

## DIAGNOSTICA DI LABORATORIO DELLA SINDROME RESPIRATORIA ACUTA (SARS)

Documento del Sottogruppo: Cassone A. (Coordinatore), Ansaldo F., Capobianchi M., Corbellino M. e Zanetti A.

### 1. Introduzione

Questo documento si propone di orientare le attività e gli interventi di sanità pubblica nel settore della diagnostica di laboratorio di una nuova sindrome respiratoria acuta, a carattere epidemico, detta SARS. Esso è stato elaborato da un apposito gruppo nell'ambito e per incarico della task-force istituita dal Ministro della Salute per il "Controllo della SARS e delle emergenze infettivologiche. (parte dei protocolli tecnici allegati è stata elaborata dalla Dott.ssa Maria Rapicetta e dalla Dott.ssa Fabiana Superti dell'ISS). Il documento contiene indicazioni diagnostiche e specifici protocolli con l'intesa che dette indicazioni ed i relativi protocolli devono essere periodicamente aggiornati per adeguarli alle nuove conoscenze che si rendono disponibili, in accordo con la letteratura scientifica internazionale e le indicazioni di organismi di riferimento internazionali quali il PHLS, il CDC e l'OMS.

### 2. Generalità ed approccio alla diagnostica della SARS

La SARS è una nuova sindrome respiratoria acuta, finora definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità esclusivamente su base clinica ed epidemiologica, come una " *malattia acuta febbrile con sintomatologia respiratoria, non attribuibile ad alcun agente eziologico noto e sviluppata in soggetti con riconosciuta esposizione a pazienti con sospetta o probabile SARS od a secrezioni respiratorie od altri materiali biologici di tali pazienti*". Questa definizione di caso viene continuamente aggiornata per l'acquisizione di nuove conoscenze.

Da pazienti con SARS è stato isolato un nuovo membro della famiglia dei *Coronavirus*, denominato SARS-CoV, che viene correntemente ritenuto l'agente od uno degli agenti eziologici della SARS.

Tuttavia, fin quando non sarà definitivamente chiarita l'eziologia della SARS e soprattutto non saranno sviluppati, standardizzati ed adeguatamente saggiati per la loro efficienza diagnostica reagenti e metodi specifici virologici e sierologici, la diagnosi di SARS resta su base clinica ed epidemiologica, ed i metodi di laboratorio tendenti a dimostrare la presenza di SARS-CoV o dei prodotti specifici della risposta immune antivirale (in particolare, gli anticorpi) devono essere intesi esclusivamente come supporto alla diagnosi clinica.

Si ribadisce, pertanto, che l'approccio alla diagnostica di laboratorio della SARS deve primariamente includere esami microbiologici per la ricerca di tutti i comuni agenti di infezione del basso tratto respiratorio, attraverso emocolture, esami batterioscopici e colturali dell'espettorato, dell'aspirato nasofaringeo o tracheale e di ogni

altro materiale biologico indicato dal quadro clinico. Devono essere eseguite le ricerche per antigeni di Legionella e Pneumococco nelle urine e le ricerche per i comuni virus respiratori, in particolare i virus influenzali A e B, e virus respiratorio sinciziale. Una coppia di siero acuto e convalescente deve essere sempre esaminata, ed aliquote dei campioni biologici conservate per ogni ulteriore esame.

Nel complesso, allo stato attuale delle conoscenze, non ci sono criteri ufficiali per accettare o rifiutare la diagnosi di SARS sulla base esclusiva dei risultati di laboratorio. La positività di alcuni tests di laboratorio (vedi in seguito) permette tuttavia di classificare come “probabile” un caso inizialmente definito come “sospetto” su base clinico-epidemiologica.

