



**Raccomandazioni dell'Associazione Tecnico Scientifica – S.I.T.La.B.
N. 3/20 IT VER**

Preparedness dei laboratori italiani per la diagnosi di SARS-CoV-2

S.Stanziale (Padova), A.G. Bianculli (Roma), A. Magaldi (Potenza), S.A. Distefano (Palermo).

Rev. 1.0

SITLaB news

Pubblicato: 15 Marzo 2020

Copyright: © SITLaB

1. Introduzione

A partire dai primi giorni di febbraio 2020, come indicato nella “Procedura Regionale Nuovo coronavirus (2019-nCoV) Rev 00” del 11.02.2020 ⁽¹⁾, è stato richiesto alle regioni di identificare il Laboratorio di Riferimento Regionali (LRR) ⁽²⁾ a supporto del laboratorio di Riferimento Nazionale (LRN) dell’ISS per definire le procedure alla base della gestione della diagnosi di laboratorio dei casi sospetti di infezione da Sars CoV-2. Anche per questa diagnostica, come per numerose altre infezioni emergenti, l’UOC di Microbiologia e Virologia dell’Azienda Ospedale Universitaria di Padova è stata definita come riferimento regionale.

Numerose figure professionali all’interno di questa realtà di Sanità Pubblica sono già adeguatamente preparate ad affrontare la gestione di sorveglianza, diagnostica e notifica di infezioni.

Così il LRR del Veneto ha prontamente rivisto e divulgato delle linee guida per la gestione della conferma di laboratorio dei casi sospetti di infezione da COVID-19.

Rifacendosi alle indicazioni dell’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) è stato prodotto un documento in cui vengono precisati i seguenti punti:

- La manipolazione dei campioni biologici di pazienti con sospetto di infezione da Sars CoV-2, che arrivano all’attenzione del laboratorio, viene effettuata in spazi/laboratori di livello di biosicurezza 2 (BSL2), utilizzando dispositivi di protezione individuale standard e delle vie aeree ⁽³⁾.
- I prelievi del tratto respiratorio inferiore (bronco aspirati, bronco lavaggi, espettorati, ...) sono i campioni di elezione per la diagnosi di infezione da COVID-19, anche se il tampone nasofaringeo/orofaringeo è chiaramente il campionamento più facilmente reperibili e ugualmente adatti alla ricerca delle sequenze genomiche virali. È fortemente raccomandato effettuare un doppio prelievo, orale e faringeo, sullo stesso paziente al fine di arricchire il prelievo con cellule epiteliali delle vie respiratorie: il virus è associato a cellule pertanto in questo modo è possibile aumentare la sensibilità della diagnosi.
- I prelievi devono essere accompagnati da una scheda anamnestica: è un importante documento che il clinico che vede il paziente deve compilare al fine agevolare il lavoro del laboratorio che valuta l’appropriatezza dell’indagine e dovrà contattare le varie figure professionali addette al contenimento della diffusione del virus in caso il prelievo dovesse risultare positivo (es. Servizi di Igiene e Sanità Pubblica - SISP).
- Il LRR del Veneto ha da subito attivato una disponibilità a lavorare h24 per tale emergenza, gestendo immediatamente, con le risorse disponibili, turni di pomeriggio e notte per agevolare la gestione del paziente a livello clinico.

2. Conferma virologica dei casi sospetti di COVID-19

Partendo dal presupposto che si tratta di un'infezione virale nuova, identificata in Cina attorno alla prima metà di gennaio 2020, la diagnosi di laboratorio di infezione da COVID 19 si è basata fino a pochi giorni fa su test in house e non su test commerciali che sono stato in ogni modo prontamente sviluppati. Infatti, già dopo un mese dall'avvio dell'epidemia esistono numerosi saggi commerciali sia per la diagnosi diretta che per quella sierologica.

Infatti, fin dai primi casi osservati in Cina e poi in Italia, la diagnostica di laboratorio si è basata su test molecolari.

Su indicazione dell'OMS la diagnosi molecolare di infezione da COVID19 deve tener presente alcune informazioni in merito alla biologia del virus e alla scarsa conoscenza delle sue potenzialità evolutive. Pertanto, sono stati allestiti dei pannelli molecolari che si basano su metodi diversi e complementari, che permettono lo screening, la conferma e la caratterizzazione molecolare dei virus. Gli esami sierologici non sono al momento sufficientemente conosciuti ai fini di una diagnosi complementare a quelle molecolare.

