

	GESTION DES PRELEVEMENTS BIOLOGIQUES D'UN PATIENT SUSPECT COVID-19		BIO/PROT/0054 VERSION N°6
			Date de diffusion : 30/07/2021
Rédaction BRENET-EVERS Annie BIOLOGISTE 20/04/2021 FEGHALI Aimee BIOLOGISTE 26/05/2021	Validation BOURNAZAUD Yohana BIOLOGISTE 08/06/2021 BRENET-EVERS Annie CHEF DE PÔLE 27/05/2021 DEPRELE Carole PRESIDENT DU CLIN 29/07/2021	Approbation BARBATO Christine DSQGR 30/07/2021	Date de revue :

❖ **Ce document est consultable sur le manuel de prélèvement**

Référentiel : Fiche SFM concernant le COVID-19 du 28/09/2020 (version 6)

I. GENERALITES

Le SARS-CoV-2 (nouvelle dénomination du nCoV-2019) est un virus de la famille des coronavirus (coronavirus humains agents du rhume banal / NL63, HUK1...; SARS-CoV en 2003 ; MERS-CoV 2012). Il est à l'origine du syndrome appelé COVID-19.

- La transmission est respiratoire de type « gouttelettes » et contact.
- Le virus peut rester viable jusqu'à 3 heures au sein d'aérosols : cet aspect doit être pris en compte au laboratoire en cas d'incidents de manipulation ayant généré un aérosol ou d'incident de centrifugeuse sur des échantillons à risque élevé. En conditions expérimentales avec un inoculum lourd la durée de survie du SARS-CoV-2 varie de moins de 3 heures à plusieurs jours en fonction du matériau et des conditions expérimentales.
 - Les coronavirus sont sensibles aux désinfectants usuels virucides tels que l'eau de javel à 0,5%, l'acide peracétique/peroxyde d'hydrogène, l'éthanol à 70%...selon la norme EN 14476 s'ils sont utilisés suivant les recommandations du fabricant (respect de la concentration et du temps de contact).
- Les premières données sur le suivi des premiers patients COVID-19 hospitalisés en France rapportent une virémie inconstante, faible et de courte durée, principalement décrite actuellement dans les formes sévères (SDRA).
- La virurie reste inexistante mais la quantité de virus excrété dans les prélèvements respiratoires, le liquide pleural et les selles peut être élevée.

Des cas de contamination du personnel soignant ont été décrits mais **aucun cas de contamination du personnel de laboratoire n'a été rapporté.**

Les précautions standard de manipulation des agents infectieux au laboratoire sont suffisantes.

Ces éléments permettent d'évaluer le risque associé à la manipulation d'échantillons biologiques susceptibles de contenir du SARS-CoV2 : prélèvements respiratoires, liquide pleural et selles

- pour le diagnostic d'infection COVID-19
- pour un diagnostic complémentaire ou différentiel (panel diagnostiques, paramètres d'urgence) sans perte de chances pour le patient.

Selon les recommandations OMS, CDC et ECDC, la manipulation des échantillons microbiologiques d'un patient suspect COVID-19 peut s'effectuer dans un LSB2 (laboratoire de sécurité biologique de niveau 2) en respectant les bonnes pratiques de travail, surtout lors des manipulations pouvant générer des aérosols, en mettant à disposition une conduite à tenir en cas d'incident (traçabilité du personnel et des échantillons).

⇒ Seule la culture du virus doit se faire impérativement dans un LSB3.

II. DIAGNOSTIC ET PRELEVEMENTS

Rappels :

En France, le diagnostic spécifique de COVID-19 est réalisé actuellement par une RT-PCR spécifique sur un écouvillonnage nasopharyngé (technique de référence), nasal profond, oropharyngé salivaire (écouvillon ou aspiration) ou un prélèvement des voies respiratoires basses.

