

INDICE	DISTRIBUITO A:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Premessa 2. Diagnosi di Laboratorio 3. Scopo e Applicazione <ol style="list-style-type: none"> a) Casi sospetti e casi positivi b) Contatti stretti asintomatici 4. Criticità Diagnostiche 5. Responsabilità 6. Accettazione campioni 7. Tipologia di campioni: modalità di invio e conservazione 8. Test e strumenti in uso <ol style="list-style-type: none"> a) Test molecolari veloci b) Test molecolari di "routine" c) Test sierologici 9. Elenco strumentazione 10. Registri e documenti 11. Flowchart diagnostica microbiologica 12. Riferimenti 	<p style="text-align: center;">UNITA' DI CRISI COVID-19 GOM DIREZIONE SANITARIA</p> <hr/> <p style="text-align: center;">Aggiornamento: 15 maggio 2021</p>

data	REDATTO	VERIFICATO	APPROVATO
15 maggio 2021	Dirigenti: F. d'Aleo; M. Bonofiglio; A. Meliaddò; A.M. Oliva; G. Cortese; C. Muzzupappa	Dirigenti: F. d'Aleo; M. Bonofiglio	M. Conte M. Chisari

Aggiornamento diagnostica COVID-19 in relazione alla comparsa di varianti e all'acquisizione di nuove metodiche diagnostiche.

1. PREMESSA

Il presente documento è stato redatto e aggiornato dai dirigenti del TEAM COVID-19 in servizio presso dell'UOC di Microbiologia e Virologia. Considerando l'attuale situazione epidemiologica in continua evoluzione si è osservata un'evoluzione dei test, nonché un cambiamento nella situazione epidemiologica dovuta alla circolazione di nuove varianti virali, che non possono non essere prese in considerazione; pertanto, si è reso necessario il presente aggiornamento il quale riassume i documenti e le circolari del ISS¹ e del Ministero della Salute² nonché include le linee d'indirizzo delle società scientifiche (AMCLI³, ESCMID⁴), del WHO⁵ e del ECDC⁶. Per i documenti integrali si rimanda ai riferimenti presenti sui siti istituzionali.

2. DIAGNOSI DI LABORATORIO

I test diagnostici per la rilevazione di SARS-CoV-2 e delle eventuali VOC (Variant of Concern) sono effettuati attraverso tecniche di biologia molecolare che prevedono l'amplificazione genica di sequenze target tramite real-time PCR e tecnica dell'amplificazione isoterma (LAMP). Tutti i test utilizzati presso il laboratorio sono dotati di marcatura CE Dispositivi Medici Diagnostici In Vitro IVD 98/79/CE. Presso l'UOC di Microbiologia e Virologia è possibile effettuare la ricerca del genoma virale di SARS-CoV-2 su diversi campioni biologici:

- tampone rinofaringeo
- tampone faringeo
- aspirato endotracheale, lavaggio bronchiale, BAL
- feci⁷

I campioni una volta prelevati devono pervenire presso l'accettazione dell'UOC di Microbiologia e Virologia dove il personale di servizio provvederà a valutarne l'idoneità. La rt-PCR è il "gold standard" per la diagnosi d'infezione da SARS-CoV-2. La rilevazione dell'RNA virale eseguita in laboratorio da campioni clinici (in genere tamponi nasofaringei o orofaringei) ad oggi rimane il saggio di riferimento internazionale per sensibilità e specificità ed è in grado di rilevare il patogeno anche a bassa carica virale in soggetti sintomatici, pre-sintomatici o asintomatici. Per la complessità della metodica, la rilevazione di SARS-CoV-2 viene eseguita esclusivamente in laboratori specializzati con operatori esperti⁸. Il risultato può essere ottenuto in un minimo di 3-5 ore ma situazioni organizzative e logistiche possono richiedere anche 1-2 giorni.⁹ I risultati positivi ad un test di biologia molecolare sono indicativi della presenza di RNA del SARS-CoV-2; ciò nonostante, per determinare lo stato di paziente infetto è necessaria la correlazione clinica con l'anamnesi e con altri dati diagnostici del paziente stesso. I risultati positivi non escludono la presenza di infezioni batteriche o di infezioni concomitanti da altri virus. I risultati negativi non escludono un'eventuale infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere usati come unica base per il trattamento o per altre decisioni riguardanti la gestione dei pazienti.

