

Scheda informativa SARS-CoV-2 e COVID-19

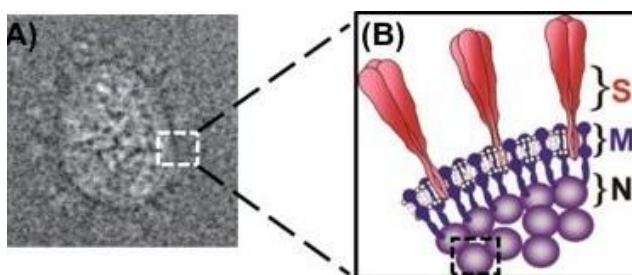
TERMINOLOGIA

SARS-CoV-2: è un acronimo per *SevereAcuteRespiratorySyndrome-CoronaVirus-2* indica il virus che provoca la patologia (2019-nCoV è un sinonimo che si può trovare nelle prime pubblicazioni scientifiche)

COVID-19: è un acronimo per *CO*rona*Virus**Disease* 2019 viene utilizzato per indicare la sindrome patologica associata all'infezione. E' una zoonosi (secondo la definizione dell'ISS: malattie che si trasmettono dagli animali all'uomo)

Pandemia: secondo l'OMS definisce la comparsa di un nuovo agente patogeno che sia in grado di colpire la specie umana e che si diffonda per contagio in tutto il mondo.

STRUTTURA DEL VIRUS



Struttura schematica di SARS-CoV-2

Partendo dallo strato più esterno e procedendo verso l'interno del virus si notano diversi componenti; quelli di interesse più diretto per gli aspetti legati alla diagnostica di laboratorio risultano essere:

Proteina spike (S): estroflessioni di circa 20 nm formate dalla proteina S (*spike*, punta, spuntone). Tre glicoproteine S compongono un trimero; i trimeri nel loro insieme formano strutture, somiglianti ad una corona (da cui il termine Coronavirus), che circondano il virione. Le differenze tra il nuovo virus ed il virus della SARS sembrano localizzate proprio in questa proteina *spike* che è quella che determina la specificità del virus verso le cellule epiteliali del tratto respiratorio rendendolo in grado di legare il recettore ACE2 espresso dalle cellule dei capillari dei polmoni e di altri organi

Proteina N: la proteina SARS-CoV N è una fosfoproteina di 422 aminoacidi con PM di 46 kDa con circa il 20-30% di identità sequenziale con le proteine N di altri coronavirus. Forma dimeri che costituiscono la struttura di base del **nucleocapside** tramite la parte C-terminale. Racchiude il genoma virale in un ribonucleocapside elicoidale (RNP) e gioca un ruolo fondamentale nei processi di auto-assemblamento virale.

RNA virale: costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva, di grande taglia (da 27 a 32 kb nei diversi coronavirus). Dà origine a 7 proteine virali ed è associata alla proteina N che ne aumenta la stabilità

Altre componenti strutturali sono la **Proteina M:** proteina di membrana, attraversa il rivestimento (*envelope*: è il rivestimento del virus, costituito da una membrana che il virus "eredita" dalla cellula ospite dopo averla infettata) interagendo all'interno del virione con il complesso RNA-proteina e la **Proteina E:** l'espressione di questa proteina aiuta la glicoproteina S (e quindi il virus) ad attaccarsi alla membrana della cellula bersaglio.

L'RNA genomico a polarità positiva viene inizialmente tradotto per produrre la polimerasi virale necessaria per la formazione dell'RNA a polarità negativa, utilizzato a sua volta come stampo per ogni singolo mRNA monocistronico. Le singole proteine virali e l'RNA genomico vengono successivamente assemblati nell'apparato del Golgi, quindi le particelle vengono trasportate alla superficie della cellula e rilasciate nell'ambiente extracellulare.

