

**Info Authors :**

<sup>1</sup> Tecnico di laboratorio biomedico, Laboratorio di microbiologia e virologia. Fondazione PTV, Roma;  
 - Laboratorio di Microbiologia e Virologia. Fondazione "PTV" Roma  
 - Direttore Didattico del Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico, presso l'Università degli studi di Roma "Tor Vergata" e dell'Università Saint Camillus International University of Health Sciences, Roma  
 - Vice-Presidente della Commissione d'Albo Tecnici di Laboratorio Biomedico, Ordine TSRM-PSTRP di Roma

**Parole chiave:**

COVID-19; prevenzione; igiene; diagnosi; terapia

## SARS-COV-2: STATO DELL'ARTE

Fabbio Marcuccilli <sup>1</sup>

### PREMESSA

**L**e epidemie e pandemie ci sono sempre state e ci saranno sempre.

La storia ci ricorda cronologicamente la febbre tifoide, la peste Antonina, il morbo di Giustiniano, la peste nera, il Tifo, le pandemie di colera, la famosa influenza spagnola del 1918, riconducibile al ceppo H1N1, che portò a più di 20 milioni di morti nel mondo, la "Asian FLU" ceppo H2N2 del 1957, che portò a 1 milione di morti, la "Hong Kong Flu" ceppo H3N2 del 1968, che portò ad 1 milione di morti, l'epidemia di HIV/AIDS del 1981, SARS-CoV-1 del 2002, l'influenza A H1N1 tra il 2009 e Agosto 2010, e in ultimo la pandemia di COVID-19 del 2019-2020.

Questa breve premessa, per smentire quanto dichiarato da alcuni sull'origine del virus, rafforzata anche dall'evidenza scientifica dall'autore, Kristian G. Andersen (Nature Medicine 2020) che il nuovo COVID-19 non è stato creato in laboratorio, bensì deriva da una zoonosi.

**I**l giorno 31 dicembre 2019, le autorità sanitarie cinesi segnalano all'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) la presenza di un focolaio di casi di polmonite ad eziologia sconosciuta, nella città di Wuhan, nella provincia di Hubei.

Nella data del 07 gennaio 2020, veniva isolato, da un paziente riconducibile al focolaio in atto, un nuovo Coronavirus denominato, 2019 (n-CoV), nello specifico trattasi di un beta CoV del gruppo 2B, che presenta una similarità nella sequenza genomica del 70% a quella della SARS-CoV.

Da metà gennaio i casi confermati sono aumentati notevolmente, fino alla dichiarazione dell'OMS dell'11 marzo 2020, che la nuova infezione da coronavirus SARS-CoV-2, può essere considerata pandemia, ma ancora controllabile.

Clinicamente la patologia si presenta con un periodo di incubazione medio di 2-7 giorni fino a 14 giorni, con manifestazioni tipiche di febbre, tosse secca, mal di gola e difficoltà respiratorie.

Attualmente in base alle raccomandazioni dell'OMS viene indicato di fare la diagnosi su campioni biologici delle vie aeree superiori, come l'aspirato rinofaringeo, i tamponi nasofaringei e orofaringei combinati, per aumentare la sensibilità, oppure nelle vie respiratorie basse, come bronco lavaggi e bronco aspirati.

L'espettorato anche se rappresenta una buona matrice biologica di indagine è sconsigliata per l'alta percentuale di formazione di aerosol (TABELLA 1).

**TAB.1 : SPECIMENTS TO BE COLLECTED FROM SYMPTOMATIC PATIENTS AND CONTACTS**

	Test	Type of sample	Timing
<b>Patient</b>	NAAT	<b>Lower respiratory tract</b>	Collect on presentation.
		- sputum - aspirate - lavage	Possibly repeated sampling to monitor clearance. Further research needed to determine effectiveness and reliability of repeated sampling.
		<b>Upper respiratory tract</b>	
		- nasopharyngeal and - oropharyngeal swabs - nasopharyngeal wash/nasopharyngeal aspirate	
		<b>Consider stools, whole blood, urine, and if diseased, material from autopsy</b>	
<b>Patient</b>	Serology	Serum for serological testing once validated and available	Paired samples are necessary for confirmation with the initial sample collected in the first week of illness and the second ideally collected 2-4 weeks later (optimal timing for convalescent sample needs to be established).
<b>Contact</b>  (in health-care centre associated outbreaks or other settings where contacts have symptoms, or where asymptomatic contacts have had high-intensity contact with a COVID-19 case.	NAAT	Nasopharyngeal and oropharyngeal swabs	Within incubation period of last documented contact.
	Serology	Serum for serological testing once validated and available	Baseline serum taken as early as possible within incubation period of contact and convalescent serum taken 2-4 weeks after last contact (optimal timing for convalescent sample needs to be established).

