

Recomanacions per a l'obtenció, emmagatzemament i manipulació de mostres humanes COVID-19, en recerca biomèdica

Anna Meseguer

Àrea d'Operacions i Relacions Institucionals

Direcció General de Recerca i Innovació en Salut

AGRAÏMENTS:

Als responsables dels Biobancs i dels Comitès de Bioseguretat dels centres de recerca i hospitals de l'entorn IRISCAT i de la UAB que han col·laborat en l'elaboració d'aquest document.

Contingut

1. Obtenció de mostres de pacients amb COVID-19	3
2. Recollida de mostres relacionades amb patologia SARS-CoV-2 i creació del biobanc COVID-19	5
3. Manipulació de mostres de covid-19 i bioseguretat als laboratoris de recerca	6
3.1 Guia de manipulació de mostres de COVID-19	6
3.2 Recomanacions generals d'higiene	6
3.3 Recomanacions generals de prevenció	7
3.4 Equips de protecció individual (EPIs)	7
3.5 Desinfectants	8
3.6 Requeriments del laboratori i manipulació de les mostres amb nivell de bioseguretat 2 (P2)	9
3.7 Requeriments del laboratori i manipulació de les mostres amb nivell de bioseguretat 3(P3)	10
3.8 Mesures de Seguretat i Gestió de Residus.....	11
4. Transport de mostres entre diferents centres	12
4.1 Transport intrahospitalari	12
4.2 Transport extern	12
5. Referències	13

1. OBTENCIÓ DE MOSTRES DE PACIENTS AMB COVID-19

La urgència sanitària que representa la pandèmia de la COVID-19 fa que, als Instituts de Recerca sanitària, es prevegi la posta en marxa de múltiples projectes de recerca alhora i en un període molt curt de temps. En molts casos aquests projectes necessitaran la utilització de mostres biològiques de pacients. Per aquesta raó es recomana que s'intenti racionalitzar l'obtenció, emmagatzemament i accés a aquestes mostres i vehicular, sempre que sigui possible, tots aquests processos d'una forma centralitzada. En aquesta situació d'excepcionalitat és important no sobrecarregar el personal assistencial, però tampoc sobreexposar personal que no està a càrrec de la cura d'aquests pacients.

Es recomana que el centre habiliti tots els canals necessaris per tal de conèixer els tipus de mostres i els processaments concrets que es volen dur a terme per tal de racionalitzar i optimitzar l'obtenció, emmagatzemament i utilització d'aquestes mostres i d'assessorar l'investigador en la seva correcta manipulació, adoptant les mesures de bioseguretat adequades.

Una possibilitat d'accedir a moltes de les mostres que seran necessàries per als projectes de recerca és la d'utilitzar els excedents de diagnòstic que es guarden al laboratori d'Anàlisi Clíniques, Microbiologia, Biologia Molecular o Anatomia Patològica. Inclús, si fos possible, afavorint la generació de noves alíquotes d'aquestes mostres per destinar-les a recerca.

A partir d'aquí, la cessió d'aquestes mostres a projectes de recerca s'hauria de gestionar a través de la infraestructura del Biobanc de la institució que disposa de tots els elements que garanteixen l'emmagatzemament correcte de les mostres i l'accés equitatiu a les mostres de tots els investigadors en igualtat de condicions.

El circuit d'obtenció de les mostres hauria de:

- Evitar en la mesura del possible circuits paral·lels que sobrecarreguen el personal assistencial i que podrien comportar diverses extraccions en un mateix pacient per a un mateix tipus de mostra.
- Facilitar la reutilització per a recerca de les mostres obtingudes a través dels serveis assistencials centrals (Anàlisi Clíniques, Microbiologia, Anatomia Patològica, Biologia Molecular, etc.). Els anomenats excedents de diagnòstic.
- Procurar integrar l'obtenció de les mostres per a la recerca que sigui possible en els circuits d'obtenció de mostres que, amb finalitats diagnòstiques ja duen a terme els serveis centrals hospitalaris d'Anàlisi Clíniques, Microbiologia, etc. i incloure-les en

els seus sistemes automatitzats o robotitzats dels processos inicials bàsics de laboratori com l'aliquotat o la congelació.