Plusieurs types de tests RT-PCR sont disponibles au CHAN :

- Test RT-PCR « rapide » réalisable en moins de 2 heures et 24/24 sur écouvillonnage nasopharyngé uniquement avec kit Xpert SARS-CoV-2 sur GeneXpert IV

dans des conditions ciblées, en raison de la tension en réactifs :

- Parturiente
- Patient présentant des symptômes de COVID19 et hospitalisé,
- Patient transféré dans un autre CH ou un CHU.
- Tests RT-PCR (2 troussees différentes sur BD max) réalisables sur écouvillonnage nasopharyngé, crachats et aspirations bronchiques, LBA à raison de 3 séries minimum par jour en semaine, 2 séries minimum par jour samedi, dimanche et fériés (1ère série lancée vers 9h00, dernière série lancée vers 16h30).

En cas de panne du BD Max les échantillons seront transmis au laboratoire de Virologie du CHU de Saint-Etienne .

En cas de panne du GeneXpert les échantillons seront traités sur BD Max.

Les autres échantillons prélevés (selles, LCR etc...) sont transférés au laboratoire de Virologie du CHU de Saint-Etienne .

Les prélèvements à réaliser pour le diagnostic initial COVID-19 sont les suivants :

- un prélèvement **systematique** des voies respiratoires hautes :
 - écouvillonnage naso-pharyngé avec milieu de transport type UTM (différents types de dispositifs sont validés pour la réalisation des tests RT-PCR)
 - écouvillonnage nasal profond, oropharyngé ou salivaire (si impossibilité de réaliser un prélèvement nasal)
- un prélèvement des voies respiratoires basses (crachats, LBA, aspiration trachéobronchique) doit être privilégié **en cas d'atteinte parenchymateuse et/ou d'infection évoluant depuis plus de 7 jours.**

Dans le cadre de la recherche de variants ou d'une réinfection COVID19 d'autres échantillons peuvent être prélevés (recherche de variants par RT-PCR de criblage +/- séquençage transmise au laboratoire de Virologie du CHU de Saint-Etienne, code COVSE).

III. PREPARATION ET ACHEMINEMENT DES PRELEVEMENTS

Les prélèvements biologiques destinés au laboratoire doivent être limités au strict nécessaire (diagnostic d'infection COVID-19 et analyses urgentes liés aux soins du malade).

Le service clinique prévient immédiatement le laboratoire du CHAN de la suspicion d'infection COVID-19.

Une attention particulière doit être apportée à l'hygiène des prélèvements : contenants bien fermés, absence de souillures externes...

L'extérieur des tubes, écouvillons et flacons d'hémocultures est vérifié (absence de souillure) et désinfecté dans le service si souillé avant l'envoi selon les procédures en vigueur dans le service.

**Respect de la règle :
UN PRELEVEMENT = UN EMBALLAGE.**

Prélèvements à risque élevé de contamination :

Les prélèvements à risque élevé de contamination par le COVID-19 (nasopharyngés, et pulmonaires et selles) **ne doivent pas être placés dans les mêmes emballages** que les autres prélèvements microbiologiques.

⇒ **Prélèvements respiratoires :**

- crachats, aspirations bronchiques, brossage distal protégé, LBA, liquide pleural
- écouvillon rhinopharyngé (pour recherche du SARS-CoV2 ou autre : grippe etc...)

⇒ **Selles**

Pour le **transport de ces prélèvements** utiliser :

- Un **1^{er} sachet de transport transparent contenant du papier absorbant** destiné à recueillir le prélèvement (pot, tube, etc.) **dans le local du prélèvement (chambre/box),**
- Un **2^{ème} sachet de transport jaune** portant **l'étiquette rouge « SUSPICION CORONAVIRUS »** = emballage **extérieur** destiné à emballer le 1^{er} sachet jaune à **l'extérieur du local de prélèvement (chambre/box)**
- Dans la poche kangourou du 2nd sachet : le **bon de demande d'examen** microbiologiques du CHAN ou le bon de prescription connectée **sur lequel est collée une étiquette patient supplémentaire** (pour scan du dossier au laboratoire)

