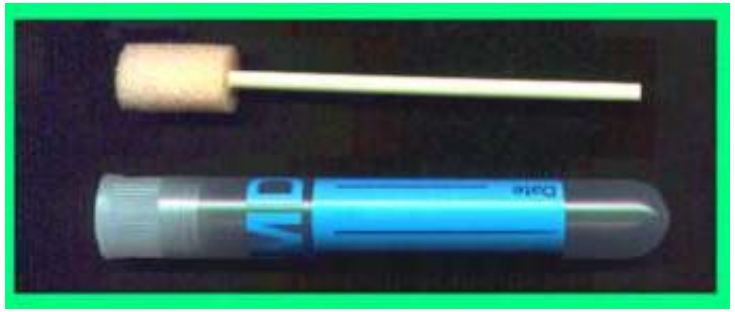
Intercept, OraSure Tecnologies

Oral-Eze, ThermoScientific

Quantisal, Immunoanalysis

Salivette, Sarstedt

Oracol, Malvern Medical Developments



SalivaBio, Salimetrics

Raccolta del campione: campioni nasofaringei

Prelievo nasofaringeo/orofaringeo: ottenuto strofinando il tratto rinofaringeo e posteriore della gola con tamponi di cotone sterili per rimuovere le cellule epiteliali.

Timing of sampling

Isolamento virale: 0-4 gg dopo l'insorgenza dell'esantema

Ricerca del genoma: 0-7 gg dopo l'insorgenza dell'esantema

Evitare ripetuti congelamenti/scongelamenti:

- influiscono sulla stabilità delle IgM nel caso che il test da effettuare sia ricerca anticorpale
- la formazione di cristalli inattiva il virus nel caso di campioni raccolti per isolamento virale

Conservare i campioni in frigorifero (4°C) fino al test o all'invio al laboratorio che effettuerà i test (in regola generale il prima possibile).

Tutti i campioni devono essere riposti in provette trasparenti, all'esterno delle quali è necessario riportare:
- nome
- numero identificativo del paziente
- data del prelievo

Inoltre devono essere accompagnati da una scheda standard contenente:

- nome del paziente
- numero identificativo del paziente
- età
- città di residenza
- provincia
- date della vaccinazione morbillo/rosolia
- data di insorgenza dei sintomi
- tipo di campione raccolto
- data del prelievo
- data di invio del campione al laboratorio

Importanza del campionamento

Le caratteristiche del campione e le condizioni di conservazione sono fattori chiave per ottenere dei risultati attendibili e di utile supporto alla diagnosi

Importanza fondamentale delle modalità di prelievo, preparazione ed invio del materiale biologico.

Ringraziamenti

Loredana Nicoletti
Fabio Magurano
Antonella Marchi
Paola Bucci
Francesca Mazzilli