¹ <https://www.iss.it>

² <http://www.salute.gov.it/portale/home.html>

³ <http://www.amcli.it>

⁴ <https://www.escmid.org>

⁵ <https://www.who.int>

⁶ <https://www.ecdc.europa.eu/en>

⁷ * l'invio di campioni di feci deve avvenire previo accordo con un dirigente in servizio presso UOC di Microbiologia e Virologia.

⁸ Ministero della salute. Pandemia di COVID-19 – Aggiornamento delle indicazioni sui test diagnostici e sui criteri da adottare nella determinazione delle priorità. Aggiornamento delle indicazioni relative alla diagnosi di laboratorio (0011715-03/04/2020). Roma: Ministero della Salute; 2020.

Nelle more che il saggio delle varianti non rappresenti in alcun modo un'urgenza, e che lo stesso sarà espletato cadenzato tra i tre e i sette giorni il laboratorio di Microbiologia e Virologia ha in uso kit diagnostici che consentono di identificare, tra i campioni con risultato positivo per SARS-CoV-2 in RT-PCR e $ct < 27$, i possibili casi di infezione riconducibili ai casi di sospette varianti.

3. SCOPO E APPLICAZIONE

I test diagnostici in uso presso UOC di Microbiologia e Virologia sono mirati all'accertamento dei casi sospetti e/o probabili di infezione da SARS-CoV-2 al fine di garantire l'isolamento dei casi accertati e limitare la diffusione del contagio. Tutti i saggi in uso includono un controllo interno al fine di validazione del processo di estrazione e confermare l'integrità del ciclo di PCR.

Si riportano alcune proposte di indicazioni a supporto della strategia d'uso⁹:

- a) Casi sospetti e casi positivi
 - Il test è mirato alla ricerca del virus nel contesto delle indagini cliniche ed epidemiologiche di soggetti con sintomatologia compatibile con una infezione da SARS-CoV-2 e ai test effettuati per definire la guarigione dei casi positivi.
- b) Contatti stretti asintomatici
 - Non è raccomandato prescrivere test diagnostici ai "contatti" di contatti stretti di caso confermato; a tal proposito si faccia riferimento alla circolare del Ministero della Salute n. 32850 del 12 ottobre 2020 "COVID-19: indicazioni per la durata ed il termine dell'isolamento e della quarantena"¹⁰.

4. CRITICITA' DIAGNOSTICHE

- La diagnostica di laboratorio necessita di un corretto quesito clinico che deve accompagnare il campione biologico.
- Necessità di un colloquio diretto e quotidiano tra clinico e microbiologo.
- La diagnostica indirizzata alla rilevazione di SARS-CoV-2 necessita di aree ad alto biocontenimento.
- Formazione continua del personale dedicato all'area tecnica e diagnostica.
- Carenza di personale tecnico.