CAS PARTICULIER DES PRELEVEMENTS DE DEPISTAGE DE COVID19 :

Le service clinique vient chercher au laboratoire les [kits de prélèvement COVID-19 complets](#) : à utiliser selon la fiche d'information « Composition du kit de prélèvement pour détection du COVID19 »

- Un écouvillon de prélèvement ou un prélèvement respiratoire (cf ci-dessus)
- Une fiche de prescription destinée au laboratoire de Virologie

La prescription n'est faite **que par un médecin senior**.

La partie la plus externe du kit (le sachet jaune externe étiqueté « SUSPICION CORONAVIRUS ») ne pénètre jamais dans le local du prélèvement (chambre, box, ...) afin de garantir la sécurité du personnel en aval.

Les prélèvements respiratoires cités ci-dessus sont adressés au laboratoire du CHAN obligatoirement par un soignant (à pied).

En cas de rupture d'approvisionnement le kit de prélèvement pourra se présenter sous une forme différente adaptée aux besoins et à l'approvisionnement (kit dérogatoire).

**En cas de fuite de l'échantillon dans le sachet, l'analyse du prélèvement n'est pas réalisée :
risque majeur de dissémination du virus associée à l'ouverture accidentelle d'un tube/flacon mal fermé et de contamination du personnel technique**

Prélèvements sans ou à faible risque de contamination COVID19:

- ⇒ Sang (: hémocultures, tubes de sang pour chimie, hématologie etc..), urines, liquides de ponction **sauf liquide pleural**, écouvillons rectaux pour dépistages de BMR/BHRe (quantité faible de selles)

Acheminement et emballage sont faits **également en double emballage**.

Rappel :

Les échantillons microbiologiques (urines, hémocultures etc...) ne doivent pas être mélangés dans un même sachet avec les tubes de sang.

IV. PRISE EN CHARGE PREANALYTIQUE DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES AU LABORATOIRE

Les triples emballages contenant les prélèvements à risque élevé de contamination destinés à la microbiologie ne seront ouverts qu'en laboratoire de sécurité microbiologique de niveau 2, sous PSM2 (poste de sécurité biologique de niveau 2).

CAS PARTICULIER DES PRELEVEMENTS DE DEPISTAGE DE COVID19 :

1. Enregistrement des tests de dépistage au laboratoire du CHAN

Codes Synergy : COV1 et COV3 (tests de routine BD Max), COV2 (test d'urgence GeneXpert)

Si besoin (exemple : panne), le laboratoire du CHU peut être joint au :

- 04 77 82 83 15 (secrétariat) ou au 04 77 82 87 73 (technique)
- En cas d'impossibilité de joindre la technique, appeler le 04 77 82 80 00 (standard CHU) en demandant le biologiste de garde
- n° fax Virologie : 04 77 82 81 52

2. Transmission de prélèvements de dépistages COVID-19 au Laboratoire de Virologie du CHU de Saint-Etienne (adresse ci-dessous) : si panne ou RT-PCR de criblage

Les prélèvements respiratoires cités ci-dessus (écouvillonnage ou aspiration nasopharyngés, crachats, aspirations trachéobronchiques, LBA) sont adressés au laboratoire de virologie du CHU de Saint-Etienne **en utilisant un conditionnement tertiaire de catégorie B (Norme UN 3373)/triple emballage : un sachet spécifique 95 kPa étiqueté avec :**

- une étiquette pré-imprimée portant la mention « A n'ouvrir qu'au Laboratoire de Virologie » à coller sur le sachet 95kPa.
- Plusieurs échantillons sous double-emballage peuvent être conditionnés dans ce même sachet 95kPa.
- **En cas de RT-PCR de criblage :**
 - Transmission via navette TSE sous enveloppe « COLIBRI » : une étiquette pré-imprimée portant l'adresse du laboratoire destinataire à coller sur le contenant le plus externe.
- **En cas de transmission de prélèvements (panne d'automate) :**
 - Prélèvements conditionnés **placés dans la mallette de transport** et transportés par Taxi JUSSIEU

Selon fiche : « Gestion des prélèvements pour suspicion de coronavirus COVID19. »

Pour rappel : l'extérieur des tubes doit être désinfecté avant l'envoi selon les procédures en vigueur dans le service clinique du CHAN/au laboratoire du CHAN.