- Emmagatzemar les mostres de pacients de forma centralitzada per cedir-les després, a través del Biobanc, als projectes de recerca que les sol·licitin.
- Promoure l'obtenció del Consentiment Informat del Biobanc per part dels facultatius de l'hospital per tal que posteriorment es puguin utilitzar les mostres per dur a terme els projectes de recerca.
- Informar a tots els investigadors quines mostres tenen una gestió centralitzada a través del Biobanc per tal que no hi hagi duplicitat en les obtencions.

Utilització de les mostres a través del Biobanc:

- L'obtenció i emmagatzemament centralitzat d'aquestes mostres hauria de servir per impulsar els projectes sobre la COVID-19.
- La cessió d'aquestes mostres s'hauria de gestionar a través del Biobanc ja que corresponen a mostres recollides amb el consentiment informat del Biobanc. Aquesta gestió inclou l'avaluació de la sol·licitud per part dels Comitès Ètic i Científic del Biobanc que tindran en compte i donaran preferència a la recerca pròpia del centre.

Altres tipus de mostres

No obstant, no es pot descartar que determinats projectes necessitin alguns tipus de mostres molt específiques que no es puguin integrar en els circuits d'extraccions dels serveis centrals o que no puguin ser considerades excedents de diagnòstic. Per exemple, en el cas que corresponguin a tècniques més agressives, que s'hagin d'obtenir amb unes condicions especials o que precisin d'uns tubs diferents als habituals en la rutina assistencial.

En tractar-se de mostres no tan habituals i d'una patologia altament infecciosa, s'hauria de revisar prèviament que el centre disposi de les instal·lacions adequades i de personal amb experiència per al processament d'aquestes mostres. D'aquí prové la necessitat que el centre conegui prèviament el tipus de mostres que necessitarà l'investigador.

En qualsevol cas, aquestes mostres hauran de ser obtingudes amb un consentiment específic de projecte ja que no poden ser considerades excedents de diagnòstic.

Atesa l'elevada incidència de casos COVID-19 i la prevalença desconeguda de persones infectades i asimptomàtiques en el nostre medi, s'aconsella aplicar totes les mesures de bioseguretat establertes pel COVID-19 a les mostres biològiques que s'obtinguin de tots els pacients en aquest moment.

2. RECOLLIDA DE MOSTRES BIOLÒGIQUES I DADES CLÍNiques

RELACIONADES AMB PATOLOGIA SARS-CoV-2 I CREACIÓ DEL BIOBANC COVID-19

Arrel de l'interès de la comunitat científica per iniciar projectes relacionats amb la malaltia COVID-19, les direccions de cada centre, juntament amb el Departament de Salut, han pres la decisió estratègica institucional d'incloure totes les mostres procedents dels pacients de cada centre dins dels seus corresponents Biobancs, sempre assegurant la traçabilitat de les mostres, associada a informació clínica, i la seguretat de les persones que les manipulen.

La recollida de mostres biològiques i dades clíniques dels pacients permetrà obtenir informació rellevant en relació a la epidemiologia, diagnòstic, maneig clínic i el tractament de pacients amb COVID-19, la caracterització del virus SARS-CoV-2, la caracterització clínica-biològica-molecular de la malaltia COVID-19, el desenvolupament de tècniques de diagnòstic virològic del SARS-CoV-2, així com el disseny, desenvolupament i implementació de possibles mesures de salut pública.

Cada Biobanc analitzarà i establirà els circuits de recollida i recepció de mostres específiques del seu centre, tant per les mostres associades a projectes concrets com per la recollida d'excedents diagnòstics de mostres COVID-19. Totes les mostres es consideraran com a substàncies infeccioses de categoria B.

Es recomana que totes les mostres siguin codificades segons criteris SPREC (STANDARD PREANALYTICAL CODE V2.0) per a la seva correcta caracterització pel que fa a condicions pre-analítiques del tipus de mostra, recollida, processament i emmagatzemament. (<https://www.isber.org/page/SPREC>).