TASSONOMIA

Il coronavirus SARS-CoV-2 è un RNAvirus, i coronavirus possono essere classificati in 4 generi (α , β , γ e δ) e vengono rilevati in una vasta gamma di specie animali, inclusi gli esseri umani. Gli alfa-coronavirus umani e i beta-coronavirus sono virus respiratori comuni che di solito causano lievi malattie delle vie respiratorie superiori, fanno eccezione altri due beta-coronavirus, **SARS** (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) e **MERS** (*Middle East Respiratory Syndrome*), che sono altamente patogeni nell'uomo. Sono entrambe zoonosi con un tasso di mortalità del 10 % e del 35% rispettivamente; il passaggio dall'animale all'uomo avviene per la MERS dal pipistrello con ospite intermedio il dromedario e per la SARS dal pipistrello con ospite intermedio lo zibetto; si sottolinea che tra gli animali selvatici è stato identificato un gran numero di coronavirus nei pipistrelli.

EVOLUZIONE TEMPORALE E CONTENIMENTO DELLA DIFFUSIONE

Nel dicembre 2019, è stato individuato un gruppo di pazienti affetti da polmonite atipica tutti associati ad un luogo, un *mercato all'ingrosso* di Wuhan in Cina dove esiste il commercio di animali selvatici vivi. In alcuni di questi pazienti è stato identificato un nuovo genere di coronavirus chiamato 2019-nCoV evidenziando che qui era avvenuto il cosiddetto “*spill-over*” (passaggio da una specie animale ad alta prevalenza ad un'altra specie “vergine”, in questo caso l'uomo). Successivamente pazienti positivi al virus e con una storia di viaggi recenti a Wuhan sono stati identificati in altre regioni della Cina ed in altri paesi (molti di questi non avevano avuto nessun passaggio al *mercato all'ingrosso* confermando così il contagio da uomo a uomo). Da quel momento in poi il virus ha iniziato a diffondersi in tutto il mondo trasformando l'epidemia iniziale (con focolaio a Wuhan) in pandemia.

Quando è in atto una pandemia virale e non si hanno né un vaccino né un farmaco l'unica difesa è la **quarantena** (rimedio antico). Il contenimento della diffusione passa anche attraverso l'utilizzo delle indagini di laboratorio, nel particolare se si riesce ad identificare chi deve essere sottoposto a quarantena si riesce a diluire nel tempo il numero di contagi (e di conseguenza il numero di ospedalizzati ed il numero di pazienti da ricoverare in terapia intensiva) ed ancora, se siamo in grado di diagnosticare lo stato sierologico (soggetto immunizzato o non immunizzato) degli operatori sanitari possiamo ottimizzare le risorse umane, e se applicato alla popolazione si riesce a gestire in modo ottimale l'uscita dalle fasi di isolamento (*lock down*).

LA SITUAZIONE NELLA REALTA' ITALIANA

La pandemia da Coronavirus SARS-CoV-2 ha indubbiamente determinato, in Italia e nel resto del mondo, una situazione difficilmente immaginabile in termini di problematiche legate non solo alle strutture sanitarie (non preparate e predisposte per sostenerla) ma coinvolgendo in modo importante le normali attività economiche e di relazione sociale.

IL RUOLO DEL LABORATORIO

Rimanendo all'ambito sanitario, con il passare delle settimane, oltre all'aspetto assolutamente prioritario della disponibilità di terapie intensive, il laboratorio ha assunto un ruolo fondamentale nella ricerca e nella diagnostica delle diverse implicazioni e complicazioni cliniche legate alla sindrome da SARS-CoV-2 (COVID-19). Il laboratorio, infatti, si è rivelato essenziale per la diagnosi (fondamentale per i pazienti, data la spesso rapidissima evoluzione delle problematiche cliniche, ma anche per la doverosa tutela del personale sanitario direttamente a contatto con i pazienti affetti), la diagnosi differenziale con altre patologie respiratorie, la valutazione del decorso e delle diverse fasi della malattia e dei comportamenti da attuare dopo il superamento della fase critica.

