

Impatto dell'emergenza COVID-19 nei laboratori: esperienze e opinioni dei SIBioC Young Scientists

Massimiliano Ammirabile¹, Ada Aita², Andrea Bartolini³, Federica Spolaore⁴, Margherita Scapaticci³, Cristina Pellegrini⁵, Marco Perrone^{6,7}, Giulia Sancesario^{8,9}

¹Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

²Dipartimento di Medicina-DIMED e Università degli Studi di Padova

³Laboratorio Unico Metropolitano, AUSL Bologna

⁴Unità Operativa Patologia Clinica, Ospedale S. Chiara, APSS Trento

⁵Dipartimento di Scienze Cliniche Applicate e Biotecnologiche, Università dell'Aquila, L'Aquila

⁶Dipartimento di Cardiologia,, Università di Roma Tor Vergata

⁷Dipartimento di Biochimica Clinica, Università di Roma Tor Vergata

⁸Centro Risorse Biologiche, Biobanca, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

⁹Centro Europeo di Ricerca sul Cervello, Roma

ABSTRACT

The impact of COVID-19 emergency in clinical laboratories: experiences and opinions of SIBioC Young Scientists.

The recent pandemic status declared worldwide for the spreading of the new coronavirus-SARS-CoV-2 has emphasized the key role of the Laboratory Medicine in the health care process. In this context, the clinical laboratories needed to rapidly reorganize the internal workflow to face the emergency and to continue ensuring rapid and accurate responses. This has been possible only thanks to the contribution of all the personal working in the laboratory, including administrative staff, nurses, technical staff, and clinical chemists. The competence and the commitment of the Young Scientists (YS), can be considered an essential contribution to the efficient and successful management of the pandemic in clinical laboratories.

This paper reports the experiences and the opinions of some of the members of the SIBioC YS Study Group, who have been involved in the clinical laboratory management of the COVID-19 pandemic. The paper is focused to present and discuss the use of the molecular and serological tests for the screening and diagnosis of COVID-19, the reorganization of laboratories, the development of panels of biochemical markers for organ damage and cardiovascular involvement diagnosis. Finally, issues are addressed regarding the importance of safety procedures for biohazard containment, and of future research and development perspectives, thanks to the availability of biological specimens from patients affected by COVID-19, safely and correctly stored in biobanks, together with the associated clinical data.

INTRODUZIONE

La pandemia provocata dal nuovo coronavirus SARS-CoV-2 (sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus 2) ha ulteriormente enfatizzato il valore fondamentale della Medicina di Laboratorio (MdL) nell'ambito del processo assistenziale. Sebbene il fornire una risposta tempestiva e corretta sia da sempre

l'obiettivo primario della MdL, nel contesto della pandemia i laboratori sono stati costretti ad una rapida riorganizzazione per fronteggiare la situazione emergenziale e continuare a garantire risposte rapide e accurate (1). Il numero elevato di pazienti con diagnosi di malattia da SARS-CoV-2 (COVID-19) e le politiche di screening attuate sulla popolazione da alcune Regioni Italiane per confinare i contagi, hanno fatto sì che

Corrispondenza a: Massimiliano Ammirabile, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italia, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico di natura pubblica, Via Francesco Sforza, 28 - 20122 Milano, Tel: +39 02 5503 2090 / +39 02 5503 2447, Email: massimiliano.ammirabile@policlinico.mi.it

Ricevuto: 07.07.2020

Revisionato: 08.07.2020

Accettato: 30.07.2020

Pubblicato on-line: 16.10.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.081

migliaia di campioni, in particolare tamponi respiratori e prelievi ematici per gli esami sierologici, pervenissero quotidianamente ai laboratori.

In questo contesto, si è reso necessario attivare misure di sicurezza per la protezione del personale in servizio, come l'approvvigionamento di dispositivi di protezione individuale (DPI), l'adozione di misure di biocontenimento, nonché la riorganizzazione delle aree e del personale per evitare assembramenti. Nella fase acuta della pandemia, l'adeguata conservazione del materiale biologico dei pazienti affetti da COVID-19 è stata poi cruciale per permettere la ricerca e lo sviluppo di nuove terapie e vaccini, e per la validazione di nuovi esami di laboratorio. Inoltre, negli ultimi anni, le politiche aziendali dirette alla riduzione dei costi e delle risorse umane, a seguito dell'elevata automazione introdotta nei laboratori di analisi e dell'accentramento di molte diagnostiche, hanno inciso notevolmente sulle capacità di reazione e di gestione dell'emergenza all'interno dei laboratori stessi. Per superare questa criticità, è stata fondamentale la competenza e il coinvolgimento sia del personale strutturato che dei precari e degli studenti (specializzandi, dottorandi, borsisti).

Il gruppo di studio Young Scientists di SIBioC (GdS SIBioC-YS) è composto da giovani professionisti che operano nelle diverse discipline della MdL, in una rete dinamica di scambio scientifico e culturale a livello nazionale e internazionale (2,3). Il confronto a distanza, spesso attraverso videoconferenze, è stato uno strumento prezioso per la condivisione delle esperienze tra YS operanti in diverse regioni italiane, soprattutto in considerazione del fatto che l'epidemia da SARS-CoV-2 ha colpito in modo eterogeneo le regioni italiane, con zone "rosse" che hanno avuto un contagio più elevato e anticipato rispetto al resto del Paese, dove le misure di contenimento adottate dal Governo hanno contribuito ad arginarne la diffusione.