Veure Annex I per a la recollida i identificació de mostres als Biobancs

Pel que fa a l'emmagatzemament de mostres COVID-19 congelades, s'han de considerar les següents recomanacions:

Les mostres COVID-19 s'han de guardar separades físicament de les no COVID-19. Idealment en congeladors o baldes exclusives però, en cas de que no sigui possible, en bosses o contenidors hermètics dins del mateix congelador on es guarden les altres mostres.

Característiques dels congeladors:

- Possibilitat de tancar amb clau
- Exhibir etiqueta de risc biològic
- Sala d'accés restringit
- Registre de l'activitat

En cas d'utilitzar tancs de nitrogen líquid, és recomanable destinar un *rack* específic per a les mostres COVID-19.

3. MANIPULACIÓ DE MOSTRES DE COVID-19 I BIOSEGURETAT

3.1 GUIA DE MANIPULACIÓ DE MOSTRES DE COVID-19

El document redactat per la Asociación Española de Bioseguridad (AESBioS) i la Red Nacional de Biobancos (RNBB): "Gestión de riesgo biológico en Laboratorios que manipulen muestras con (COVID-19)" serà d'aplicació a TOTS els procediments de laboratori que impliquin la manipulació de mostres possiblement contaminades per SARS-CoV-2.

Veure Annex II i Pòster

Es necessitarà **implementar tècniques, pràctiques i equips de protecció individual (EPIs)** i de la col·lectivitat, segons el tipus de manipulació que es pugui realitzar i que haurien de ser **supervisades pel personal de Riscos Laborals de cada centre de recerca**.

3.2 RECOMANACIONS GENERALS D'HIGIENE

- Rentar-se les mans freqüentment amb aigua i sabó (40-60 seg.)
- Rentar-se les mans en accedir i sortir de les instal·lacions de treball.
- Rentar-se les mans amb aigua i sabó (40-60 seg.) abans d'entrar al P3/ P2 i abans de sortir-ne.
- Sempre que es pugui, accedir amb targetes d'identificació, evitant l'ús de l'empremta dactilar.
- Accionar els polsadors de sortida amb el colze.

- Desinfectar les targetes d'identificació en finalitzar l'activitat.

3.3 RECOMANACIONS GENERALS DE PREVENCIÓ

- Treballar en grups reduïts i per torns.
- Distanciament recomanat entre persones d' almenys 1 metre.
- Evitar estar més de 2 persones en espais reduïts (office).
- Evitar tocar-se els ulls, el nas o la boca.
- Romandre el menor temps possible en els passadissos del centre hospitalari o institut d'investigació.
- Abandonar, com abans millor, el lloc de treball després de finalitzar l'activitat.

3.4 EQUIPS DE PROTECCIÓ INDIVIDUAL (EPIs)

El personal que manipuli mostres COVID-19 ha de fer servir els equips de protecció individual (EPIs) següents:

- Doble guant. Guants amb certificació EN/ISO374-5 (per a virus). Fora dels laboratoris P2 i P3, utilitzar guants només en cas de transportar mostres i no tocar cap superfície (poms, portes...) en el cas de portar els guants.
- Mascareta. Depenen del tipus de mostres es farà servir un tipus de mascareta diferent: mascareta quirúrgica quan es treballa a cabina de bioseguretat amb mostres de sang (la càrrega es menor); mascaretes tipus FFP2/ FFP3 quan es treballa amb mostres de frotis nasofaringic (o altres mostres amb alta càrrega viral) quan es treballa a cabines de bioseguretat dels laboratoris P2 i P3.
- Bata blava o vestit de protecció, a P2 i P3, transpirable i impermeable. Prou ample per cobrir tot el cos i de llargària mínima fins als genolls. De tancament amb tires, al coll i la cintura, pel darrere. Punys elàstics.
- Gorra d'un sol ús a P3.
- Polaines hospitalàries o sabates d'ús exclusiu a la sala de treball específica per SARS-CoV-2.
- Si hi ha risc d'esquitxades, utilitzar ulleres amb protecció lateral o pantalla facial.