### 3. Saggi disponibili per la diagnosi di laboratorio della SARS.

**Con l'assunto che la SARS sia causata da SARS-CoV, e con la premessa di cui sopra circa l'assenza di procedure diagnostiche standardizzate e validate per questo nuovo virus, i saggi diagnostici ad oggi disponibili, che ricercano il virus o i rispettivi anticorpi, sono i seguenti:**

- Saggi molecolari
- Isolamento virale in coltura di cellule
- Microscopia elettronica
- Saggi sierologici

#### 3.1 Saggi molecolari

Come per tutti gli altri *Coronavirus*, il genoma di SARS-CoV è costituito da una molecola di RNA monocatenario a polarità positiva e di lunghezza attorno ai 30kb. I saggi molecolari mirano a dimostrare la presenza nel campione biologico di sequenze specifiche del virus attraverso reazioni polimerasiche a catena (PCR) sul retroscritto di DNA. La PCR è condotta secondo vari formati (semplice, nested e real-time) e con l'utilizzazione di coppie di primers che sono pubblicamente disponibili. Il prodotto dell'amplificazione può essere caratterizzato attraverso il sequenziamento. Esistono kits commerciali che contengono primers e controlli positivo e negativo. L'interpretazione di questi saggi riveste una particolare importanza sia perché sono in genere i primi ad essere impiegati nella diagnosi sia perché sono fondamentali per la conferma dell'isolato virale.

**Commento:** Nessuno di questi kits è stato finora validato. Né per i kits commerciali né ovviamente per i test PCR fatti in casa si conosce sensibilità, specificità e valori predittivi negativo e positivo (efficienza diagnostica). In particolare, un test PCR positivo può essere accettato solo da laboratori che hanno procedure per controlli di qualità interna che evitino contaminazioni e falsi positivi. Quanto ad un test PCR negativo, questo non esclude che il soggetto sia affetto da SARS. Infatti, la PCR per SARS-CoV può essere negativa per bassa

sensibilità del metodo impiegato o perché il campione esaminato non era idoneo per i tempi e le modalità con cui era stato raccolto. Si raccomanda pertanto:

- che i laboratori che eseguono PCR per SARS-CoV adottino precise procedure di controlli di qualità
- che ogni PCR includa appropriati controlli positivi e negativi per ogni stadio della procedura
- che ogni PCR includa un controllo per la presenza di sostanze inibitrici
- si raccomanda inoltre che, laddove fattibile, una PCR positiva sia confermata da una seconda PCR ripetuta da un altro laboratorio anche attraverso l'amplificazione di un diverso segmento del genoma virale. La Tabella 1 offre alcune indicazioni suggerite dai Laboratori del network europeo/OMS per l'interpretazione dei saggi PCR.

*Stante la particolare criticità di quest'esame per i paesi, come l'Italia, con bassa prevalenza di SARS, l'Organizzazione Mondiale della Sanità raccomanda la designazione di Laboratori di riferimento che partecipino a programmi di standardizzazione dei reagenti diagnostici prodotti e che possano confermare, se richiesto, i risultati del primo esame.*

### **3.2. Isolamento virale in colture cellulari**

La presenza di SARS-CoV in campioni biologici può essere dimostrata attraverso comuni procedure di isolamento del virus in colture cellulari. Sebbene i *Coronavirus* crescano con difficoltà nelle comuni linee cellulari, il SARS-CoV cresce e replica con relativa facilità in varie linee cellulari, in particolare in quelle derivate da epitelio renale di scimmia (ad es., le cellule Vero). Il virus dà effetto citopatico e viene identificato con saggi molecolari o sierologici.

**Commento:** Un risultato positivo indica la presenza di SARS-CoV mentre un risultato negativo non esclude la SARS (vedi anche il commento ai saggi molecolari e la Tabella 1). E' obbligatoria la conferma dell'isolamento virale con una PCR di controllo.

### **3.3. Microscopia elettronica**

Il SARS-CoV può essere messo in evidenza in microscopia elettronica sia attraverso contrasto negativo di materiale solubile (sovrantante, estratti o liquidi biologici) che in sezioni ultrasottili di pellets cellulari.

**Commento:** La sensibilità del metodo è piuttosto bassa (di solito, è necessario più di un milione di particelle virali per millilitro) ed è pertanto richiesta una procedura di concentrazione. Non ci sono al momento tecniche validate per l'immunoelectronmicroscopia di SARS-CoV.