Questo articolo raccoglie le esperienze e le opinioni di alcuni membri del GdS SIBioC-YS impegnati in laboratori e contesti assistenziali diversi durante l'emergenza COVID-19. In particolare, verranno discussi temi quali l'utilizzo degli esami molecolari e sierologici per l'identificazione della infezione da SARS-CoV-2, i problemi legati alla loro accuratezza diagnostica, l'introduzione di nuovi esami nel repertorio disponibile in urgenza per permettere la stratificazione dei pazienti rispetto alla gravità dei quadri clinici osservati, e la riorganizzazione del personale per affrontare l'emergenza. Infine, verranno discusse le procedure di sicurezza per il contenimento del rischio biologico, e le prospettive future di ricerca possibili grazie alla conservazione del materiale biologico nelle biobanche COVID-19.

INDAGINI MOLECOLARI E SIEROLOGICHE

Gli esami molecolari

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) raccomanda la ricerca diretta di sequenze di RNA virale

del SARS-CoV-2 nei tamponi delle vie respiratorie (4) per la diagnosi di COVID-19, in presenza di specifici criteri clinici ed epidemiologici (5). Inoltre, è di fondamentale importanza individuare e isolare i pazienti asintomatici, rintracciando i loro potenziali contatti, garantire il distanziamento sociale e il cambiamento comportamentale della popolazione, per limitare l'ulteriore diffusione virale (6).

Il test molecolare con metodo rRT-PCR (retrotrascrittasi inversa e reazione polimerasica a catena) per SARS-CoV-2 consente di verificare la presenza del genoma virale in secrezioni respiratorie ottenute dalle alte e/o basse vie respiratorie (AVR e/o BVR), queste ultime più sensibili per una maggiore presenza del recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina-2 (ACE2), utilizzato dal virus per essere internalizzato nella cellula (4). Nonostante la maggiore invasività e la minor compliance da parte del paziente, il tampone delle BVR si è rivelato utile per limitare l'incidenza di un possibile risultato falso negativo (FN).

L'utilizzo delle tecniche di virologia molecolare per SARS-CoV-2 può presentare alcune peculiarità, tra cui la necessità di personale specializzato, lunghi tempi di refertazione (4-6 ore), possibile alterazione dei risultati dovuta a fattori biologici del virus. Infatti, risultati FN possono verificarsi se l'indagine è effettuata precocemente, in quanto il virus potrebbe non aver ancora iniziato la sua fase replicativa, oppure possono essere riscontrate differenze operatore-dipendenti nella fase di prelievo o nelle fasi pre- e analitica. I tempi di refertazione determinano una criticità sia per il paziente che per la sua struttura ospitante che deve attuare rapidamente misure di isolamento per contenere la trasmissione. Tuttavia, il tampone rimane il metodo di elezione per la diagnosi di COVID-19, sia nei pazienti sintomatici che asintomatici. L'analisi viene effettuata in modo centralizzato presso i principali ospedali e laboratori di riferimento regionali. Questo ha portato alla definizione di procedure che guidano il processo in tutte le fasi (pre-analitica, analitica e post-analitica): dall'esecuzione e trasporto del tampone, all'accettazione e analisi del campione fino alla trasmissione del referto (7-11) (Tabella1).

I kit di biologia molecolare attualmente usati nei laboratori italiani, si basano sull'identificazione contemporanea di tre geni: uno specifico per SARS-CoV-2 (RNA polimerasi RNA-dipendente - RdRP), e due comuni a tutti i betacoronavirus [nucleocapside (N) ed envelope (E)] (12, 13). La positività a tutti o solo parte di questi tre geni comporta una diversa refertazione (Tabella1). Solo da pochi mesi, in alcuni laboratori è possibile utilizzare una nuova tecnologia, GENEXPERT (CepheidTM, CA, USA), che pur basandosi sempre su un'amplificazione genica, è completamente automatizzata, permettendo di avere una diagnosi molecolare molto rapida, in circa 1 ora, consentendo così una gestione efficace dei casi urgenti.

La complessità delle procedure e il rischio di contagio hanno portato all'istituzione di unità COVID-19 all'interno

Tabella 1

Fasi del processo di laboratorio per l'analisi dei tamponi respiratori tramite retrotrascrittasi inversa e reazione polimerasica a catena (rRT-PCR) per la ricerca di SARS-CoV-2

Fase pre-analitica	Esecuzione tampone	- Basse vie (BVR): - Espettorato - Lavaggio bronco-alveolare (BAL) - Alte vie (AVR): - Naso-faringei - Oro-faringei
	Trasporto tampone con scheda allegata	Procedura per il contenimento del rischio biologico Scheda: - dati e sintomatologia del paziente - motivo della richiesta e nome medico richiedente
	Accettazione	- Centralizzata - Istituzione di un nuovo punto di accettazione con personale dedicato
	Inattivazione Virus	- Tampone con mezzo di trasporto contenente un inattivatore. - Tampone con mezzo di trasporto privo di inattivatore: * - Aggiunta di lisante - Uso del calore: - 56°C per 30' - 65°C per 10'
Fase analitica	Sistema classico	Estrazione RNA Automatica (con biglie magnetiche). Durata: 1-2 ore Amplificazione: rRT-PCR. Durata: 1,30-2 ore
	Sistema integrato	Nessuna estrazione, caricamento diretto. Durata: 1 ora
Fase post-analitica	Refertazione	- Positivo: positivo a tutti i target - Debole positivo: positività parziale ai target - Negativo: Nessun target rilevato
	Visualizzazione referti	- Pazienti ricoverati: visualizzazione immediata tramite proprio gestionale - Pazienti esterni: invio al curante del referto tramite l'utilizzo di: - Fax - Email - Creazione di piattaforme informatiche che fanno da tramite tra il laboratorio e l'ente esterno che deve visualizzare il referto.