Molto importante è la “collection” del campione che deve avvenire rigorosamente secondo le linee guida, conservato e inviato alle giuste temperature, prima della processazione, la fase pre-analitica che per noi laboratoristi è molto importante (TABELLA 2).

In base alle indicazioni dell'OMS 2020, i pazienti con sospetti sintomi devono essere sottoposti al prelievo e testati con il sistema Gold Standard della RT-PCR.

Nel mese di febbraio 2020, con l'epidemia in atto, i primi test molecolari certificati CE/IVD e FDA, erano pochi, con l'impossibilità di confrontarli tra loro e con uno standard internazionale di riferimento, per valutarne la sensibilità e specificità analitica.

Nel corso del tempo, le company, che hanno ricevuto la certificazione CE/IVD e/o FDA sono aumentate, e di ultima introduzione è il test molecolare (POCT) con approvazione FDA, che permette di fornire risultati positivi, entro i 5

minuti e i risultati negativi, entro i 13 minuti.

Di norma i test molecolari standard presenti sul mercato, possono durare da un minimo di 45 minuti ad un massimo di 4 ore, con la possibilità di lavorare i campioni in modalità singola oppure in batch.

I target dei test molecolari, sono le regioni del genoma virale altamente conservate, come ad esempio le sequenze dei geni: E, S, N, RdRP e E-orf1ab.

Essendo un virus a RNA sprovvisto dell'attività esonucleasica (proofreading 3'-5') durante la replicazione virale, l'RNA polimerasi virale, può commettere degli errori, pertanto in futuro potremmo assistere alla presenza di mutazioni significative nel genoma del virus, che si ripercuoteranno sia sull'affidabilità dei sistemi diagnostici nonché sui risvolti clinici.

**TAB.1 : SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE**  
(ADAPTED FROM REF 6 AND REF 29,30)

Specimen type	Collection materials	Storage temperature until testing in-country laboratory	Recommended temperature for shipment according to expected shipment time
Nasopharyngeal and oropharyngeal swab	Dacron or polyester flocced swabs*	2-8 °C	2-8 °C if ≤ 5 days -70 °C (dry ice) if > 5 days
Bronchoalveolar lavage	Sterile container *	2-8 °C	2-8 °C if ≤ 2 days -70 °C (dry ice) if > 2 days
(Endo)tracheal aspirate, nasopharyngeal or nasal wash/aspirate	Sterile container *	2-8 °C	2-8 °C if ≤ 2 days -70 °C (dry ice) if > 2 days
Sputum	Sterile container	2-8 °C	2-8 °C if ≤ 2 days -70 °C (dry ice) if > 2 days
Tissue from biopsy or autopsy including from lung	Sterile container with saline or VTM	2-8 °C	2-8 °C if ≤ 24 hours -70 °C (dry ice) if > 24 hours
Serum	Serum separator tubes (adults: collect 3-5 ml whole blood)	2-8 °C	2-8 °C if ≤ 5 days -70 °C (dry ice) if > 5 days
Whole blood	Collection tube	2-8 °C	2-8 °C if ≤ 5 days -70 °C (dry ice) if > 5 days
Stool	Stool container	2-8 °C	2-8 °C if ≤ 5 days -70 °C (dry ice) if > 5 days
Urine	Urine collection container	2-8 °C	2-8 °C if ≤ 5 days -70 °C (dry ice) if > 5 days

\* For transport of samples for viral detection, use viral transport medium (VTM) containing antifungal and antibiotic supplements. Avoid repeated freezing and thawing of specimens. If VTM is not available sterile saline may be used in place of VTM (in such case, duration of sample storage at 2-8 °C may be different from what is indicated above).  
Aside from specific collection materials indicated in the table also assure other materials and equipment are available: e.g. transport containers and specimen collection bags and packaging, coolers and cold packs or dry ice, sterile blood-drawing equipment (e.g. needles, syringes and tubes), labels and permanent markers, PPE, materials for decontamination of surfaces etc

Riguardo i test molecolari, eseguiti da tampone è importante che gli stessi offrano una buona sensibilità analitica e che possano concordare con il valore predittivo positivo, e questo purtroppo non sempre accade, in quanto i sistemi molecolari non sempre sono **altamente sensibili**, oppure a volte il prelievo non è stato condotto correttamente.