L'ordre de col·locació i de retirada de les EPIs és important a l'hora de evitar possibles contaminacions i es recomana **tenir coneixement o rebre formació**.

S'haurà de preveure un circuit d'esterilització per a les bates de bioseguretat que es puguin autoclavar. Les bates brutes per vessament o esquitxada no entren en aquest circuit, pel

que quedarien en una doble bossa tancada fins que es decideixi el seu tractament posterior (autoclau/rentadora/autoclau).

3.5 DESINFECTANTS

Superfícies

Recentment s'ha estudiat l'estabilitat del SARS-Cov-2 en diferents superfícies i en resposta a tractaments de diferents desinfectants (Chin et al. 2020).

Per a la desinfecció de superfícies, es recomana hipoclorit de sodi 0.1% durant al menys 10 minuts; 70% d' etanol durant 1 minut; 0,5% de peròxid d'hidrogen. També es recomana utilitzar productes virucides autoritzats a Espanya que inclouen el Meliseptol Foam Pure, desinfectant de superfícies en l'àmbit sanitari.

Vessaments

Es recomana hipoclorit sòdic a l'1% durant almenys 10 minuts. En el cas d'una elevada carga orgànica (sang, teixits, etc.) i prèviament al lleixiu s'han d'utilitzar tensioactius durant uns minuts.

Cal recordar que:

- NO ES PODEN UTILITZAR DIRECTAMENT DESINFECTANTS AMB PULVERITZADORS SOBRE LES SUPERFÍCIES, PER EVITAR CREAR AEROSOLS.
- CAL PULVERITZAR SOBRE PAPER, FORA DE CABINA, ABANS DE DESCONTAMINAR LES SUPERFÍCIES.

Es important saber que:

- ELS CORONAVIRUS HUMANS, EN GENERAL, PERSISTEIXEN EN SUPERFÍCIES COM EL METALL, EL VIDRE O EL PLÀSTIC FINS A 9 DIES.
- EL VIRUS S' INACTIVA A TEMPERATURES DE 70°C A TEMPS MOLT CURTS O A 56°C DURANT 30 MINUTS. EN CANVI, ES MANTÉ VIABLE SENSE PRÀCTICAMENT DESACTIVAR-SE A TEMPERATURES DE 4°C I INFERIORS I, PROBABLEMENT DE MANERA INDEFINIDA, EN MOSTRES CRIOPRESERVADES.

3.6 REQUERIMENTS DEL LABORATORI I MANIPULACIÓ DE LES MOSTRES NIVELL DE BIOSEGURETAT 2 (P2)

Equips

- Cabina de bioseguretat classe IIA (CBS IIA)
- Centrífugues amb tapes de seguretat (anti-aerosols)
- Congelador -80°C
- Comptador cel·lular
- Pipetes

Per transferir líquids entre tubs cal utilitzar pipetes o micropipetes amb barreres anti-aerosols, puntes amb filtre o pipetes de plàstic tipus Pasteur.

Els rotors s'han de carregar i descarregar dintre de la cabina de bioseguretat. S'hauran de reduir, sempre que sigui possible, els procediments fora de la cabina.

Manipulació de mostres

El processament de totes les mostres SARS-CoV-2 s'ha de fer SEMPRE en cabina de bioseguretat (CBS IIA), utilitzant els protocols estandarditzats de cada centre o servei.

Les mostres no fixades ni inactivades que poden ser manipulades en un laboratori de nivell de contenció 2, inclouen:

- Sang total congelada (extracció d'ADN).
- Sang seca en targeta (deixar assecar en cabina de bioseguretat).
- Capa blanca (buffy coat) (extracció manual d'àcids nucleics).
- Sèrum (separació i alíquotes manuals).
- Plasma (separació i alíquotes manuals).
- Cèl·lules linfo-mononuclears – PBMC (separació i criopreservació).
- Orina (alíquotes).
- Femta (alíquotes).
- Exsudat nasofaringi (extracció de ARN).
- Manipulació de lisat víric inactivat.
- Tinció i anàlisi microscòpica de frotis o teixits no fixats.
- *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) de mostres fixades.