***Inattivazione virus:** Una volta preso in consegna il tampone, il laboratorio adibito all'esecuzione procede all'inattivazione del virus nel caso in cui il tampone pervenisse in un mezzo di trasporto privo di inattivatore. Il trattamento con lisanti sotto cappe di biosicurezza di livello 2 (fase più rischiosa per gli operatori) e con l'utilizzo di appropriati dispositivi di protezione individuale (DPI), rientra tra i metodi più comunemente utilizzati. L'inattivazione al calore (56°C per la durata di 30' o 65°C per 10'), sebbene raccomandata da documenti di consenso internazionali e meno rischiosa per l'operatore, potrebbe determinare la degradazione del RNA generando potenziali falsi negativi (7).

dei laboratori, con personale dedicato esclusivamente alla diagnostica molecolare del virus.

Gli esami sierologici

Nell'attuale fase dell'emergenza sanitaria da COVID-19, la diagnostica sierologica, che consiste nella rilevazione di anticorpi diretti contro SARS-CoV-2, ha sicuramente un ruolo rilevante in ambito epidemiologico in quanto permette di stimare la diffusione dell'infezione e comprenderne la prevalenza in una determinata area (14). La drammatica diffusione della pandemia ha portato ad un rapido sviluppo, da parte di numerose aziende, di un elevato numero di kit diagnostici. Questi ultimi sono costituiti principalmente da test immunocromatografici, metodiche immunoenzimatiche

(enzyme linked immunosorbent assay - ELISA) o in chemiluminescenza (CLIA) per la ricerca sia qualitativa che quantitativa di anticorpi di tipo IgG, IgA e IgM anti SARS-CoV-2 (Tabella 2) (15). Tuttavia, la situazione emergenziale ha comportato che l'immissione nel mercato dei nuovi kit diagnostici spesso non sia stata accompagnata da una sufficiente validazione, e ancora oggi i dati disponibili sull'affidabilità e accuratezza diagnostica di questi test sono pochi e incerti (Tabella 2) (14,16,17). La comparsa di anticorpi specifici nel sangue solitamente si verifica una-due settimane dopo l'insorgenza dei sintomi, ma si stima che la trasmissione virale possa avvenire anche durante il periodo di incubazione, di circa una o anche più settimane prima della manifestazione clinica (18). In particolare, la ricerca combinata di IgM-IgG può migliorare l'accuratezza

diagnostica (sensibilità: 89%; specificità: 91%) rispetto alla sola rilevazione di IgM o IgG (19).

Nell'ambito degli studi di prevalenza dell'infezione da SARS-CoV-2, diverse regioni hanno attivato un percorso di monitoraggio volto alla sorveglianza degli operatori sanitari e socio-sanitari asintomatici per verificarne lo stato sierologico, al fine di attuare adeguati interventi di sanità pubblica orientati al contenimento della pandemia. Inoltre, per i datori di lavoro, è stata attivata la possibilità di realizzare percorsi di screening in collaborazione con il medico competente effettuando

l'esame presso laboratori privati, autorizzati dalla Regione. Infine, l'accesso ai test sierologici è stato reso disponibile anche ai privati cittadini, previa indicazione da parte del medico di medicina generale.

Nonostante i numerosi mezzi a disposizione, permangono ancora molte criticità che rendono la ricerca epidemiologica sul SARS-CoV-2 ancora una sfida. Le basse percentuali di positività agli anticorpi riscontrate nelle varie regioni italiane, ad eccezione delle zone critiche maggiormente colpite, possono verosimilmente essere ascrivibili almeno in parte alla

Tabella 2

Principali caratteristiche di alcuni metodi immunometrici attualmente disponibili in commercio (adattato da <https://www.elasitalia.it/news/sars-cov-2-sierologia/>).

Nome commerciale	Isotipo anticorpale	Specificità anticorpale	Tecnologia	Metodica	Tipo di risultato	Specificità diagnostica dichiarata	Sensibilità diagnostica dichiarata	Produttore/distributore
SARS-CoV-2 IgG o COV-2 IgG	IgG	Anti-nucleocapside	Immunometrica a due fasi	CLIA	Qualitativo	100%	99,6%	Abbott
LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG	IgG	Anti-proteina spike (S1 e S2)	Immunometrica indiretta	CLIA	Quantitativo	97,4%	98,5%	DiaSorin
ENZY-WELL SARS-CoV-2	IgG, IgM, IgA	Anti-SARS-CoV-2	ELISA su micropiastra	Enzimatica (perossidasi)	Semiquantitativo	92,5%, 87,7%, 93,7%	95,8%, 97,0%, 96,3%	DIESE
Anti SARS-CoV-2 ELISA	IgG, IgA	Anti-proteina spike (S1)	ELISA su micropiastra	Enzimatica (perossidasi)	Semiquantitativo	93,8%, 100%	99,6%, 92,4%	EUROIMMUN
ERADIKIT™ COVID19 IgG	IgG	Anti-nucleocapside	ELISA su micropiastra	Enzimatica (perossidasi)	Semiquantitativo	95,6%	100%	IN3 Diagnostic
VITROS Anti-SARS-CoV-2 Total Reagent Pack	IgG + IgM + IgA	Anti-proteina spike	Immunometrica a due fasi	CLIA potenziata	Qualitativo	100%	100%	Ortho Clinical. Diagnostics
Elecsys Anti-SARS-CoV-2	Anticorpi totali incluso IgG	Anti-nucleocapside	Immunometrica sandwich	ECLIA	Qualitativo	100%	99,8%	Roche
MAGLUMI™ 2019-nCoV IgG/IgM	IgG, IgM	Anti-nucleocapside e anti-proteina spike (S1 e S2)	Immunometrica indiretta / con Ab. a cattura	CLIA	Quantitativo	91,2%, 78,7%	97,3%, 97,5%	Snibe (Medical System)
COVID-19 VIRCLIA® MONOTEST	IgG, IgM+IgA	Anti-nucleocapside e anti-proteina spike	Immunometrica indiretta	CLIA	Qualitativo	92%, 97%	99%, 99%	Vircell (Alifax)
iFlash-SARS-CoV-2	IgG, IgM	Anti-nucleocapside e anti-proteina spike	Immunometrica indiretta a due fasi	CLIA	Quantitativo	97,3%, 86,1%	96,3%, 99,2%	Yhlo (PANTEC)