### 3.4. Saggi sierologici

Questi saggi rilevano anticorpi specifici prodotti in seguito all'infezione con SARS-CoV. Come per altre infezioni acute, tali anticorpi non sono rilevabili con le metodologie correnti se non dopo parecchi giorni dall'infezione (prima IgM e poi IgG). Le IgG sono presenti nel siero convalescente da due a 3 settimane dall'esordio della malattia mentre le IgM sono presenti e particolarmente rilevabili in immunofluorescenza a partire da 7-10 giorni. Non ci sono ancora saggi sierologici standardizzati o commerciali. Gli anticorpi vengono solitamente ricercati attraverso saggi immunoenzimatici (ELISA) od attraverso reazioni di Immunofluorescenza od anche con la tecnica dell'immunoperossidasi, e con l'impiego di virus inattivato come antigene.

**Commento:** Non ci sono definizioni correnti di saggio sierologico positivo o negativo, né limiti di rilevamento degli anticorpi, né metodologie validate in grado di definire le cross-reattività. Comunque, una sieroconversione o l'incremento di 4 volte nel titolo anticorpale dal siero acuto a quello convalescente può essere preso a criterio di supporto per la diagnosi clinica di infezione recente. La specificità del saggio dovrebbe tuttavia essere garantita dal fatto che anticorpi specifici contro il SARS-CoV non dovrebbero essere presenti nella popolazione generale.

## 4. Materiali biologici

I materiali biologici per la ricerca di SARS-CoV sono i più svariati perché il virus può essere rinvenuto sia nelle secrezioni respiratorie che nel fluido pleurico, nel sangue, nelle urine e nelle feci, oltre che in vari tessuti biologici ed autoptici. Un set minimo di campioni da sottoporre ad esame virologico deve essere costituito da campioni sequenziali di secrezioni delle vie respiratorie, in particolare aspirato o tamponi nasofaringei, ed una coppia di sieri acuto-convalescenti. L'efficienza diagnostica può essere grandemente migliorata se sono anche raccolti campioni di lavaggio broncoalveolare (se c'è l'indicazione clinica), liquido congiuntivale, urina, feci e materiali biotici. Ai fini di una diagnosi tempestiva, i campioni di particolare utilità per la ricerca del virus sono quelli delle secrezioni e degli aspirati nasofaringei ed orofaringei nonché quelli urinari. La Tabella 2 allegata ai protocolli riassume i tipi di campione da esaminare, le relative specifiche ed i tempi più adeguati per la ricerca del virus nei vari materiali, secondo l'attuale stadio delle conoscenze al riguardo. In tale contesto, si segnala l'opportunità che si costituisca una *banca biologica* per la SARS, dove siano conservati e resi disponibili materiali biologici (clinici e di laboratorio) per ricerche sulla diagnostica della SARS e sulla standardizzazione dei relativi test. Tale banca può essere sia *materiale* che *virtuale*, sita cioè presso centri di riferimento che adottino procedure codificate per la conservazione e l'accesso.

## 5. Biosicurezza

In assenza di conoscenze certe circa tutte le modalità di trasmissione e di infettività dell'agente virale della SARS è necessario che il laboratorista assuma tutte le necessarie precauzioni nel lavorare con i campioni biologici in cui possa essere presente il SARS-CoV<sup>1</sup>. In generale, non dovrebbe essere possibile processare detti campioni in laboratori di livello inferiore al BSL-2 e non dotati di cappe bio-hazard di classe seconda certificata e sottoposta a regolare manutenzione. Ogni procedimento in grado di generare aerosol a partire da campioni biologici (ad es. centrifugazione od apertura di cestelli di centrifuga quando si usino centrifughe con cestelli a chiusura ermetica) deve essere svolto sotto cappa, adoperando tubi da centrifuga con tappo a vite ed il laboratorista indossare almeno una maschera chirurgica oltre a guanti e paraocchi. Non è necessario lavorare sotto cappa bio-hazard quando si ha a che fare con materiale inattivato, come, ad esempio, per i saggi molecolari su estratti di RNA virale o per l'esame al microscopio ottico su campioni fissati, o per esame electron-microscopico. Per le colture cellulari per la propagazione del virus od anche per la sua iniziale caratterizzazione utilizzando sopranatanti ed estratti cellulari, oppure il tripsinizzato cellulare per la preparazione dei vetrini in immunofluorescenza, e comunque per tutte le operazioni che possano generare aerosol è richiesta una cappa bio-hazard posta in un ambiente BSL-3 (P3)<sup>2</sup>.