5. RESPONSABILITA'

- Dirigenti Biologi
 - Scelgono il test diagnostico
 - Supervisionano la corretta esecuzione dei test di biologia molecolare (rt-PCR)
 - Validano le sedute di estrazione e amplificazione
 - Validano il risultato finale
 - Inseriscono i risultati sul sistema LIS
 - Firmano i referti

⁹ <https://www.salute.gov.it/> NOTA TECNICA - Test di laboratorio per SARS-CoV-2 e loro uso in sanità pubblica

¹⁰ <https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2020&codLeg=76613&parte=1%20&serie=null>

- TSLB (Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico)
 - Effettuano la manutenzione tecnica giornaliera e programmata della strumentazione
 - Preparano i campioni da sottoporre ad analisi
 - Caricano i campioni negli strumenti
 - Controllano la validità dei kit usati
 - Preparano e controllano la strumentazione tecnica
- Personale Infermieristico
 - Accettano i campioni e provvedono alla registrazione sul sistema LIS
 - Valuta l'idoneità dei campioni

Dirigenti Supervisor e Referenti settore COVID	Dr. Francesco d'Aleo Dr.ssa Martina Bonofiglio	Telefono 0965 397410
Dirigenti Responsabili settore COVID	Dr.ssa Antonella Meliadò Dr. Giuseppe Cortese Dr. Claudio Muzzupappa	
Dirigente Responsabile Varianti	Dr. Giuseppe Cortese	
Dirigente Responsabile Controlli di Qualità	Dr.ssa Antonella Meliadò	

6. ACCETTAZIONE DEI CAMPIONI

Tutti i campioni per essere accettati e processati devono pervenire obbligatoriamente etichettati e inseriti singolarmente all'interno di buste per il trasporto di materiale infettivo. Non è possibile accettare campioni non etichettati o etichettati in maniera non corretta. Tutti i campioni pervenuti in maniera errata saranno refertati con la seguente dicitura: "*Campione non idoneo*" accompagnato da eventuale nota.

7. TIPOLOGIA DEI CAMPIONI

- Tampone naso/faringeo effettuato con sonda sottile e inserito in apposito tubo UTM¹¹ sul quale va apposta la relativa etichetta. Il tampone deve pervenire entro due ore dal prelievo.
- Broncolavaggio/BAL da far pervenire in contenitore apposito a collo largo sul quale è apposta specifica etichetta. Il BRA/BAL deve pervenire entro due ore dal prelievo.
- Feci. Il campione deve pervenire appositamente etichettato entro due ore.
- Provetta di siero per la ricerca di anticorpi anti-SARS-CoV-2 deve pervenire appositamente etichettata, entro un ora dal prelievo.

¹¹ Per i pazienti nei quali è richiesto un test rapido, è necessario far pervenire un secondo tampone inserito all'interno di una provetta sterile per urine, senza l'aggiunta di alcuna soluzione (tampone secco) con la stessa etichetta del tampone UTM. Il tampone deve OBBLIGATORIAMENTE pervenire con apposita richiesta d'urgenza con firma e timbro del medico richiedente. Tamponi pervenuti senza richiesta seguiranno l'iter dei "test molecolari di routine".

8. TEST E STRUMENTI IN USO

I tamponi per la ricerca di SARS-CoV-2 che richiedono regime d'urgenza devono **obbligatoriamente** pervenire accompagnati da richiesta contenente: notizie cliniche dettagliate, firma e timbro del medico richiedente; **al microbiologo dirigente, sulla base delle notizie cliniche pervenute, spetta la scelta del test da utilizzare.** I tamponi pervenuti senza richiesta specifica e senza notizie cliniche seguiranno l'iter della routine. I tamponi dei pazienti positivi in follow-up, ricoverati presso le diverse Unità Operative saranno processati esclusivamente con sistema di "test molecolare di routine"; questo si rende necessario al fine di valutare la diversa espressione genica in corso di malattia/guarigione. Per questo set di pazienti non è possibile utilizzare piattaforme quali VITAPCR/GeneXpert/FILMARRAY.