CLIA: chemiluminescenza; ECLIA: elettro-chemiluminescenza

scarsa conoscenza attuale riguardo la dinamica anticorpale di SARS-CoV-2 (20). Ad oggi, gli esami sierologici, pur non potendo essere usati nell'attività diagnostica dello stato infettivo dell'individuo e quindi non potendo sostituire l'esame molecolare, possono essere rilevanti a fini epidemiologici per conoscere la suscettibilità della popolazione e i modelli di trasmissione del virus e, in prospettiva futura, per lo sviluppo di terapie sierologiche (ad esempio l'utilizzo di plasma di individui convalescenti con elevato titolo anticorpale) e nel monitoraggio della risposta vaccinale (13,21) oltre che, in casi specifici, essere di supporto alla diagnosi di infezione nel caso di risultati dubbi dell'analisi molecolare (20).

RIORGANIZZAZIONE DEI LABORATORI DI BIOCHIMICA CLINICA

Nel contesto della emergenza da SARS-CoV-2, i laboratori hanno dovuto modificare la loro organizzazione non solo per far fronte ad una considerevole richiesta di esecuzione di indagini molecolari e sierologiche, ma anche per ampliare il proprio repertorio di esami da eseguire in regime di urgenza (ad esempio ferritina, interleuchina-6, trigliceridi,) per consentire la stratificazione e l'identificazione dei pazienti fragili. Inoltre, si è osservato un aumento considerevole di richieste di alcuni esami già eseguibili in urgenza, come ad esempio proteina C-reattiva (PCR), troponina (Tpn), creatina chinasi (CK), lattato deidrogenasi (LDH), D-dimero, procalcitonina. Al contempo sono diminuite le richieste di esami in routine e quelle relative ai pazienti ambulatoriali, per la sospensione di molte attività routinarie all'interno degli ospedali.

Il monitoraggio biochimico dei pazienti si è rivelato utile nell'accertare la gravità della malattia, nel predire il rischio di evoluzione verso la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), la coagulazione intravascolare disseminata (CID) e la sindrome da disfunzione multiorgano (22). In generale infatti, i pazienti affetti da COVID-19 mostrano caratteristiche ematochimiche comuni, quali linfopenia, aumento dei valori di PCR, LDH, velocità di eritrosedimentazione (VES) e D-dimero, ridotta concentrazione di albumina sierica (23). Leucocitosi, neutrofilia e linfopenia sono stati descritti come parametri di predizione di progressione verso forme gravi e critiche di COVID-19 (24). Inoltre, nei pazienti con polmonite associata a infezione da SARS-CoV-2 può spesso manifestarsi una "tempesta citochinica", nota anche come linfoistocitosi emofagocitica secondaria (sHLH) o un'iperinfiammazione sistemica designata sotto il termine generico di sindrome da attivazione dei macrofagi.

Nei pazienti con COVID-19 e ARDS, una prognosi

negativa è legata ad un aumento protratto di Interleuchina-1 e -6 (IL-1, IL-6), che solitamente si osserva durante reazioni infiammatorie acute associate a lesioni, traumi, stress, infezioni, neoplasie e altre gravi situazioni patologiche. Diversi studi hanno valutato l'efficacia dei farmaci anti-IL-6 (Tocilizumab, Sarilumab), inibitori della cascata citochinica, responsabile della sintomatologia severa dell'infezione da SARS-CoV-2 (22-27). Il dato emerso soprattutto sui pazienti non intubati, conferma l'importanza del trattamento con i farmaci anti-IL-6 nelle fasi precoci della cosiddetta "tempesta citochinica" che è alla base del meccanismo del distress respiratorio. L'analisi dei marcatori biomorali ha evidenziato una concentrazione basale sierica di IL-6, CRP, e un rapporto neutrofilii/linfociti molto più elevato nei pazienti non-responsivi al trattamento rispetto ai pazienti che lo sono (24-28). La determinazione di IL-6 nel siero di pazienti ricoverati in terapia intensiva si è dimostrata utile nella valutazione della sindrome da risposta infiammatoria sistemica, della sepsi e dello shock settico, e nel monitoraggio durante il trattamento con farmaci anti-IL-6 (29). Come conseguenza, in molti laboratori è stata introdotta la misura di IL-6.

I dati del recente report del "Chinese Center for Disease Control and Prevention" relativo a 72 314 casi di COVID-19, mostrano che a fronte di una mortalità complessiva del 2,3%, questa è risultata del 10,5% nei pazienti con pregresse malattie cardiovascolari (30). In questi pazienti l'infezione da SARS-CoV-2 e l'infiammazione sistemica possono portare ad infarto del miocardio, scompenso cardiaco e aritmie tramite numerosi meccanismi, quali l'instabilità di una pre-esistente placca aterosclerotica coronarica, tachicardia con aumentato stress di parete, il rilascio di citochine infiammatorie e uno stato di aumentata trombofilia (31-35). Dall'altra parte studi più recenti hanno dimostrato che anche pazienti che prima dell'infezione non avevano alcuna malattia cardiovascolare, potevano avere una complicanza cardiaca, potenzialmente fatale, come la miocardite (36). La diagnosi precoce delle complicanze cardiache nei pazienti positivi al COVID-19 è possibile attraverso la misura delle troponine cardiache I e T, che le più recenti linee guida internazionali raccomandano come biomarcatori di riferimento per il danno miocardico (37,38).