## 6. Spedizione dei materiali

Un campione diagnostico potenzialmente contenente SARS-CoV deve essere spedito rispettando tutte le norme internazionali per la sicurezza delle persone e dell'ambiente codificate per il trasporto di materiale altamente infettante.<sup>3</sup> Il campione biologico, mai più di 500 ml o grammi, deve essere contenuto in contenitore a tenuta con tappo a vite parafilmato o con adesivo. Questo deve essere inserito in secondo recipiente a tenuta, tipo flacone di plastica sigillato, e fra il primo ed il secondo recipiente ci deve essere materiale assorbente in quantità tale da poter assorbire tutto il materiale biologico in caso di rottura o perdita nel primo contenitore. Infine, l'intera confezione va inserita in un ultimo contenitore esterno, preferibilmente di polistirolo, sufficientemente capace da poter anche contenere ghiaccio o ghiaccio secco. I primi due contenitori devono riportare la dicitura della natura del campione, mentre sull'involucro esterno deve essere apposto il marchio Bio-Hazard, oltre all'indirizzo e la lettera di invio. Si ricorda che la responsabilità legale del trasporto in sicurezza è di chi invia il campione, non dello spedizioniere, e tale responsabilità finisce solo al momento della consegna.

<sup>2</sup> Per queste procedure si faccia riferimento al manuale sulla biosicurezza dell'OMS ed a quanto pubblicato dai CDC (Atlanta, USA) entrambi consultabili sui siti di cui alle referenze bibliografiche. Tali precauzioni includono ovviamente l'uso degli opportuni dispositivi di protezione individuale.

<sup>3</sup> L'OMS indica come opportune le modalità di invio dei campioni DIAGNOSTICI secondo le modalità IATA UN 3373 "Diagnostic Specimens", distinguendo dall'invio di isolati virali infettanti provenienti da colture cellulari, per i quali è richiesta la modalità UN 2814, "Infectious substance, affecting humans (Severe Acute Respiratory Syndrome virus)". La modalità UN 3373 prevede che l'imballaggio secondario sia a tenuta, ma vanno bene le bustine impermeabili con zip che si usano per inviare solitamente campioni al laboratorio, invece per la modalità UN 2814 "Infectious substance, affecting humans (Severe Acute Respiratory Syndrome virus)" serve che l'imballaggio secondario sia rigido, oltre che a tenuta. Ovviamente la modalità UN 2814 va bene anche per i campioni diagnostici, essendo più restrittiva, ma non è obbligatoria.

**Riferimenti bibliografici e siti di consultazione**

- J. S. M. Peiris, S. T. Lai, L. L. M. Poon, *et al.* *Coronavirus* as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *The Lancet*, 2003, **361**:1319-1325.

- C. Drosten, S. Günther, W. Preiser, *et al.* Identification of a novel *Coronavirus* in patients with severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 2003

- T. G. Ksiazek, D. Erdman, C. S. Goldsmith, *et al.* A novel *Coronavirus* associated with severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 2003, **348**: 1947-1955.

- <http://www.who.int>

- <http://www.cdc.gov>

- <http://www.phls.co.uk>

## 7. Appendice: Protocolli tecnici

In questa appendice sono dettagliati alcuni protocolli inerenti ai metodi di diagnosi di laboratorio della SARS. Valgono per essi tutte le considerazioni già fatte per le procedure diagnostiche, in particolare l'avvertenza che devono essere considerati provvisori e certamente modificabili man mano che le attività e le ricerche dei laboratori interessati alla SARS offriranno aggiornamenti e revisioni di quanto già noto o di comune prassi laboratoristica nella diagnosi virologica. **Detti protocolli sono suggeriti solo a scopo esemplificativo e non escludono la possibilità che i laboratori usino protocolli diversi purché validati internamente da un opportuno controllo di qualità.**

Osservazioni in microscopia elettronica

Contrasto negativo

*Sorgente: campioni fecali*

A) Tipo di campioni necessari e processo a cui sottoporli

I campioni fecali devono essere raccolti, utilizzando contenitori sterili. Una volta prelevati, se non è possibile processarli subito, i campioni devono essere conservati 4°C.