Come per altre diagnostiche, anche se meno complesse, legate alle patologie virali l'attività del laboratorio si orienta secondo due direttrici: la identificazione dell'agente infettante (**diagnosi diretta**, basata su indagini di biologia molecolare) e la verifica dello svilupparsi (per modi e tempi) della reazione dell'organismo alla presenza dello stesso agente infettante (**diagnosi indiretta**, basata su indagini di tipo sierologico)

LA DIAGNOSTICA VIROLOGICA

La **diagnosi diretta** è eseguibile attraverso la rilevazione molecolare dell'agente patogeno (nel caso specifico attraverso tamponi naso-faringei) tramite la metodica (rt)RT-PCR (*real time - Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) per SARS-CoV-2 RNA (tale è attualmente il *gold-standard*). Gli organismi istituzionali in ambito nazionale (Ministero della Salute e Istituto Superiore di Sanità) ed internazionale (WHO, ECDC, CDC) forniscono indicazioni e protocolli relativamente agli elementi caratterizzanti la diagnostica molecolare (tempistiche e modalità di campionatura, *primer*, *probe*, materiali, reagenti e metodi utilizzabili).

Una delle problematiche emerse in questa fase di emergenza, oltre alla necessità di competenze specifiche (presenti e/o da acquisire rapidamente) da parte dei laboratori coinvolti nel percorso diagnostico, è derivata dalla complessità tecnica di esecuzione su strumenti dedicati, a produttività non elevata e con TAT spesso poco compatibile con la necessità clinica di gestione dei pazienti affetti e del relativo personale addetto.

A questi aspetti (oltre a quelli connessi alla criticità della fase preanalitica e di campionamento) si sono sommati aspetti tipicamente analitici e di valutazione dei risultati: tipo di estrazione e trattamento del campione, scelta di idonee metodiche in funzione delle tipologie di *primer* impiegati, presenza di risultati Falsi Negativi e/o Falsi Positivi rispetto alle altre componenti della diagnostica (*imaging*, riscontro clinico)

Per ovviare ai TAT non ottimali del sistema molecolare di riferimento per le esigenze dell'emergenza, svariati produttori di diagnostici hanno sviluppato e messo in commercio soluzioni che puntano ad ottimizzare alcune fasi della PCR ottenendo tempi più rapidi di risposta pur mantenendo gli stessi principi tecnici (PCR) e cercando di mantenere le stesse prestazioni di qualità. Ulteriore alternativa è la disponibilità sul mercato di sistemi POCT (*Rapid Diagnostic Test-RDT*) che ricercano l'Ag basandosi su principi tecnici diversi (immunocromatografia) ma che spesso sono caratterizzate da prestazioni analitiche non ottimali, soprattutto in termini di accuratezza.

LA DIAGNOSTICA SIEROLOGICA

Come accennato, il secondo aspetto della diagnostica di laboratorio va ad indagare la finestra temporale successiva alla fase di infezione primaria (sia essa con sintomi clinici evidenti o con scarsità o addirittura assenza delle sintomatologie cliniche caratterizzanti l'affezione). Parliamo della cosiddetta **diagnosi indiretta o sierologica** basata sulla ricerca nel plasma o siero degli anticorpi anti SARS-CoV-2 (di tipo IgM, IgA e IgG) prodotti dal sistema immune dell'organismo in risposta all'ingresso dell'agente infettante e, nello specifico caso di SARS-CoV-2, rivolti verso proteine specifiche del nucleocapside o degli antigeni *spike* (S1 ed S2) virali. Queste ultime sono le proteine utilizzate dal virus per legarsi a specifici recettori (al momento identificati nel recettore ACE-2 presente in diversi tessuti del nostro organismo) consentendo al virus l'ingresso nelle cellule e la replica del proprio RNA con le conseguenti manifestazioni cliniche e diffusione della viremia e conferendo, pur senza disponibilità attuale di prove conclamate, a questa specifica tipologia di anticorpi un potenziale potere neutralizzante nei confronti del virus.

Questo aspetto non appare trascurabile sia rispetto al loro ruolo protettivo, sia relativamente alle frenetiche ricerche in atto per la messa a punto di un vaccino specifico e, speriamo, efficace. Ad oggi non sono del tutto chiariti e noti le entità ed i tempi della risposta anticorpale che può essere del tutto individuale nei diversi soggetti venuti a contatto con il virus.