Diversi autori hanno dimostrato come una misura precoce delle troponine cardiache abbia permesso di fare diagnosi di miocardite, talvolta in pazienti paucisintomatici, e di impostare tempestivamente una terapia per il trattamento della cardiopatia (39). Pertanto la determinazione delle troponine cardiache dovrebbe essere presa in considerazione nei pazienti con COVID-19, e in particolare in quelli a rischio più elevato o che mostrino sintomi specifici, per una diagnosi precoce e un trattamento tempestivo delle complicanze cardiache.

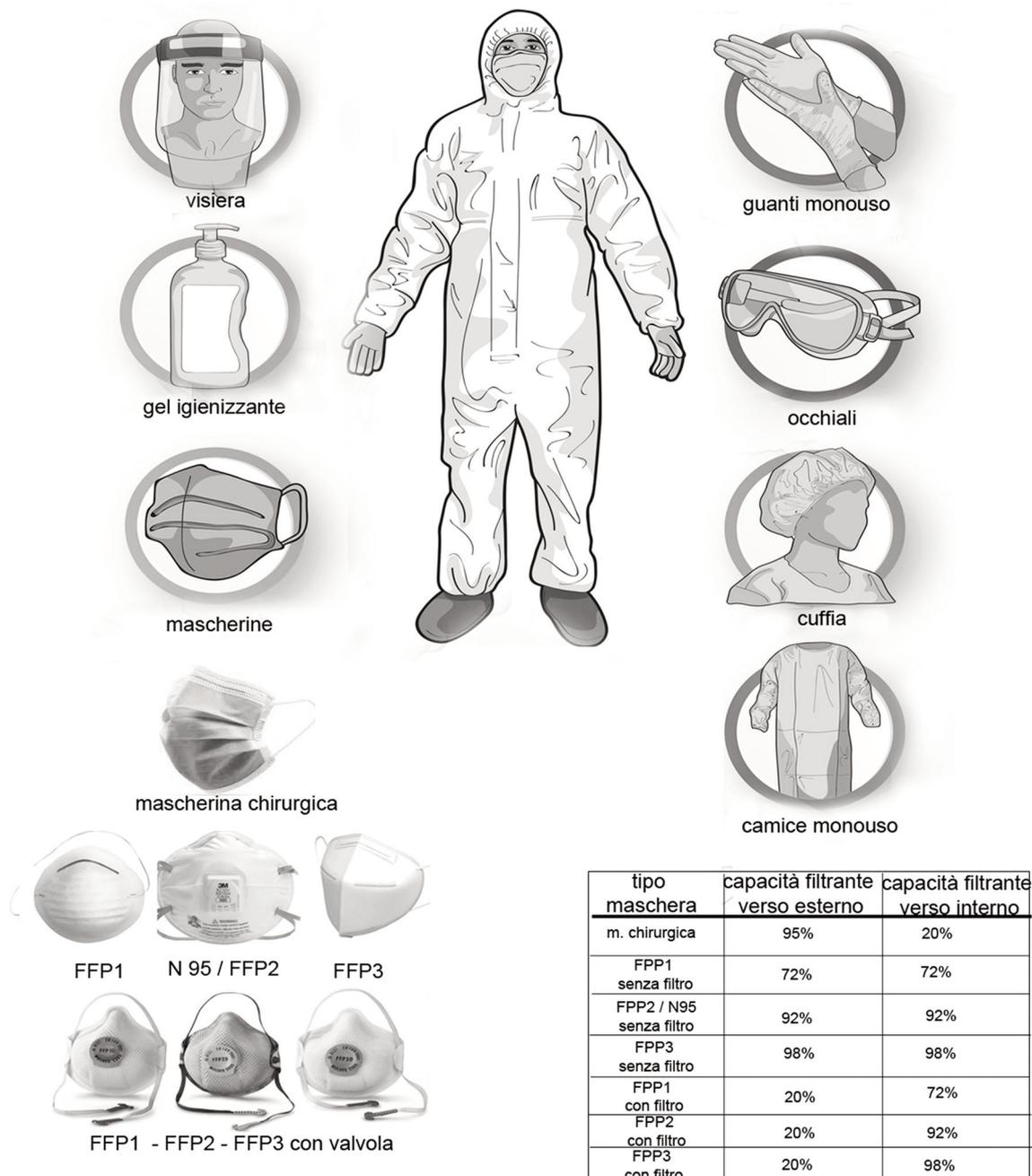


Figura 1. Diversi tipi di DPI utilizzati nella prevenzione dei contagi da SARS-CoV-2 e rispettiva capacità filtrante delle maschere facciali

GESTIONE DEL RISCHIO BIOLOGICO E DELLA SICUREZZA IN LABORATORIO

Le misure di sicurezza in laboratorio previste nella gestione dell'emergenza per COVID-19 includono requisiti già adottati per il contenimento del rischio professionale di contrarre infezioni da agenti patogeni manipolati.