B) Modalità di trasporto dei campioni

Poiché temperature superiori a +4°C, congelamento e scongelamento, possono danneggiare la struttura delle particelle virali, è necessario che per il trasporto sia mantenuta una temperatura sufficientemente bassa. I campioni devono essere quindi trasportati in scatole di polistirolo o comunque termoisolanti contenenti ghiaccio o "siberini".

C) Fissazione e concentrazione dei campioni

La quantità minima di campione per lo studio è di 2 ml per le feci acquose e di 2 grammi per le feci formate.

Per l'esame al microscopio elettronico a trasmissione le feci liquide non vengono diluite mentre le feci formate vengono risospese al 20% in soluzione fisiologica. I campioni vengono fissati con glutaraldeide al 2.5% (Soluzione madre di glutaraldeide 25% diluita direttamente 1:10 nel campione).

I campioni vengono quindi chiarificati tramite centrifugazione a 7.000 r.p.m. per 10' o a 3.000 r.p.m. per 30' e si prelevano i sopranatanti.

Se si vuole ottenere un campione più concentrato i sopranatanti possono essere ultracentrifugati a 100.000 x g per 90 min. e i pellet risospesi in circa 50 µl di tampone fosfato.

**Sorgente: sopranatante di colture cellulari infettate sperimentalmente e con evidente effetto citopatico (lisato cellulare)**

I sopranatanti vengono fissati con glutaraldeide al 2.5% (Soluzione madre di glutaraldeide 25% diluita direttamente 1:10 nel campione).

I campioni vengono quindi chiarificati tramite centrifugazione a 7.000 r.p.m. per 10' o a 3.000 r.p.m. per 30' e si prelevano i sopranatanti.

Se si vuole ottenere un campione più concentrato i sopranatanti possono essere ultracentrifugati a 100.000 x g per 90 min. e i pellet risospesi in circa 50 µl di tampone fosfato.

Sezioni ultrasottili

**Sorgente: pellet di colture cellulari infettate sperimentalmente o tessuti bioptici-autoptici**

Le cellule, lavate in PBS, vengono fissati con glutaraldeide al 2.5% e incluse in resina epossidica secondo le metodiche classiche. Le stesse procedure di fissazione ed inclusione in resine epossidiche o idrosolubili per immunocitochimica si applicano per i pezzi bioptici od autoptici.

## **Colture Cellulari**

### ***Introduzione***

Sebbene in generale i *Coronavirus* crescano con difficoltà nelle linee cellulari, SARS-CoV ha mostrato una notevole capacità di crescere e replicarsi in varie linee cellulari fra le quali la linea Vero E6. Oltre questa, è opportuno comunque utilizzare per l'isolamento virale dai campioni clinici un ampio pannello di linee cellulari, comprendente fibroblasti umani diploidi, e linee continue come MDCK, Hela ed Hep2 ed LLC-MK2 per aumentare la probabilità di isolamento virale (vedi, in proposito, il paragrafo 2).

### ***Biosicurezza***

**Tutte le manipolazioni devono essere effettuate sotto cappa a flusso laminare in un ambiente con livello di sicurezza P3.**

**Materiali richiesti**

- Terreno Minimum Essential Medium con sali di Earle (EMEM)
- Antibiotici (100X) (10,000 units/ml penicillina G, 10,000 µg/ml solfato di streptomicina in soluzione fisiologica)
- Siero fetale bovino
- Fiasche per coltura di tessuto da 25 cm<sup>2</sup>
- Soluzione salina fosfata (PBS) o soluzione salina di Hank's
- Incubatore a CO<sub>2</sub>
- Microscopio invertito

**Campioni biologici**

- Siero
- Sangue
- Tampone faringeo
- Aspirato naso-faringeo
- Tampone naso-faringeo od oro-faringeo
- Materiale autoptico
- Feci
- Liquido congiuntivale

**Preparazione dei campioni**

I campioni possono essere inoculati come tali (siero, sangue), o dopo l'aggiunta di antibiotici (aspirato faringeo). I tamponi faringei e nasali devono essere risospesi in soluzione salina addizionata di antibiotici. Il materiale autoptico deve essere omogeneizzato e risospeso in soluzione salina.