I test molecolari debbono essere condotti da personale esperto che opera nell'ambito della biologia molecolare, guidati dalla presenza di

procedure/protocolli validate dal RSPP, dal Clinical Risk Management e dalla Direzione Sanitaria.

Ogni operatore deve attenersi strettamente ai protocolli operativi e segnalare eventi avversi. L'estrazione degli acidi nucleici deve essere condotta in una cappa biologica di classe II, collocata in un laboratorio di classe 2, idem l'allestimento della reazione della PCR deve essere svolta nel suddetto ambiente, al fine di contenere il rischio biologico.

**I facciali filtranti FFP2/FFP3 (EN149) devono essere applicati tassativamente per tutte le manipolazioni che portano alla formazione di aerosol o laddove esiste una attenta valutazione del rischio biologico, come nei laboratori identificati per i test COVID-19 (le Aziende debbono farsi carico dell'approvvigionamento degli appositi DPI).**

Il decreto legge del 17 marzo 2020 n 18 recita quanto segue: "Per contenere il diffondersi del virus COVID-19, fino al termine dello stato di emergenza di cui alla delibera del Consiglio dei ministri in data 31 gennaio 2020, sull'intero territorio nazionale, per i lavoratori che nello svolgimento della loro attività sono oggettivamente impossibilitati a mantenere la distanza interpersonale di un metro, sono considerati dispositivi di protezione individuale (DPI), di cui all'articolo 74, comma 1, del decreto legislativo 9 aprile 2008, n.81, le mascherine chirurgiche reperibili in commercio, il cui uso è disciplinato dall'articolo 34, comma 3, del decreto-legge 2 marzo 2020, n. 9".

Altri DPI a disposizione sono il camice monouso idrorepellente e gli occhiali di protezione, di contro i copri scarpe e i copri capo, debbono

### ■ TEST DEL SEQUENZIAMENTO GENICO

Il test del sequenziamento genico è molto importante per capire dalle sequenze, quali quasi-specie virali del COVID-19 stanno circolando, permettendo di fare uno studio epidemiologico, ma soprattutto nell'indirizzare per lo sviluppo di farmaci e vaccini efficaci.

Attualmente dai dati dell'Istituto Nazionale per le Malattie Infettive, "Lazzaro Spallanzani" non emergono mutazioni significative.

### ■ ALTRI SISTEMI DI SUPPORTO

Altri sistemi di supporto alla diagnosi, che si stanno implementando nei vari laboratori, in base alle indicazioni dell'OMS del 19 marzo c.a., si basano sulla valutazione sierologica, ossia la ricerca degli anticorpi nei soggetti negativi al tampone, ma che presentano la sintomatologia da infezione CoVID-19.

Purtroppo è da evidenziare almeno in questa

fase, una commercializzazione selvaggia di vendita dei test rapidi (card) basati sul principio dell'immunocromatografia. per la valutazione qualitativa delle immunoglobuline IgG e IgM.

Alcuni dei suddetti, anche se certificati sono stati testati su una corte di pazienti molto limitata, pertanto la sensibilità e specificità andrebbe valutata su una casistica molto più ampia, affinché si possa evitare di dare risultati poco attendibili.

Di contro più attendibili sono i test di dosaggio quantitativo anticorpale, tramite il principio dell'ELISA e della Chemiluminescenza, che permettono al clinico di valutare la cinetica di risposta, ossia valutare la variazione del titolo nei prelievi successivi.

### ■ ALTRO TEST

Altro test, che alcuni laboratori stanno adottando è il dosaggio delle citochine in particolare dell'IL6, mediatore della risposta massiva infiammatoria, che sicuramente può essere d'aiuto per il clinico.