En el cas de mostres de **teixits infectats** per COVID-19 es seguiran les recomanacions de la "Sociedad Española de Anatomía Patológica" i de la "International Academy of Pathology".

Veure Annex III

3.7 REQUERIMENTS LABORATORI I MANIPULACIÓ DE MOSTRES NIVELL DE BIOSEGURETAT 3 (P3)

Equips

El mateixos que els de nivell 2 amb requeriments addicionals que inclouen:

- Cabines de Seguretat Biològica, preferiblement de classe II o III.
- Control d'accés electrònic.
- Pressió negativa en gradient diferencial unidireccional de flux continu.
- Avantsala en els accessos a l'àrea de treball.
- Sala per al canvi complet de roba i per a la col·locació i retirada d'EPIs.
- Sistemes d'intercanvi per a l'entrada de mostres i materials a la zona de contenció.
- Autoclau de doble porta disponible en la barrera de la zona de contenció.

Manipulació de mostres

Les mostres que es manipularan al nivell P3 inclouen:

- Cultius virals o de cèl·lules linfo-mononuclears de pacients.
- Excrements (processament).
- Peça quirúrgica (obtenció de mostres).

En el cas de mostres de teixits infectats per COVID-19 es seguiran les recomanacions de la "Sociedad Española de Anatomía Patológica" i de la "International Academy of Pathology".

Veure Annex III

La superfície dels tubs amb les mostres s'ha de descontaminar amb etanol 70% o tovalloletes desinfectants, sempre dins de la CBS IIA, abans de processar-les.

3.8 MESURES DE SEGURETAT I GESTIÓ DE RESIDUS

El personal dels laboratoris que hagi de manipular mostres de COVID-19 haurà de tenir experiència de treball amb aquest tipus de patògens. En cas contrari, caldrà que rebi formació específica per garantir la seva seguretat i evitar contaminar espais de treball.

En el cas que es produeixi un accident cal posar-se en contacte amb la Unitat de Riscos Laborals de cada centre per tal que es puguin adoptar les mesures necessàries (incloure telèfon de RISCOS LABORALS en cada cas).

- El personal durà la indumentària adequada. (Veure apartat 3.4 EPIs i Manual de Bioseguretat **Annex II**).
- Les mostres es col·locaran i extrauran dels *buckets* de les centrífugues SEMPRE dins de la CBS IIA.
- Els guants externs es retiraran dins de la cabina, de manera que la part contaminada quedi dins del guant. S'eliminaran dins d'una bossa d'auto tancat dins de la cabina.
- Netejar la cabina a l'inici i al final del treball. Es ruixarà el paper fora de cabina amb el desinfectant i es netejaran les superfícies. Finalitzar amb etanol 70%, procedint de la mateixa manera.
- Netejar les gradetes al final del treball, ruixant el paper fora de cabina amb el desinfectant, i netejar la superfície. Deixar-les submergides a la pica amb desinfectant.

Gestió dels residus

- Tubs de sang, guants i portaobjectes de comptatge es llençaran a un contenidor del grup III. Es tancarà el contenidor quan s'ompli o en finalitzar l'activitat. Es netejarà la superfície del contenidor abans de treure'l i es deixarà a la sala d'autoclau per a la retirada de residus, seguint la normativa de cada hospital o centre de recerca.
- La resta de material es llençarà al contenidor amb desinfectant, segons procediment manual de bioseguretat. L'endemà s'eliminarà després de la desactivació del material infeccios.
- Els residus generats degut al processament de mostres COVID-19 han d'anar als contenidors del grup III.
- Les P2 que disposin d'autoclau de sortida podran autoclavar els residus per aquesta via i després eliminar-los per la via habitual d'eliminació de residus de la institució.