Le feci vanno rispese in soluzione fisiologica e centrifugate (in caso di feci diarroiche, si può centrifugare direttamente). Il sopranatante deve essere filtrato con filtri da 0.45 microns, addizionato di antibiotici ed inoculato.

**Inoculo delle colture cellulari**

- Utilizzare colture cellulari al 75-85% di confluenza
- Decantare il terreno e inoculare il campione in un volume di 1-1,5 ml per le fiaschette, e di 0.1-0.2 ml per i tubi ;diluire il campione con soluzione salina se necessario
- Incubare 1 ora a 37°C
- Per le colture in fiaschette, aggiungere 8-10 ml di EMEM con il 2% di siero fetale bovino (inattivato a 56°C per 30') mentre per le colture in tubi è sufficiente un volume di 2 ml.
- Osservare la coltura giornalmente.
- Sostituire il terreno dopo 7 giorni<sup>4</sup>
- Mantenere le cellule in osservazione per 14 giorni

L'effetto citopatico del *Coronavirus* associato alla SARS è focale, con cellule rotondeggianti e successivo distacco cellulare. La comparsa di tale effetto è stata osservata in quinta giornata. L'effetto si diffonde a tutta la coltura in 24-48 ore. Successivi passaggi del supernatante in nuove colture cellulari ha

---

<sup>4</sup>Il sopranatante raccolto a 7 giorni viene utilizzato per infettare una nuova coltura (passaggio cieco) ed anche questa viene osservata giornalmente per l'eventuale effetto citopatico. Se entro 14 giorni non si osserva alcuna alterazione del tappeto cellulare, la coltura viene considerata negativa ed eliminata

portato alla comparsa dell'effetto citopatico tra la seconda e la quarta giornata, con rapida diffusione a tutto il tappeto cellulare.

Il supernatante delle colture cellulari, o le cellule infette saranno poi trattate per estrarre l'RNA che sarà utilizzato in RT-PCR per l'identificazione (vedi saggi molecolari e Tabella 1)<sup>5</sup>

## **Immunofluorescenza**

### ***Materiali richiesti***

- Colture cellulari infettate con il SARS-CoV
- Colture cellulari non infette
- Soluzione salina fosfata (PBS)
- Vetrini ricoperti di Teflon a 8 o 12 pozzetti
- Acetone
- Incubatore
- Microscopio a fluorescenza

### ***Biosicurezza***

**Tutte le manipolazioni devono essere effettuate sotto cappa a flusso laminare in un ambiente con livello di sicurezza P3, a meno che non sia possibile irradiare le cellule infette e i campioni di siero (60Co a 2x10<sup>6</sup> rad). Dopo la fissazione in acetone, i vetrini possono essere manipolati come materiale non infettante e la stessa cosa è valida per un siero scomplementato.**

### ***Preparazione dei vetrini***

- Alla comparsa dell'effetto citopatico staccare le cellule infette mediante tripsinizzazione o con puliziotto e mescolarle con cellule non infette.
- Applicare 15 µl di cellule ad ogni pozzetto e lasciare asciugare all'aria
- Fissare i vetrini per 10' in acetone freddo
- Conservare i vetrini fissati a -70°C

### ***Esecuzione del saggio***

- Lasciar scongelare i vetrini ed eseguire 3 lavaggi con PBS
- Diluire i campioni di siero 1:25 in PBS. Eseguire altre diluizioni a raddoppio se necessario
- Applicare 15 µl di siero diluito ad ogni pozzetto.
- Incubare 1h a 37°C in camera umida
- Eseguire 3 lavaggi con PBS
- Diluire opportunamente in PBS gli antisieri coniugati con isotiocianato di fluoresceina (anti IgG, anti IgM e anti IgA umane). Eventualmente utilizzare un colorante di contrasto (blu di Evans o Tripan blu).
- Incubare 1h a 37°C in camera umida
- Eseguire 3 lavaggi con PBS
- Eseguire 1 lavaggio con H<sub>2</sub>O distillata
- Lasciar asciugare i vetrini e montarli
- Esaminare i vetrini al microscopio a fluorescenza.