1. test molecolari veloci

i. VITAPCR Menarini¹²

Si tratta di un test diagnostico molecolare rapido che utilizza la tecnologia rt-PCR LAMP per la rilevazione dell'RNA virale in tamponi rinofaringei e orofaringei prelevati da pazienti con segni e sintomi di infezione respiratoria. Il test consente di fornire una risposta di infezione per SARS-CoV-2. Tempo di esecuzione circa 20'.

ii. GeneXpert Cepheid

Xpert Xpress SARS-CoV-2 è un test di reazione a catena della polimerasi in tempo reale (rt-PCR) previsto per il rilevamento qualitativo degli acidi nucleici del SARS-CoV-2 in campioni di analisi da tampone nasofaringeo, tampone nasale o lavaggio/aspirato nasale prelevati da soggetti con sospetta infezione da SARS-CoV-2. I risultati positivi sono indicativi della presenza di RNA del SARS-CoV-2. Tempo di esecuzione di 45'.

iii. FILMARRAY Biofire^{12, 13}

Il pannello respiratorio per FILMARRAY™ è in grado di analizzare 17 virus e 3 batteri causa di infezioni delle vie aeree superiori con una sensibilità e una specificità globali del 95 e del 99%, rispettivamente. Funziona con un sistema di PCR multiplex. Gli acidi nucleici degli organismi respiratori virali e batterici identificati da questo test sono generalmente rilevabili nei campioni NPS durante la fase acuta dell'infezione. Tempo di esecuzione di 45'.

2. test molecolari di "routine"

iv. Seegene NIMBUS + Allplex™ SARS-CoV-2 Assay

Si tratta di un test multiplex rt-PCR, di seconda generazione, per lo screening e conferma simultanea delle infezioni COVID-19 in un singolo tubo di reazione; permette la rilevazione simultanea di quattro differenti target virali. Il sistema permette l'estrazione e l'amplificazione di 72 tamponi in un tempo stimato di circa 5 ore.

¹² I test VITAPCR Menarini e FILMARRAY Biofire non sono utilizzati e utilizzabili nel monitoraggio dei pazienti positivi ricoverati. Questa coorte di pazienti sarà valutata solo ed esclusivamente attraverso "test molecolari di routine".

¹³ Il test FILMARRAY Biofire non può essere utilizzato in assenza di sintomatologia clinica fortemente compatibile con infezione respiratoria. L'uso improprio in assenza di sintomatologia potrebbe risultare fuorviante ai fini della diagnosi.

v. ELITe InGenius + SARS-CoV-2 ELITe MGB Kit

Si tratta di un test qualitativo di rt-PCR, di ultima generazione, per lo screening e conferma di infezioni da COVID-19 a partire dal tubo primario o da tubo secondario da 2 mL; permette la rilevazione simultanea di due differenti target virali (gene ORF8 e gene RdRp); utilizza un controllo intero (IC) endogeno umano RNasi P. Il sistema permette l'estrazione e l'amplificazione di 12 tamponi in un tempo stimato di circa 3 ore.

3. test sierologici

vi. LIAISON® XL – Diasorin Inc

La ricerca degli anticorpi specifici contro SARS CoV-2 è l'approccio diagnostico complementare alla ricerca diretta del virus o delle sue componenti, ed è in grado di fornire informazioni diverse e, esse stesse, complementari alle indagini biomolecolari. Infatti, mentre il virus (rilevato mediante test molecolare o antigenico) è evidenziabile nelle prime fasi dell'infezione, gli anticorpi vengono prodotti a partire da 7-10 giorni dopo l'esordio dei sintomi, e possono permanere per lungo tempo. Il test sierologico viene eseguito per misurare il livello di anticorpi IgG anti-Coronavirus SARS-CoV2 in pazienti che sono stati o sono affetti da Covid-19 e in soggetti vaccinati tramite prelievo da sangue venoso periferico per la raccolta di siero o plasma. Si utilizzano due test sierologici che rilevano in chemiluminescenza (CLIA) la presenza di anticorpi IgG del virus:

- *LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG*, rileva la presenza di anticorpi specifici di classe IgG anti-S1 e anti-S2 di Sars-cov-2. Il volume minimo di campione necessario per una determinazione è 170 µL.
- *LIAISON® SARS-CoV-2 Trimeric S IgG*, rileva gli anticorpi IgG specifici diretti contro la proteina spike trimerica di SARS-CoV2. Il volume minimo di campione necessario per una singola determinazione è 160 µL.