Resta inteso, che ogni operatore deve procedere sempre nel pieno rispetto delle buone pratiche di laboratorio, esempio ad inizio e fine lavoro pulire le cappe biologiche e gli ambienti di lavoro con i specifici detergenti raccomandati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità: ipoclorito di sodio allo 0,1% che agisce contro l'envelope del virus, etanolo tra il 62-71%, il perossido di idrogeno allo 0,5% e composti fenolici o di ammonio.

### ■ TRATTAMENTO E VACCINI

Sono attualmente in corso studi clinici per valutare l'efficacia di alcuni farmaci nel ridurre la durata della malattia.

Tra le terapie ritenute più promettenti dalla comunità scientifica ci sono:

- il Remdesivir, un farmaco antivirale sperimentale studiato in precedenza, con risultati insoddisfacenti, per il trattamento dell'infezione da virus ebola
- la combinazione Lopinavir/Ritonavir, già in commercio e utilizzata per il trattamento dell'HIV
- la Cloroquina e l'Idrossicloroquina, farmaci usati per il trattamento della malaria e (idrossicloroquina) per l'artrite reumatoide

Questi farmaci sono risultati efficaci nell'inibire la replicazione del **virus SARS-CoV-2** in colture di cellule e nel trattamento di infezioni da **coronavirus** (come quello della MERS) in modelli animali. Uno studio clinico condotto in Cina su pazienti con gravi sintomi di COVID-19 non ha documentato l'efficacia di Lopinavir/Ritonavir, ma altri studi sono in corso.

Recentemente, ai farmaci già elencati, si è aggiunto il **Favipiravir**. Si tratta di un farmaco antivirale approvato in Giappone per l'uso come antinfluenzale e che sembrerebbe essere risultato efficace in due studi condotti in Cina.

L'Agenzia Italiana del Farmaco sta valutando la possibilità di avviare una sperimentazione di questo medicinale in Italia.

Inoltre, la Cina ha autorizzato l'uso del **Tocilizumab**, un anticorpo monoclonale già utilizzato nella terapia dell'artrite reumatoide, per il trattamento dei pazienti che presentano una forma grave di malattia.

In Italia è stato avviato uno studio (TOCIVID19) che ha lo scopo di valutare l'efficacia di questo farmaco in 330 pazienti con polmonite e i primi segni di insufficienza respiratoria o intubati nelle ultime 24 ore.

Al via un protocollo sperimentale per trattare i pazienti affetti da Covid-19 con il plasma iperimmune dei pazienti guariti.

L'utilizzo di una terapia a base di plasma iperimmune è già stato oggetto di sperimentazione in Cina e in passato tale tipo di terapia è stata usata, anche in Italia, per trattare i pazienti affetti dal virus Ebola, nel 2014.

Venti nuovi farmaci e trentacinque vaccini per la lotta al nuovo Coronavirus, sono stati proposti alla valutazione dell'Agenzia europea per i medicinali (EMA) secondo la quale un vaccino si potrebbe avere entro un anno.

Riguardo la persistenza del virus nel contesto ambientale è stata pubblicata una lettera sul *New England Journal of Medicine*, che riporta i dati sulla sopravvivenza su varie superfici del Coronavirus SARS-CoV-2 (l'agente eziologico della COVID-19), al confronto con SARS-CoV-1

(che ha causato la SARS nel 2002). Le condizioni sperimentali comprendono la valutazione della stabilità dei due virus su 5 diversi supporti: aerosol, superficie di rame, plastica, acciaio inox e cartone.

I parametri misurati, nelle diverse condizioni sperimentali, sono il TCID50 (50% Tissue-Culture Infectious Dose, cioè il più piccolo numero di particelle virali in grado di infettare il 50% delle unità inoculate e corrisponde a una dose infettante citopatica) e il tempo di dimezzamento. SARS-CoV-2 si è mantenuto vitale nell'aerosol per tutta la durata dell'esperimento (3 ore) con riduzione dell'infettività simile a quella del SARS-CoV-1.

Il SARS-CoV-2 è risultato più stabile su superfici di plastica e di acciaio inox, e particelle di virus vitale sono state reperite fino a 72 ore dopo l'applicazione su queste superfici, anche se il TCID50 si è ridotto grandemente dopo 72 ore sulla plastica e dopo 48 ore sull'acciaio.