Le triple emballage contenant tous les prélèvements à visée diagnostique destinés à la virologie ne sera ouvert qu'au laboratoire destinataire : Laboratoire de Virologie du CHU

⇒ Ne pas ouvrir en dehors du PSM2

En cas de déversement de ces échantillons à la réception au laboratoire :

⇒ Décontaminer la surface de réception selon protocole dédié (Entretien des surfaces)

AUTRES PRELEVEMENTS :

- A l'arrivée au laboratoire, les prélèvements sont déballés, enregistrés, numérotés. Il n'est pas utile de les décontaminer à nouveau (risque de retard de prise en charge et donc perte de chance pour le patient).

Etant donné la virémie inconstante et souvent faible, les tubes de sang destinés à la biochimie, hémostase, gaz du sang ne présentent pas de risque de contamination par voie respiratoire. Ils sont donc pris en charge selon les procédures locales de manipulation d'échantillons potentiellement contaminés par des agents infectieux : précautions standard (port de gants + hygiène des mains fréquente).

V. REALISATION DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

- ⇒ Prélèvements à risque élevé de contamination : échantillons respiratoires et liquide pleural
- ⇒ La prise en charge de tous les échantillons (et principalement des échantillons respiratoires, liquides pleuraux) est réalisée **sous le PSM2 du poste des « Entrées »**.
 - La mise en culture de ces prélèvements à visée bactériologique ou mycologique,
 - les dépôts sur lame
 - la fixation des lames en vue d'un examen microscopiques'effectueront **sous ce PSM2**.
- ⇒ La réalisation d'états frais est abandonnée (à l'exception des PV pour recherche de Trichomonas).
- ⇒ Les comptages en cellule KOVA **pour les prélèvements à risque élevé de contamination : liquide pleural et LBA** ne sont plus réalisés :
 - Les cytologies de liquides pleuraux tout comme liquides d'ascite, liquides de dialyse péritonéale et liquides articulaires sont traités sur le module BodyFluids du Sysmex
 - Les liquides de ponction et LBA sont traités par **cytocentrifugation** :
 - Les chambres de cytocentrifugation pour cytospin sont préparées sous PSM2, **bouchés soigneusement**, et placés dans la cytocentrifugeuse.
 - Une fois la cytocentrifugation terminée, les chambres de cytocentrifugation sont **débouchées sous le PSM2**, les lames sont laissées sous PSM2 jusqu'à séchage complet puis sont recouvertes d'alcool absolu pour inactivation du virus jusqu'à évaporation complète de l'alcool.
 - Les lames sont ensuite colorées en dehors du PSM2 (**Gram et MGG**).
 - Les éléments (leucocytes/hématies) des LBA sont évalués semi-quantitativement par le technicien sur la lame de cytocentrifugation colorée au Gram, la lame colorée au MGG servant à la réalisation de la formule par le biologiste.
- ⇒ Les modalités d'ensemencement des prélèvements broncho-pulmonaires ont été adaptées afin de limiter la formation d'aérosols par vortexages successifs.

- **Lorsqu'un vortexage est nécessaire il doit être fait sous le PSM2.**

Prélèvements sans ou à faible risque de contamination :

Traitement des échantillons avec respect des précautions standard de manipulation des échantillons biologiques (gants + hygiène des mains +++) sous le PSM du poste des Entrées.