Un risultato positivo del test rivela la presenza di anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 e generalmente indica un'esposizione a SARS-CoV-2. I risultati dei test vengono refertati come positivi o negativi, accompagnati da un valore numerico relativo alla misurazione quantitativa. La diagnosi dell'infezione da SARS-CoV-2 non può essere formulata sulla base del risultato di un singolo test, il quale deve essere valutato insieme ad altri riscontri clinici, alla storia del paziente e al giudizio del medico.

9. ELENCO STRUMENTAZIONE

- n° 2 VITA PCR MENARINI
- n° 8 canali GeneXpert
- n° 4 canali FILMARRAY Biofire
- n° 2 Seegene NIMBUS
- n° 1 ELITe InGenius
- n° 1 LIAISON® XL – Diasorin Inc

10. REGISTRI – ETICHETTE – DOCUMENTI

- Tutti i campioni processati presso UOC di Microbiologia e Virologia sono riportati, con apposita etichetta, su specifici registri interni e su sistema LIS; entrambi consentono una rapida consultazione e verifica dei risultati.
- Sono elaborati appositi codici per singolo campione:

	NOMINATIVO	COD LIS	COD
i.	SARS-CoV-2 Tampone nasale	800A	RCC19
ii.	SARS-CoV-2 Tampone faringeo	800B	RCC19B
iii.	SARS-CoV-2 Broncoaspirato	800E	RCC19E
iv.	SARS-CoV-2 BAL	800F	RCC19F
v.	SARS-CoV-2 Feci	800H	
vi.	Sierologico SARS-CoV-2	900A	

- L'UOC di Microbiologia e Virologia conserva le relative linee di indirizzo e gli aggiornamenti societari e ministeriali.