---

<sup>5</sup> In queste colture permissive per molti tipi di virus, si deve sempre considerare la possibilità che vengano isolati agenti virali diversi dal SARS-CoV, ed effettuare conseguentemente gli opportuni saggi diagnostici, in accordo con quanto indicato al paragrafo 2.

Identificazione del genoma virale con RT-PCR

### **Introduzione**

Il genoma dei *Coronavirus* è costituito da una molecola di RNA di circa 27-31 Kb a singola elica e polarità positiva. Ciò ne premette l'identificazione in campioni biologici di diverso tipo mediante una tecnica nota come RT-PCR che prevede la retrotrascrizione dell'RNA in un DNA complementare (cDNA) e la successiva amplificazione del materiale genetico con PCR.

### **Biosicurezza**

Le procedure di campionamento ed estrazione del materiale genetico da vari tipi di campioni biologici devono essere eseguite in ambiente BSL2 (sotto cappa certificata a flusso laminare) secondo procedure codificate per rischio biologico da agenti di classe 3.<sup>6</sup>

Dopo l'aggiunta di agenti caotropici, l'estrazione e la successiva amplificazione dell'acido nucleico deve essere effettuata sotto cappa a flusso laminare in un ambiente con livello di sicurezza P2.

### **Campioni biologici** (vedi anche Tabella 2)

- Aspirato naso-faringeo
- Aspirato tracheale
- Lavaggio bronco-alveolare
- Fluido pleurico
- Urine
- Feci
- Tampone naso-faringeo od oro-faringeo
- Liquido congiuntivale

### **Preparazione dei campioni**

Per differenti campioni biologici sono previsti specifici trattamenti che precedono la fase di estrazione (es. 1% acetylcysteine- 0,9% sodium chloride; ultracentrifugazione per plasma).

### **Estrazione dell'RNA**

L'estrazione dell'acido nucleico dai campioni biologici prevede il trattamento con agenti caotropici (ad esempio guanidina isotiocianato, a 56°C per 10 minuti) che permettono la lisi del rivestimento virale e la liberazione dell'RNA. Quest'ultimo viene in seguito precipitato con alcol e risospeso in un tampone ottimale per la retrotrascrizione e l'amplificazione. Metodi di binding dell'RNA alla silice, seguiti da lavaggi che consentono l'allontanamento di potenziali inibitori della retrotrascrizione e/o dell'amplificazione, attraverso l'uso di noti kits commerciali, sono applicabili.

### **Retrotrascrizione ed amplificazione PCR**

La trascrizione inversa e l'amplificazione sono effettuate con l'enzima ricombinante termostabile *Thermus thermophilus* DNA polimerasi (*rTth* pol) in opportune condizioni tampone. Tale enzima ha sia l'attività di retrotrascrizione che di DNA polimerasi. L'attività dell'enzima richiede la presenza di oligonucleotidi (primers) la cui sequenza riconosce e lega porzioni specifiche del genoma virale funzionando da innesco per la reazione di retrotrascrizione e di polimerizzazione.

---

<sup>6</sup> Anche per queste procedure si faccia riferimento al manuale sulla biosicurezza dell'OMS ed a quanto pubblicato dai CDC (Atlanta, USA) entrambi consultabili sui siti di cui alle referenze bibliografiche.

L'RNA estratto viene aggiunto ad una miscela di reagenti contenente l' enzima *rTth* pol, i quattro deossinucleosidi (dNTPs) e coppie di primers specifici. La reazione viene incubata a differenti temperature per un numero di cicli stabilito. Durante un ciclo di amplificazione, il campione viene incubato ad una temperatura di denaturazione dell' acido nucleico (95 C°), seguita da una temperatura che consente il legame specifico dei primers (42-65 C°) e da una finale di sintesi del DNA (72 C°). Le temperature utilizzate e il numero di cicli devono essere accuratamente standardizzate per ognuna delle coppie di primers impiegate.

Nel corso della reazione i primers sono in grado di ibridizzare a due sequenze specifiche presenti nell' acido nucleico virale permettendo l' amplificazione del tratto di genoma compreso tra le due sequenze. Il frammento amplificato, di dimensioni note, è visualizzabile su gel di agarosio all' 1% mediante colorazione con bromuro d'etidio.