4. TRANSPORT DE MOSTRES COVID-19

4.1 TRANSPORT INTRAHOSPITALARI

El transport intern de mostres des dels Serveis Clínics i d'Anàlisis Clíniques als Biobancs es farà en contenidors hermètics i resistent als cops, homologats per a aquesta finalitat.

El transport de la documentació i de les mostres biològiques es farà en contenidors separats per evitar contaminacions.

Els contenidors s'obriran dins la cabina de bioseguretat, havent-los desinfectat prèviament. També es desinfectaran els tubs per la part externa amb paper impregnat amb desinfectant (p. ex. alcohol 70% o hipoclorit sòdic diluït a l'1%).

Es recomana la descontaminació interna i externa dels contenidors després de cada ús tal com s'ha indicat prèviament (veure punt 3.5). No utilitzar esprais o polvoritzadors directament al contenidor per evitar la generació d'aerosols.

4.2 TRANSPORT EXTERN

El transport de mostres, quan s'enviïn o es rebin de l'exterior, hauran de complir amb la normativa UN3373 (Substància Biològica Categoria B). Seran desinfectades per la part externa i transportades en triple embalatge. En el cas de cultius o aïllaments virals es transportaran com a Categoria A UN2814 (substància infecciosa que afecta humans).

Els expedidors hauran d'assegurar que els embalatges/continguts arribin la seu destí en bon estat i que no representin un perill per a les persones o animals durant el transport, ja que hauran estat prèviament desinfectats per la seva part externa.

Està prohibit el transport d'aquestes mostres en vehicles privats.

5. REFERÈNCIES

- Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, Hui KPY, Yen HL, Chan MCW, Peiris M, Poon LLM. “Stability of SARS-CoV-2 in diferent enviromental conditions”.
- Anexo suplementario a Chin A W H, Chu J T S, Perera M R A, et al. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe*. 2020. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30003-3](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30003-3).
- Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of Coronaviruses on Inanimate Surfaces and Their Inactivation With Biocidal Agents. *J Hosp Infect*, 104 (3), 246-251.
- Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG1, Gamble A, Williamson BN, Tamin A, Harcourt JL, Thornburg NJ, Gerber SI, Lloyd-Smith JO, de Wit E, Munster VJ. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*. 2020 Mar 17. doi: 10.1056/NEJMc2004973. [Epubahead of print]
- Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*, 2020 Mar 11 [Online ahead of print].
- Situación de COVID-19 en España. Ministerio de Sanidad, Ministerio de Ciencia e Innovación: <https://covid19.isciii.es/>
- Información científica-técnica. Enfermedad por coronavirus, COVID-19. Ministerio de Sanidad. Actualización; 4 de abril 2020.
- Red Nacional de Biobancos: <https://redbiobancos.es>
- Asociación Española de Bioseguridad: <https://aebios.org/>
- Medidas de seguridad durante la epidemia por COVID 19 en un servicio de Patología. Sociedad Española de Anatomía Patológica -*International Academy of Pathology* - Sociedad Española de Citología.
- Documento técnico. Procedimiento para el manejo de cadáveres de casos de COVID-19. Versión del 26 de marzo de 2020. Ministerio de Sanidad, Sociedad Española de Anatomía Patológica. Versión original del 26 de marzo de 2020, y actualizaciones del 5, 13, 20, 26 y 30 de marzo, y de 10 de abril.
- <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos.htm>
- https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version-1-1.pdf?sfvrsn=912a9847_2
- <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/biosafety-faqs.html>
- https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Listado_virucidas.pdf
- <https://www.isber.org/page/SPREC>

- <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/guidance-postmortem-specimens.html>
- CDC. Guidelines. Collection and Submission of Postmortem Specimens from Deceased Persons with Known or Suspected COVID-19, March 2020 (Interim Guidance). This document is an update to interim guidance as of March 25, 2020.
- WHO. Infection Prevention and Control for the safe management of a dead body in the context of COVID-19. Interim guidance 24 March, 2020.
- WHO. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19). Interim guidance 12, February 2020.