11. FLOWCHART DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA

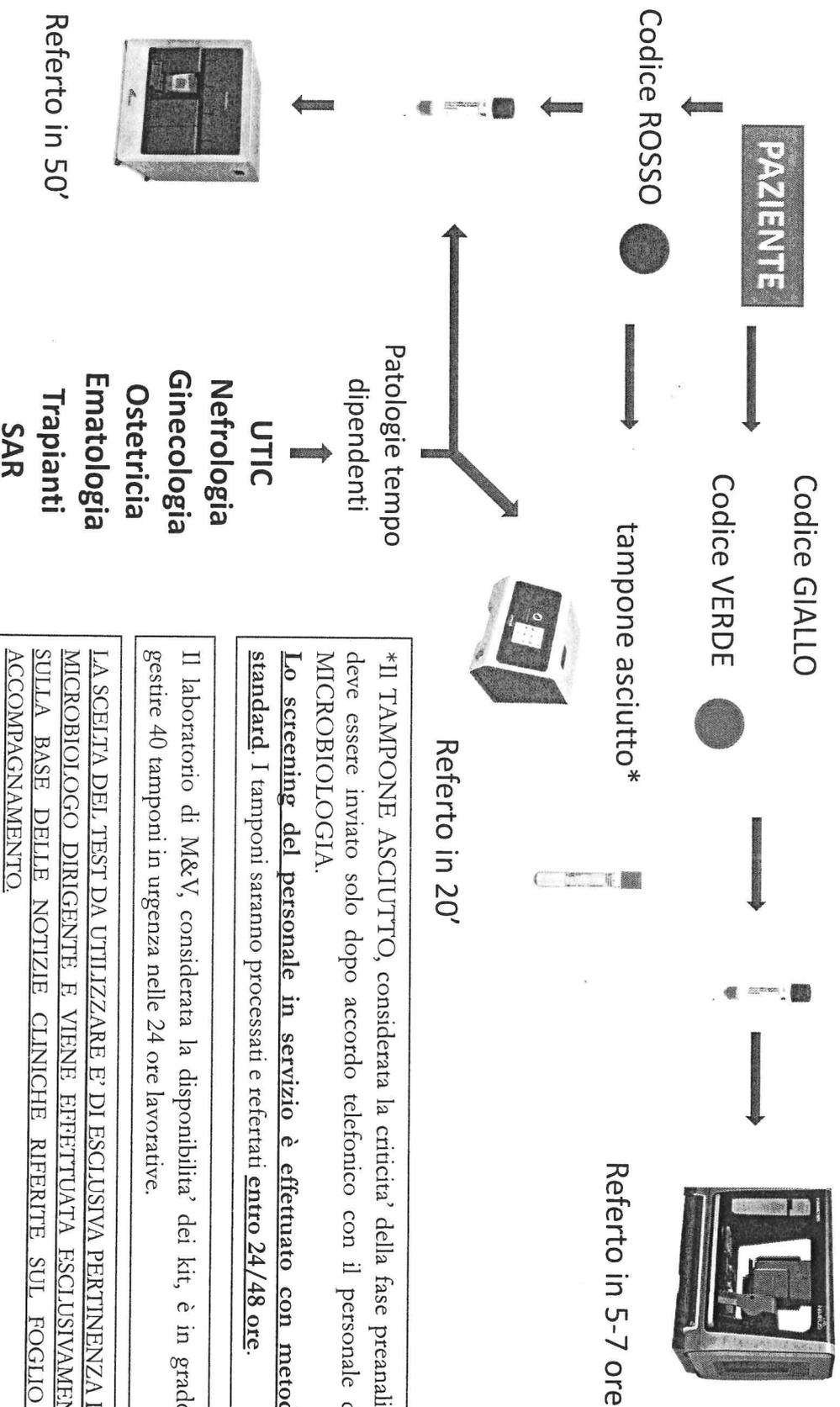
Vedi file allegato.

12. RIFERIMENTI

1. <https://www.iss.it>
2. <http://www.salute.gov.it/portale/home.html>
3. <http://www.amcli.it>
4. <https://www.escmid.org>
5. <https://www.who.int>
6. <https://www.ecdc.europa.eu/en>
7. Ministero della salute. Pandemia di COVID-19 – Aggiornamento delle indicazioni sui test diagnostici e sui criteri da adottare nella determinazione delle priorità. Aggiornamento delle indicazioni relative alla diagnosi di laboratorio (0011715-03/04/2020). Roma: Ministero della Salute; 2020.
8. <https://www.salute.gov.it/> NOTA TECNICA - Test di laboratorio per SARS-CoV-2 e loro uso in sanità pubblica.
9. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/>
10. <https://www.cepheid.com/>
11. <https://www.menarindiagnosics.it/>
12. <https://www.seegene.com/>
13. <https://www.elitechgroup.com/>

UNITA' OPERATIVA COMPLESSA
MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA
dir. Marco Conte

Percorso Tamponi COVID-19



*Il TAMPONE ASCIUTTO, considerata la criticità della fase preanalitica, deve essere inviato solo dopo accordo telefonico con il personale della MICROBIOLOGIA.

Lo screening del personale in servizio è effettuato con metodica standard. I tamponi saranno processati e refertati entro 24/48 ore.

Il laboratorio di M&V, considerata la disponibilità dei kit, è in grado di gestire 40 tamponi in urgenza nelle 24 ore lavorative.

LA SCELTA DEL TEST DA UTILIZZARE E' DI ESCLUSIVA PERTINENZA DEL MICROBIOLOGO DIRIGENTE E VIENE EFFETTUATA ESCLUSIVAMENTE SULLA BASE DELLE NOTIZIE CLINICHE RIFERITE SUL FOGLIO DI ACCOMPAGNAMENTO.