Il potenziale rischio dell'agente biologico è determinato sia dalla sua natura che dalle modalità di

manipolazione. Le procedure di processazione dei campioni (manipolazione, pipettaggio, centrifugazione) per loro stessa natura possono generare aerosol. Inoltre, l'amplificazione dell'organismo virale crea il potenziale per un'esposizione su larga scala in caso di rilascio accidentale (40). È necessario dunque fornire misure di sicurezza adeguate al tipo di rischio biologico (BR) e quindi prevedere l'uso di barriere primarie e secondarie. I livelli di biocontenimento e biosicurezza devono essere adeguati al BR, e stabiliti sulla base di infettività,

patogenicità e neutralizzazione dell'agente patogeno. Nei laboratori clinici, la natura infettiva dei materiali biologici che pervengono in laboratorio è per lo più sconosciuta e i campioni vengono spesso inviati con una richiesta di esame microbiologico per più agenti. Salvo circostanze particolari, il processo di ricerca sierologica dei patogeni e il suo trattamento possono essere eseguiti al livello di biosicurezza-2 (BSL-2), raccomandato per campioni potenzialmente infetti (ad esempio HBV/HIV), per i quali il rischio è correlato all'esposizione percutanea/mucosa accidentale, o a ingestione di materiale infetto. Tutte le procedure che potenzialmente incrementano il rischio di esposizione del personale devono essere eseguite con strumentazioni primarie contenute in dispositivi protetti (cabina di sicurezza biologica, o coppette di centrifugazione di sicurezza) (41). I DPI devono essere appropriati e devono inoltre essere disponibili barriere secondarie, istruzioni e materiali per il corretto lavaggio delle mani e la decontaminazione dei rifiuti per ridurre il potenziale contagio ambientale. La ricezione, lo smistamento, il trattamento e l'analisi dei campioni devono essere effettuati tenendo conto del rischio di livello 2 da parte di tutto il personale (42). I DPI anti COVID-19 sono quelli dedicati alla manipolazione sicura dei campioni a rischio di infezione per via respiratoria.

Le maschere facciali sono classificate in FFP1,2,3 in base al livello di protezione contro l'aerosol (Figura1). Le FFP2 o N95 mantengono la loro protezione se utilizzate correttamente, e sostituite ogni 4 ore (43). Le FFP3 sono utili per un uso prolungato e richiedono una maschera chirurgica aggiuntiva per evitare la diffusione dell'espiazione dell'operatore nell'ambiente.

L'utilizzo prolungato è preferibile al riutilizzo ma ha effetti collaterali, quali ad esempio lo sviluppo di condensa, per la formazione di una maggiore umidità all'interno della maschera, con cambiamenti nel microbiota cutaneo e comparsa di arrossamenti, dermatiti, prurito e/o acne nelle aree marginali di sfregamento e sulla pelle di naso/bocca; oppure la difficoltà di respirazione, con sensazione di affanno e fame d'aria per accumulo di CO₂. Per usi prolungati, oltre le 12 ore, possono verificarsi mal di testa, ipossiemia, ipercapnia, stordimento, nausea, difficoltà di comunicazione (44).

Tabella 3

Raccolta di dati clinici associati a COVID-19: richiesta dalle biobanche e lista consigliata per l'armonizzazione. Fonte: Istituto Superiore di Sanità, Rapporto COVID-19 n. 13/2020, <http://iss.it> (ultimo accesso: aprile 2020).

Infezione da SARS-CoV-2	Test positivo, test negativo, risultato non conclusivo, test non effettuato
Motivazione della raccolta	Sospetta infezione, screening, conferma guarigione
Sintomi clinici e durata	Assenti, lievi o gravi Comorbilità, trattamento, monitoraggio.
Stato di malattia	Non affetto, affetto, guarito, deceduto.
Test diagnostici	Titolo anticorpale di IgM e IgG anti-virus, collegamento alla cartella clinica, risultati degli esami di laboratorio al ricovero, immagini TAC e/o di radiografia polmonare.

CONSERVAZIONE DEL MATERIALE BIOLOGICO E DEI DATI CLINICI ASSOCIATI: LE BIOBANCHE COVID-19

Un notevole sforzo a livello internazionale è in atto nel campo della ricerca di base e preclinica per individuare terapie, vaccini o esami diagnostici per SARS-CoV-2. Per favorire la ricerca traslazionale futura e l'accesso ai campioni per finalità di ricerca, la conservazione del materiale biologico dei pazienti e dei guariti all'interno delle biobanche COVID-19 è fondamentale. Diverse raccomandazioni sono state definite per armonizzare la conservazione del materiale e dei dati associati secondo standard condivisi (45). In questo processo, diversi fattori devono essere presi in considerazione, come la manipolazione dei campioni secondo Procedure Operative Standard (SOPs), il BR, e soprattutto la tutela della privacy e degli aspetti etici, legali e sociali dei pazienti. All'interno delle biobanche possono essere conservati sangue e i suoi derivati, il tampone naso e oro-faringeo, il BAL, e altro materiale biologico, secondo procedure di buona pratica del laboratorio microbiologico (46). In particolare, le analisi molecolari (amplificazione genica, sequenziamento) e sierologiche devono essere condotte presso le strutture con livelli di contenimento del rischio biologico comparabile a BSL-2, mentre la coltura di virus, saggi di isolamento o di neutralizzazione vanno eseguiti in laboratorio BSL-3 (47). In modo analogo, i campioni provenienti da casi sospetti o confermati di COVID-19 rientrano nella categoria delle "Sostanze Biologiche Categoria B UN-3373", mentre le colture o gli isolati virali devono essere trasportati come "Sostanza infettiva categoria A, UN-2814", in modo conforme al Dangerous Goods Regulations (DGR) dell'International Air Transport Association (IATA).

Oltre al materiale biologico, di grande importanza è la raccolta dei dati associati, epidemiologici, clinici, anche attraverso il collegamento con la cartella elettronica, e informazioni riguardo al trattamento, al monitoraggio, allo stato della malattia (Tabella 3) (48). Tuttavia, è indispensabile ricevere dal paziente o tutore l'autorizzazione al trattamento dei dati e alla conservazione del materiale biologico per finalità di ricerca e per studi futuri. In casi emergenziali, a causa

dello stato clinico del paziente, la firma del Consenso Informato può essere ottenuta anche successivamente rispetto alla raccolta del materiale, ma è il fondamento di tutto il processo di conservazione, per evitare di dover ricorrere all'anonimizzazione e distruzione del materiale al termine dello svolgimento delle finalità per cui era stato raccolto. Il Regolamento Europeo Generale sulla Protezione dei Dati (GDPR 2016/679) definisce infatti il diritto alla protezione dei dati e la responsabilità del titolare o del responsabile del trattamento, per cui in nessun caso è consentito il trattamento dei dati associati dei pazienti in assenza di un loro consenso specifico.

