

## **Capacità diagnostica e requisiti di biosicurezza**

La diagnosi di infezione da ANDV si basa sull'integrazione di elementi clinici, epidemiologici e laboratoristici. Dal punto di vista laboratoristico, la conferma diagnostica può essere ottenuta mediante la ricerca diretta del genoma virale (RNA) attraverso tecniche di biologia molecolare e/o mediante la dimostrazione di una risposta anticorpale specifica, evidenziata dalla presenza di anticorpi di classe IgM e/o dalla sieroconversione o da un incremento significativo dei titoli anticorpali IgG. Studi recenti indicano inoltre che la viremia può essere rilevabile in fase molto precoce dell'infezione, anche in prossimità dell'esordio clinico, a supporto dell'impiego tempestivo delle metodiche molecolari nei casi sospetti. L'esecuzione del test durante il periodo di incubazione/fase asintomatica può risultare negativa e non consente di escludere l'infezione.

### **1. Campioni biologici utili alla diagnosi**

Ai fini diagnostici, i campioni biologici appropriati devono essere selezionati e prelevati tenendo conto della fase clinica dell'infezione e del quadro sintomatologico del paziente. Nelle fasi iniziali della malattia, la diagnosi si basa prevalentemente su metodiche di tipo molecolare. Alla luce delle evidenze disponibili, risultano pertanto idonei per la diagnosi il sangue intero raccolto con anticoagulante EDTA, nonché il plasma e il siero; altre matrici biologiche come urine e saliva possono essere utili per la rilevazione molecolare del virus. Studi prospettici hanno dimostrato che, durante la fase acuta dell'infezione da ANDV, l'RNA virale può essere rilevato in più fluidi biologici, con una maggiore probabilità di positività precoce nei casi clinicamente più severi. In presenza di sintomatologia respiratoria, possono inoltre essere indicati campioni delle vie respiratorie, sia delle alte che delle basse vie in relazione al quadro clinico, che possono fornire un utile supporto diagnostico. Tutti i suddetti campioni consentono la ricerca diretta dell'RNA virale mediante RT-PCR e/o real-time RT-PCR, permettendo un'identificazione precoce dell'infezione da ANDV.

Per la diagnosi sierologica, risultano indicati campioni di siero o in alternativa plasma, utilizzati per la ricerca di anticorpi specifici anti-hantavirus di classe IgM e IgG. La sierologia riveste un ruolo di particolare rilievo nelle fasi più avanzate dell'infezione e nel processo di conferma diagnostica, attraverso la dimostrazione di sieroconversione o di un incremento significativo dei titoli anticorpali, soprattutto nei casi in cui i test di rilevazione diretta del genoma virale risultino negativi o non più indicativi.

### **2. Metodiche diagnostiche disponibili**

Per la diagnosi molecolare dell'infezione da ANDV sono disponibili test commerciali (generalmente con marcatura RUO) real-time RT-PCR per la rilevazione di hantavirus associati a sindrome polmonare, comprensivi di ANDV. Sono inoltre utilizzabili RT-PCR e real-time RT-PCR home-made specifiche per ANDV, disponibili in letteratura, che consentono un'identificazione mirata dell'agente eziologico. A supporto delle attività diagnostiche ed epidemiologiche possono essere impiegati anche test home-made PCR pan-hantavirus, eventualmente associabili a metodiche di sequenziamento, utili per finalità di tipizzazione virale e di indagine epidemiologica, in particolare nei contesti di cluster o outbreak. Per quanto riguarda l'utilizzo di metodiche molecolari, è raccomandato effettuare una verifica dei primer e delle sonde in uso rispetto alla sequenza virale, al fine di confermarne l'adeguatezza diagnostica.

Per la diagnosi sierologica sono disponibili test immunoenzimatici (ELISA) per la ricerca di anticorpi specifici di classe IgM e IgG. In particolare, la rilevazione delle IgM anti-ANDV è indicativa di infezione acuta, mentre la dimostrazione delle IgG specifiche, soprattutto in presenza di sieroconversione o di un incremento significativo dei titoli anticorpali in campioni longitudinali, contribuisce alla conferma diagnostica del caso. Possono essere impiegate anche metodiche di immunofluorescenza indiretta (IFA), utilizzando kit con antigeni specifici per ANDV, che attualmente non sono più disponibili in commercio ma che potrebbero essere sviluppati home-made ove possibile. In alternativa, considerata la nota cross-reattività sierologica tra i diversi

hantavirus (principalmente con il SNV), test IFA per altri hantavirus risultano comunque utili nell'ambito della diagnosi di infezione. Sebbene le metodiche IFA non consentano sempre una precisa identificazione di specie, il loro impiego, integrato con il quadro clinico epidemiologico e con i risultati delle indagini molecolari, rappresenta un valido supporto ai fini diagnostici.