Les cultures microbiologiques de prélèvements de patients confirmés sont à traiter comme les autres cultures (examen des cultures sous le PSM2 très recommandée).

Les précautions standards et les bonnes pratiques s'appliquent.

Bonnes pratiques du travail sous PSM2 (selon Manuel de sécurité et sûreté biologique- 2^{ème} édition, 2019, chapitre 5) en annexe.

Les conditions de sécurité biologique sous PSM2 sont listées ci-dessous :

- Personnel en nombre limité dans la zone « Entrées » du secteur de Microbiologie : un seul technicien présent, 2 personnes au maximum.
- **Le port du masque chirurgical est impératif dans tout le laboratoire.**
- Tenue recommandée :
 - port de **gants jetables à usage unique** (à manchettes longues si possible) +
 - **sur-blouse + tablier plastique** pour protéger sa blouse des projections et renversements éventuels sous le PSM2 +
 - **sur-lunettes de protection** +
 - **charlotte**
- Les gants doivent être enlevés à chaque changement d'activité et **les mains frictionnées au SHA** .

- Les prélèvements sont triés avant d'être traités : les prélèvements à risque faible de contamination sont traités en premier, les prélèvements à risque élevé ensuite.

- Toute centrifugation doit se faire **en nacelle étanche** et **toute ouverture de nacelle de centrifugation doit se faire sous le PSM2 (voir annexe).**
- Tout vortexage doit se faire **sous le PSM2** : **risque majoré de création d'aérosols.**

- Le poste de sécurité microbiologique doit être **nettoyé immédiatement après chaque série de traitement de prélèvements, quels qu'ils soient** avec un détergent-désinfectant virucide (Norme EN 14476) en suivant les recommandations du fabricant (respect de la concentration et du temps de contact).
- **En cas de déversement de liquides biologiques ou de projections** sous le PSM2 suivre les indications définies dans le mode opératoire dédié.

- A l'issue des manipulations, retirer la surblouse puis les gants, puis le masque en le prenant par les lanières, la charlotte et les lunettes jetables, les éliminer dans un fût jaune pour DASRI
- Procéder à une hygiène des mains avec SHA (friction désinfectante hydro-alcoolique).

A l'issue de leur prise en charge, les prélèvements pour RT-PCR réalisés au laboratoire du CHAN et trouvés COVID19 POSITIFS doivent être regroupés pour être conservés à -20°C dans une boîte plastique dédiée et identifiée « POSITIFS COVID-19 ».

VI. GESTION DES DECHETS

Les déchets générés par **la prise en charge sous le PSM2 des prélèvements microbiologiques (tous assimilés à des prélèvements à risque élevé de contamination)** seront éliminés dans un conteneur jaune à DASRI dédié .
Ce conteneur est éliminé quotidiennement.