### **Controlli**

Nel test devono essere compresi un controllo negativo indispensabile per escludere eventuali "falsi positivi" dovuti a contaminazioni o amplificazioni aspecifiche. Un controllo positivo valido sia per la procedura di estrazione che per escludere la presenza di inibitori della reazione di PCR.

devono essere applicate Durante l'esecuzione del test devono essere adottate le corrette norme di manipolazione per evitare contaminazione da PCR.

### **Primers**

Attualmente è disponibile la sequenza corrispondente a sei coppie di primers (sito [www.who.int](http://www.who.int)) la cui specificità e sensibilità relativa è ancora in corso di valutazione. Per ognuna delle coppie di primers sono previste specifiche condizioni di temperatura e numero di cicli di amplificazione che tuttavia possono subire cambiamenti dovuti alla progressiva ottimizzazione dei protocolli di sperimentazione.

Al fine di ottenere una maggiore sensibilità alcune delle coppie di primers possono essere usate in reazioni di *nested* PCR in cui l' amplificazione di un primo frammento è seguita da un secondo round di amplificazione di un frammento interno più piccolo.

In tutti i casi il prodotto PCR amplificato corrisponde ad un porzione della *open reading frame* 1b del *Coronavirus* associato alla SARS.

Sono in corso di valutazione coppie di primers e oligonucleotidi sonda per reazioni di *real-time* PCR in grado di quantificare il genoma presente nei campioni biologici rispetto ad uno standard di riferimento. Anche in questo caso le condizioni di reazione e il campione di riferimento sono in fase di progressiva standardizzazione.

**Tabella 1 – Interpretazione dei test di Laboratorio più comuni per la diagnosi di SARS**

**1. PCR positiva per il SARS-CoV<sup>1</sup>**

Almeno 2 differenti campioni clinici o lo stesso campione di materiale prelevato a giorni diversi

oppure

due saggi PCR che amplificano regioni diverse del genoma virale (meglio se eseguito da diversi laboratori) sul campione clinico iniziale

**2. Sieroconversione<sup>2</sup>**

Siero acuto negativo seguito da siero convalescente positivo

oppure

un innalzamento di almeno 4 volte il titolo anticorpale tra siero acuto e siero convalescente saggiati in parallelo

**3. Isolamento virale**

Dimostrazione della presenza di SARS-CoV isolato da un qualunque campione biologico (vedi Tabella 2) confermato con reazione di PCR validata<sup>1</sup>

<sup>1</sup> La PCR, nei suoi vari formati, deve essere validata e può essere eseguita soltanto in Laboratori che abbiano una procedura interna di controllo di qualità. Questi devono avere un referente esterno per una conferma laddove fosse necessario.

<sup>2</sup> Sia per l'ELISA che per l'immunofluorescenza la definizione di negatività e positività del titolo deve essere quella routinariamente adottata in altre reazioni dello stesso formato per l'identificazione di anticorpi antivirali

Tabella 2

Tipo di campione	Tempo di prelievo	Uso potenziale
Aspirato naso-faringeo	Particolarmente utile nella fase iniziale della malattia	Isolamento del virus PCR Microscopia elettronica (ME)
Tampone naso-faringeo o oro-faringeo	Particolarmente utile nella fase iniziale della malattia	Isolamento del virus PCR ME
Aspirato tracheale Lavaggio bronco-alveolare Fluido pleurico	Secondo indicazione clinica	Colture microbiologiche routinarie isolamento virale PCR ME Immunofluorescenza
Urina	Fase acuta della malattia	Antigene urinario (pneumococco, Legionella) Isolamento o coltura del virus PCR
Feci	Prelievo migliore alla fine della prima settimana	Isolamento virale PCR ME
Liquido congiuntivale	Al più presto possibile	Isolamento virale PCR ME
Siero	Coppia acuta e convalescente	ELISA Immunofluorescenza
Sangue	Qualsiasi stadio della malattia	Emocolture PCR
Tessuti biotici e autotici	Qualsiasi stadio della malattia	PCR ME Immunofluorescenza