La stabilità di SARS-CoV-1 è stata analoga. Sul rame SARS-CoV-2 è risultato inattivato dopo 4 ore (SARS-CoV-1 dopo 8 ore), mentre sul cartone SARS-CoV-2 è inattivato dopo 24 ore (SARS-CoV-1 dopo 8 ore).

Il tempo di dimezzamento in aerosol di SARS-CoV-2 e di SARS-CoV-1 è stato di 1,1 - 1,2 ore. Il tempo di dimezzamento dei due virus è stato simile anche sul rame. Sul cartone SARS-CoV-2 è stato stabile più a lungo di SARS-CoV-1.

La maggiore sopravvivenza di entrambi i virus si è registrata per l'acciaio inox e la plastica.

Il tempo di dimezzamento di SARS-CoV-2 è stato di 5,6 ore sull'acciaio e 6,8 ore sulla plastica.

Gli autori concludono che la stabilità di SARS-CoV-2, nelle condizioni sperimentali, è simile a quella di SARS-CoV-1.

Questo indica che le differenze nelle caratteristiche epidemiologiche di questi virus derivano probabilmente da altri fattori, tra cui alte cariche virali nel tratto respiratorio superiore e il potenziale per le persone infette da SARS-CoV-2 di liberarsi e trasmettere il virus in fase

asintomatica.

I risultati suggeriscono che **il contagio tramite aerosol e superfici inanimate di SARS-CoV-2 è plausibile**, dato che il virus può rimanere vitale e contagioso negli aerosol per ore e sulle superfici fino a giorni.

Questi risultati (analoghi a quanto riscontrato con SARS-CoV-1, in cui queste forme di trasmissione erano associate con diffusione nosocomiale ed eventi super-diffusivi) forniscono informazioni preziose per le strategie di mitigazione della pandemia.

Questi dati rafforzano il concetto dell'importanza delle superfici che rappresentano un vettore di

## CONCLUSIONI

**C**ome ben descritto dalla letteratura, ritengo che i tamponi debbano essere fatti anche al personale asintomatico e aggiungerei anche a quello ospedaliero, in modo da ridurre l'insorgenza di potenziali focolai.

In aggiunta andrebbero monitorati anche i pazienti guariti, considerato che il virus può essere eliminato anche attraverso le feci, rappresentando un vettore di reintroduzione.

La prevenzione delle zoonosi è alquanto difficile, poiché necessita del cambiamento culturale, uso e tradizioni di alcuni paesi, come lo "ye wei", pertanto l'esperienza dovrebbe insegnarci a formulare preventivamente dei piani di emergenza pandemici dandone anche seguito, **e a costituire la medicina di laboratorio nel territorio. Come considerazione finale vorrei elogiare tutti i Tecnici di Laboratorio Biomedico, che stanno operando in turni pesanti, processando migliaia di tamponi e matrici biologiche per il test del Coronavirus, lavorando in pieno silenzio.**

**Le competenze che abbiamo le stiamo mettendo al servizio della Nazione e dei nostri concittadini, con l'augurio che in futuro non lontano, le Istituzioni oltre a dirci grazie, possano concretizzare nel valorizzare la nostra professione.**

## BIBLIOGRAFIA

- Kristian G. Andersen, Andrew Rambaut, W. Ian Lipkin, Edward C. Holmes & Robert F. Garry. *The proximal origin of SARS-CoV-2. Nature Medicine* (2020).
- *Laboratory bioafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV) Interim guidance 12 February 2020: World Health Organization.*
- *Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human case. Interim guidance 2 March 2020: World Health Organization.*
- Emmie de Wit. et all. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Hamilton, MT. Aerosol and surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. Letter The New England Journal of Medicine. March 17, 2020 DOI: 10.1056/NEJMc2004973.*
- Qiu J. *Covert coronavirus infections could be seeding new outbreaks. Nature. 2020 Mar 20. doi: 10.1038/d41586-020-00822-x.*
- Bassetti A. *I coronavirus: persistenza sulle superfici ambientali e sensibilità ai disinfettanti. IOZ 2020; 19(2).*
- Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E, *Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and its inactivation with biocidal agents, Journal of Hospital Infection, 2020.*
- Tan SS, Yan B, Saw S, Lee CK, Chong AT, Jureen R, Sethi S *Practical laboratory considerations amidst the COVID-19 outbreak: early experience from Singapore. J Clin Pathol. 2020 Mar 20.*