Si può ipotizzare che i livelli di sintesi anticorpale risultino adeguati dopo 10 - 15 giorni dalla esposizione all'agente virale, sia in presenza che in assenza delle sintomatologie caratterizzanti. Come, per ovvii motivi di intervallo temporale rispetto alla comparsa del virus nella specie umana, non siamo in grado di conoscere chiaramente la permanenza in circolo delle IgG e, soprattutto, il grado e la durata della protezione fornita all'organismo rispetto a ipotetiche potenziali reinfezioni.

IL RUOLO DEI PROFESSIONISTI DI LABORATORIO

Aspetto prioritario, e rispetto al quale, la professionalità degli operatori di laboratorio assume un ruolo fondamentale è la valutazione e/o convalida delle prestazioni analitiche delle metodiche utilizzate per le ricerche anticorpali.

Attualmente più produttori di diagnostici (soprattutto quelli con pregresse esperienze e competenze nel campo delle diagnostiche immunochimiche) hanno sviluppato, a volte con rapidità ritenute impensabili in tempi normali, metodi immunometrici adattabili a strumentazioni già presenti in molti laboratori che utilizzano queste tecnologie. Si sono quindi rese disponibili metodiche con traccianti enzimatici (ELISA in micropiastra) e chemiluminescenti (su strumenti in automazione totale) spesso in grado di fornire una valutazione non solo di presenza / assenza delle diverse classi di immunoglobuline ma di fornirne una quantificazione, pur in assenza di standardizzazioni di riferimento, tarandosi contro calibrazioni basate su preparazioni proprie.

I metodi quantitativi (ELISA, CLIA) presentano, in genere, un'elevata affidabilità (accuratezza e precisione; sensibilità e specificità >90%) e la possibilità di quantificare la siero conversione (elemento importante per le valutazioni cliniche ed epidemiologiche) e per la loro adattabilità a soluzioni in automazione totale già ben rappresentate nelle attuali dotazioni dei laboratori. Anche la produttività delle soluzioni strumentali appare in linea con le abituali prestazioni dei laboratori per queste tipologie di diagnostica.

Chiaramente se l'approccio si sposta su indagini di popolazione (e in questa direzione alcune ipotesi di lavoro si stanno orientando, soprattutto con approcci riservati a comunità locali o a strutture produttive) la attuale organizzazione della rete di laboratori presenti sul territorio nazionale non appare in grado di far fronte, in tempi rapidi, alla mole di lavoro conseguente. Anche in questo caso i produttori di diagnostici (consolidati o a volte

improvvisati) si stanno orientando su soluzioni impieganti tecnologie basate sulla immunocromatografia (le cosiddette “card”) per altro ben note ed utilizzate anche nei laboratori per altre soluzioni analitiche. Il vantaggio indubbio è la comodità / praticità di utilizzo; conseguentemente la disponibilità di test di questo genere è in continuo aumento: basta considerare il numero di risposte pervenute alla protezione civile (oltre 70 proposte analitiche diverse) a fronte della richiesta di fornitura per un protocollo di valutazione epidemiologica preliminare su un campione di popolazione nelle diverse regioni italiane. Il rovescio della medaglia di queste soluzioni “facili” evidenzia la impossibilità di avere solide documentazioni di qualità e di efficacia clinica dei risultati ottenibili con queste metodologie: al momento sembra ragionevole sostenere che questi test RDT abbiano prestazioni, a volte anche considerevolmente, inferiori ai test tradizionali di laboratorio sia in termini di sensibilità che di specificità. La possibilità di facile disponibilità e diffusione di questi approcci, soprattutto in mani non qualificate e controllabili, potrebbe generare false negatività e/o positività nella popolazione indagata inducendo a comportamenti incauti e suscettibili di ulteriori successive diffusioni del virus stesso. Anche, e soprattutto, relativamente a questi aspetti le competenze di laboratorio devono emergere (pur in un contesto di corretto confronto tecnico) nel suggerire e guidare le scelte che dovranno essere assunte dalle strutture istituzionali.

ELAS Italia
Milano, maggio 2020