ANNEXE : BONNES PRATIQUES SOUS PSM2

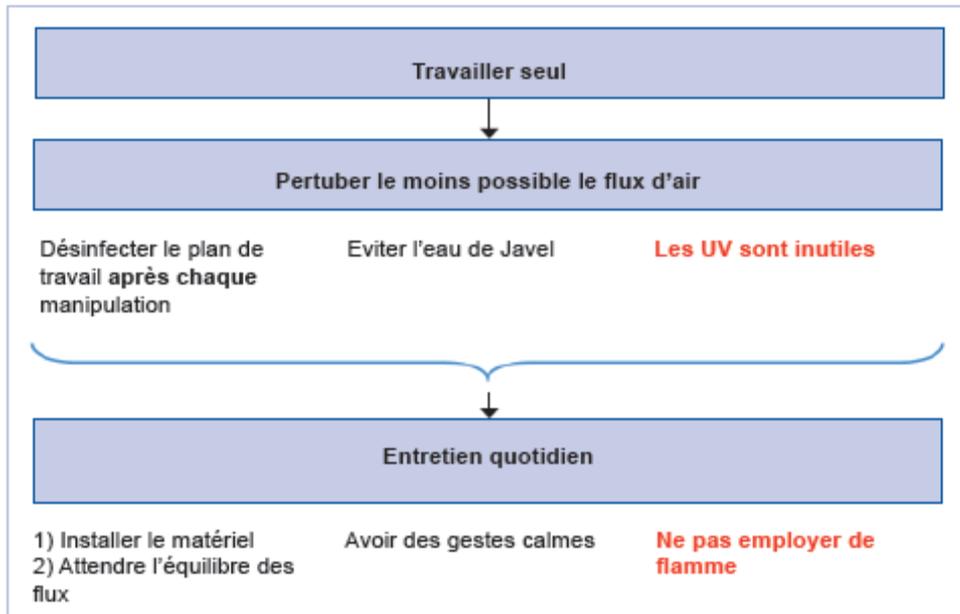


Figure 5.10 : Principales règles de manipulation sous PSM de Type II

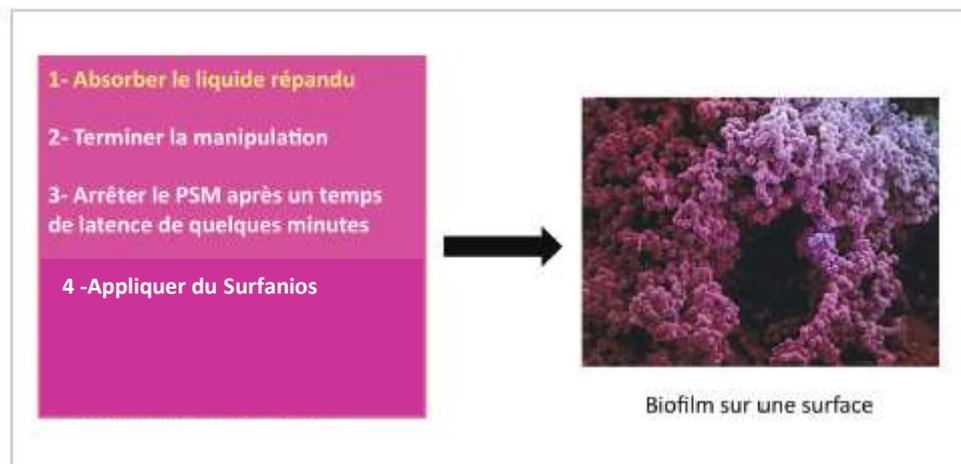


Figure 5.11 : Etapes de décontamination du plan de travail d'un PSM de Type II

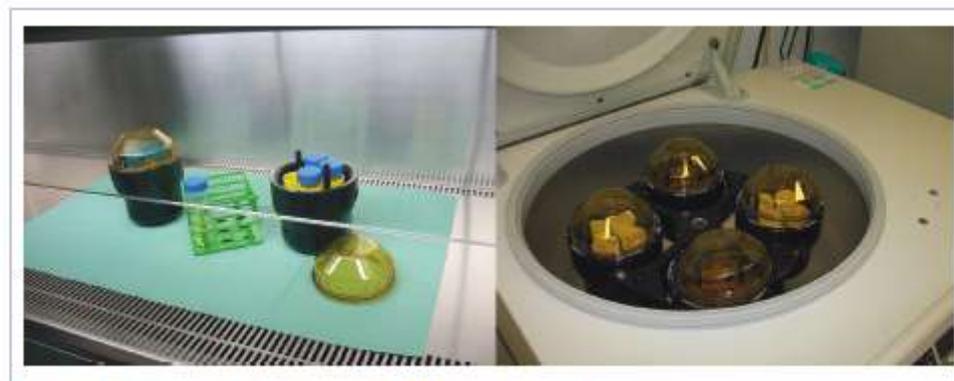


Figure 5.13 : Godets étanches sous PSM et en centrifugeuse