Al momento la conferma di laboratorio dei casi sospetti di infezione da Sars CoV-2 è basata principalmente sulla diagnostica molecolare, anche se sempre più lavori scientifici stanno valutando la possibilità di aggiungere anche una diagnosi sierologica complementare data la notevole specificità del test molecolare e discapito di una non altissima sensibilità.

3. Tipologia dei campioni da analizzare

I campioni biologici raccomandati per la diagnosi di laboratorio del Sars CoV-2 sono: tamponi nasale e faringeo raccolti con opportuni tamponi adatti ad essere impiegati per saggi molecolari. Meglio ancora se i tamponi con cui viene effettuato il prelievo contengono mezzo di trasporto per la ricerca virale (Virus Transport Medium,VTM): in questo caso i tamponi risultati positivi alla diagnostica molecolare potrebbero essere utilizzati per l'isolamento del virus in coltura. Il virus isolato in coltura darà la possibilità di sequenziare interamente e più agevolmente il genoma virale e utilizzare il ceppo virale per saggi funzionali (es. studio di farmaci antivirali, di vaccini e di saggi immuno-fenotipici).

Come già detto altri materiali respiratori sono ugualmente idonei per la ricerca del virus con test molecolari, come aspirato naso-faringeo, aspirato tracheale, lavaggio bronco alveolare.

Da subito è stata data indicazione di reperire anche campioni ematici dei pazienti con sospetto clinico di COVID-19: in questo caso sarà necessario definire dei protocolli di studio, di validazione per puntualizzare il valore aggiunto delle indagini di laboratorio effettuate su sangue. Al momento molta di questa indagine di laboratorio è in fase di standardizzazione.

Sempre sulla base delle indicazioni dell'OMS, a prescindere dall'esatto processo di laboratorio utilizzato per la diagnosi di infezione da COVID-19, sono state indicate le corrette modalità di prelievo, conservazione dei campioni che dovranno essere spediti al laboratorio. In tal senso, oltre a precisare la preservazione delle caratteristiche di idoneità del prelievo per poter essere processato, si è definita con esattezza l'informazione sul tipo di contenitore con cui i vari prelievi devono essere trasportati e fatti arrivare al laboratorio.

Tutti i prelievi effettuati su pazienti con sospetto COVID-19 vanno considerati delle fonti di infezioni e pertanto trasportati su contenitori Triplo pacco secondo la norma stabilita. Il contenitore così fatto permette di proteggere da eventuali dispersioni/rotture del campione sia chi trasporta il campione sia chi lo andrà a ricevere.

4. Test Molecolare utilizzato per la diagnosi di Sars CoV-2

I laboratori che si sono organizzati per eseguire la diagnosi molecolare in house si sono attenuti alle linee guida dell'OMS per la messa a punto di test diagnostici.

La forza della diagnostica molecolare in house va vista nella possibilità di “aggiornare”, rivedere e modificare il protocollo in tempo reale sulla base delle recenti scoperte scientifiche. Un altro punto di forza dei sistemi in house è la flessibilità della gestione degli esami di approfondimento che sono alla base di una diagnosi definitiva. Detto questo, anche i saggi commerciali molecolari che numerosi laboratori HUB utilizzano sono stati realizzati sulla base delle indicazioni dell'OMS.

In prima battuta è necessario eseguire uno screening per la ricerca del gene E del virus, e nel caso ci sia una reattività la conferma andrà eseguita ricercando in RT-PCR anche gli altri target utili alla conferma, ovvero il gene RpRd e il gene N. Sono tutti frammenti del genoma del Sars CoV-2, virus a +ssRNA, indispensabili come target della RT-PCR utilizzata per la diagnostica molecolare.

Pertanto, si evince come tale diagnostica necessita di una robusta formazione, conoscenza dei metodi molecolari di base ma anche delle informazioni relative alla biologia del virus sempre in continua evoluzione.

Per una informazione adeguata e continua sull'emergenza COVID-19 è raccomandato il sito www.salute.gov.it/nuovocoronavirus.

Referenze:

- ⁽¹⁾ Procedura Regionale Nuovo coronavirus (2019-nCoV) Rev 00 del 11.02.2020
- ⁽²⁾ DGPRES-DGPRES-P 0005443-22/02/2020- COVID-2019. Nuove indicazioni e chiarimenti
- ⁽³⁾ Rapporto ISS COVID-19 N2/2020