DISCUSSIONE

La pandemia da SARS-CoV-2 ha impattato in modo devastante sul servizio sanitario nazionale dei paesi colpiti, in particolar modo l'Italia. La MdL è stata coinvolta in prima linea, al fianco di medici clinici, infermieri e soprattutto pazienti. L'implementazione in tempi rapidi di metodiche di biologia molecolare per l'identificazione del SARS-CoV-2 e la valutazione di numerose piattaforme commerciali per le indagini sierologiche ha richiesto infatti l'impegno di numerose risorse umane adeguatamente formate. Gli esami sierologici, anche se non alternativi al RT-PCR su tampone per la diagnosi di infezioni virali acute, costituiscono un approccio complementare per la diagnosi e il monitoraggio della malattia oltre che per studi epidemiologici. Inoltre, il potenziamento della sezione del laboratorio dedicata agli esami da eseguire in regime di urgenza/emergenza, per far fronte alle necessità dei pazienti con quadri clinici complessi, è stata una misura eccezionale adottata nei laboratori che ha richiesto una ri-organizzazione impegnativa, insieme al dovere della conservazione del materiale biologico secondo SOPs e nel rispetto dei diritti dei donatori, per offrire un supporto al futuro della ricerca traslazionale su COVID-19.

I giovani professionisti della MdL hanno contribuito attivamente alla risposta all'emergenza. Da un sondaggio del 2019, la maggior parte dei giovani (meno di 40 anni) con una specializzazione inerente la MdL lavora in ambito sanitario, soprattutto in strutture pubbliche, ospedaliere territoriali o universitarie, e nei laboratori privati (49). Sebbene le tipologie di contratto siano varie, e sebbene solo una parte di questi professionisti abbia un contratto stabile, essi hanno fornito un importante contributo sul campo, sia in ambito diagnostico che di ricerca, per individuare gli obiettivi terapeutici, per la ricerca sui vaccini e sui farmaci efficaci. Inoltre, l'alto rischio biologico e la possibilità di contagio hanno ulteriormente messo a dura prova la condizione lavorativa di tutto il personale, che ha operato con grande sforzo e responsabilità.

L'emergenza causata dal SARS-CoV-2 ha mostrato diversi punti di debolezza del Sistema Sanitario, dovuti in parte al sotto-finanziamento e alla carenza di personale

e al consolidamento delle strutture sanitarie in atto da alcuni anni, ma dall'altro ha messo in luce le importanti eccellenze dei nostri sistemi di assistenza e ricerca. Grande risalto è stato giustamente dato a livello nazionale al lavoro di sequenziamento del virus da campioni umani svolto da un gruppo composto anche da giovani ricercatrici precarie presso l'Istituto Nazionale per le Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani di Roma (50). La nostra speranza e augurio è che si possa valorizzare l'impegno e la capacità di tanti YS che operano quotidianamente con professionalità e abnegazione nella MdL.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori desiderano ringraziare i Direttori, i Colleghi del Laboratorio e i Clinici di riferimento delle rispettive strutture di appartenenza per il loro gentile e fattivo supporto.

BIBLIOGRAFIA

- Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0240.
- Sancesario G, Perrone MA, Pellegrini C, et al. La medicina di laboratorio: gli specialisti di domani. *Biochim Clin* 2019;43:424-34.
- Sancesario G, Perrone MA, Aita A, et al. Education and training for young scientists: Two years' experience of the Italian Society of Clinical Chemistry Young Scientists Working Group (SIBIOC YS-WG). *Clin Chim Acta* 2019;493:S311-6.
- Di Maggio F, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte II: metodologie di biologia molecolare. *Biochim Clin* 2019;43:435-48.
- World Health Organization (WHO). Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> (ultimo accesso: maggio 2020).
- Leung K, Wu JT, Liu D, et al. First-wave COVID-19 transmissibility and severity in China outside Hubei after control measures, and second-wave scenario planning: a modelling impact assessment. *Lancet* 2020;395:1382-93.
- Pan Y, Long L, Zhang D, et al. potential false-negative nucleic acid testing results for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from thermal inactivation of samples with low viral loads. *Clin Chem* 2020;66:794-801.
- Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:181-92.
- Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020;30:30251-8.
- Chan JF, Yip CC, To KK, et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/HeI real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2020;4:00310-20.

11. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. <https://www.fda.gov/media/134922/download>. (ultimo accesso: luglio 2020).
12. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020;25:2000045.
13. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. Interim guidance 2 March 2020. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1271387/retrieve> (ultimo accesso: maggio 2020)
14. Kirkcaldy RD, King BA, Brooks JT. COVID-19 and Postinfection Immunity: Limited Evidence, Many Remaining Questions. *JAMA* 2020 doi:10.1001/jama.2020.7869
15. SARS-CoV-2 Diagnostic Pipeline. <https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/> (ultimo accesso: maggio 2020).
16. ESCMID Emerging Infections Task Force (EITaF): outbreak news (10 May 2020). COVID-19 Serology—where are we? https://www.escmid.org/research_projects/emerging_infections_task_force (ultimo accesso: maggio 2020).
17. ELAS-Italia. SARS-CoV-2 diagnostica sierologica SCHEDE TECNICHE. <https://www.elasitalia.it/news/sars-cov-2-sierologia> (ultimo accesso: maggio 2020).
18. Zhai P, Ding Y, Wu X, et al. The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19. *Int J Antimicrob Agents* 2020 doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105955.
19. Li Z, Yi Y, Luo X, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol* 2020 doi:10.1002/jmv.25727.
20. Plebani M. Il valore della medicina di laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2. *Biochim Clin* 2020 doi:10.19186/BC_2020.053.
21. Theel ES, Slev P, Wheeler S et al. The Role of Antibody Testing for SARS-CoV-2: Is There One? *J Clin Microbiol* 2020 doi:10.1128/JCM.00797-20.
22. Tang N, Li D, Wang X, et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020 doi:10.1111/jth.14768.
23. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0198
24. Frater JL, Zini G, d'Onofrio G, et al. COVID-19 and the clinical hematology laboratory. *Int J Lab Hematol*. 2020;42:Suppl1:11-8.
25. McGonagle D, Sharifa K, O'Regan A, et al. The Role of cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. *Autoimmun Rev* 2020;19:102537.
26. Arnaldez FI, O'Day SJ, Drake CG et al. The Society for Immunotherapy of Cancer perspective on regulation of interleukin-6 signaling in COVID-19-related systemic inflammatory response. *J Immunother Cancer* 2020 doi:10.1136/jitc-2020-000930.
27. Jekarl DW, Lee SY, Lee J, et al. Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:342-7.
28. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, et al. Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care part II: clinical implications. *J Intensive Care Med* 2011;26:73-87.
29. Liu B, Li M, Zhou Z et al. Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? *J Autoimmun*. 2020;111:102452.
30. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 2020 doi:10.1001/jama.2020.2648
31. Lippi G, Lavie CJ, Sanchis-Gomar F. Cardiac troponin I in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): Evidence from a meta-analysis. *Prog Cardiovasc Dis* 2020 doi:10.1016/j.pcad.2020.03.001
32. Long B, Brady WJ, Koyfman A, Gottlieb M. Cardiovascular complications in COVID-19. *Am J Emerg Med* 2020;38:1504-7.
33. Morelli B, MSontaruli B, Bazzan M, et al. Alterazioni dei meccanismi dell'emostasi in corso di infezione da SARS-CoV-2 (COVID-19). *Biochim Clin* 2020 doi:10.19186/BC_2020.056.
34. Montaruli B, Morelli B, Marchetti M, et al. Il ruolo del laboratorio di coagulazione nel monitoraggio del trattamento eparinico dei pazienti con COVID-19 *Biochim Clin* 2020 doi:10.19186/BC_2020.073.
35. Zanolla L, Graziani MS. Al "cuore" del quadro clinico di COVID-19 *Biochim Clin* 2020 doi:10.19186/BC_2020.063.
36. Kim IC, Kim JY, Kim HA, et al. COVID-19-related myocarditis in a 21-year-old female patient. *Eur Heart J*. 2020;41:1859.
37. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
38. AAVV. Troponine cardiache: attualità e prospettive. *Biochim Clin* 2020;44 SS1.
39. Inciardi RM, Lupi L, Zaccone G, et al. Cardiac involvement in a patient with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol* 2020;5:1-6.
40. Chang L, Yan Y, Wang L. Coronavirus Disease 2019: coronaviruses and blood safety. *Transfus Med Rev* 2020;34:75-80.
41. Burnett LC, Lunn G, Coico R. Biosafety: guidelines for working with pathogenic and infectious microorganisms. *Current Protocols in Microbiology* 2009;Chapter 1:Unit 1A.1. doi:10.1002/9780471729259.mc01a01s13.
42. Stanziale S, Bianculli AG, Magaldi A et al. Società scientifica Italiana dei tecnici di laboratorio biomedico' DPI nelle linee guida ISPSP e raccomandazioni ISS e WHO per il contenimento della trasmissione di Covid 19 - Raccomandazioni dell'associazione Tecnico Scientifica S.I.T.L.a.B N.2/29i0 IT VER rev 1.0; 15 marzo 2020. <http://www.sitlab.it> (ultimo accesso: maggio 2020).
43. Brienen NC, Timen A, Wallinga J, et al. The effect of mask use on the spread of influenza during a pandemic. *Risk Anal* 2010;30:1210-8.
44. Rebmann T, Carrico R, Wang J. Physiologic and other effects and compliance with long-term respirator use among medical intensive care unit nurses. *Am J Infect Control* 2013;4:1218-23.
45. Directory COVID-19. <https://www.bbmri.it/biobanche-covid19/> (ultimo accesso: maggio 2020).
46. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19): interim guidance, 19 March 2020. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331500> (ultimo accesso maggio 2020).
47. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19): interim guidance, 12 February 2020. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331138> (ultimo accesso maggio 2020).
48. Istituto Superiore di Sanità. Raccomandazioni per

raccolta, trasporto e conservazione di campioni biologici COVID-19. Versione del 15 aprile 2020. Gruppo di lavoro ISS Ricerca traslazionale COVID-19 2020, 19 p. Rapporti ISS COVID-19 n. 13/2020. <http://iss.it> (ultimo accesso: aprile 2020).

49. Bellini C, Nannini S, Berardi M et al. Il "Libro Bianco" dei Giovani Professionisti di Medicina di Laboratorio in Italia: risultati dell'indagine del Gruppo di Studio SIBioC Young Scientists. *Biochim Clin* 2020; DOI:10.19186/BC_2020.042
50. Capobianchi MR, Rueca M, Messina F, et al. Molecular characterization of SARS-CoV-2 from the first case of COVID-19 in Italy. *Clin Microbiol Infect* 2020 doi:10.1016/j.cmi.2020.03.025.