### **3. Criteri di conferma laboratoristica**

La conferma dell'infezione da ANDV si basa sull'evidenza diretta o indiretta dell'infezione, in integrazione con il quadro clinico ed epidemiologico. Un caso può essere considerato confermato quando sia dimostrata la presenza del virus mediante la rilevazione dell'RNA di ANDV in campioni clinici, attraverso tecniche di RT-PCR e/o real-time RT-PCR, indicativa di infezione in atto.

La dimostrazione di una risposta anticorpale specifica può supportare la conferma diagnostica di infezione da ANDV. In particolare, questa avviene attraverso la documentata presenza di anticorpi IgM, indicativi di infezione recente, e dalla successiva sieroconversione o un incremento significativo del titolo anticorpale IgG in campioni sierici prelevati in tempi differenti. Tali criteri consentono di confermare l'infezione anche nelle fasi più avanzate della malattia o nei casi in cui, per la fisiologica riduzione della viremia nel tempo, la ricerca diretta del genoma virale risulti negativa o non più indicativa. Tuttavia, è necessario considerare che la possibile cross-reattività sierologica tra diversi hantavirus può determinare risultati aspecifici o difficoltà interpretative e, conseguentemente, possibili errori nell'interpretazione diagnostica, in particolare in aree in cui circolano altri hantavirus. È pertanto essenziale interpretare i risultati alla luce delle caratteristiche epidemiologiche e cliniche del caso e, ove possibile, testare campioni multipli prelevati a distanza di tempo.

### **4. Biosicurezza nella gestione dei campioni**

Allo stato attuale, ANDV viene classificato come agente patogeno appartenente al gruppo di rischio 3. Considerata la situazione attuale e le evidenze recenti, i campioni biologici provenienti da soggetti con sospetta o confermata infezione da ANDV devono essere gestiti nel rispetto di adeguate misure di biosicurezza, sulla base di una valutazione del rischio specifica che ciascun laboratorio è tenuto a condurre considerando il materiale biologico trattato, le procedure da eseguire, le strutture ed il personale disponibili e le procedure operative interne. Tale virus e i campioni clinici infetti devono essere manipolati in laboratori di biosicurezza di livello 3 (BSL-3); tuttavia, previa valutazione del rischio interno, le procedure di inattivazione dei campioni clinici per l'esecuzione di test molecolari possono essere effettuate, come requisito minimo, all'interno di una cappa di sicurezza biologica di classe II, in un laboratorio di livello di contenimento BSL-2, purché vengano adottate misure di controllo rafforzate (equiparabili ad un livello di biosicurezza 3) finalizzate a ridurre il rischio di generazione di aerosol, di sversamenti durante le procedure, e potenziale esposizione degli operatori.

È raccomandato pertanto che:

- l'apertura degli imballaggi secondari e il trasferimento dei campioni avvengano sempre all'interno di una cappa di classe II, secondo protocolli consolidati e con personale adeguatamente formato alla gestione di eventuali incidenti;
- qualora sia necessario eseguire operazioni di centrifugazione su campioni non inattivati, devono essere utilizzati rotori sigillati estraibili o contenitori di sicurezza, prevedendo che le fasi di caricamento e scaricamento siano effettuate all'interno della cappa di sicurezza biologica;
- tutti i rifiuti potenzialmente contaminati da ANDV devono essere decontaminati prima dello smaltimento, mediante metodi approvati quali autoclavaggio o disinfezione chimica;

- il personale deve inoltre utilizzare dispositivi di protezione individuale appropriati, in particolare durante la manipolazione dei campioni prima dell'inattivazione, e valutare l'adozione di ulteriori misure di contenimento per procedure specifiche che comportino un aumentato rischio biologico, sulla base della valutazione del rischio locale;
- il personale deve essere formato a tali procedure e deve applicare rigorosamente le buone pratiche microbiologiche e di laboratorio e le tecniche asettiche, in conformità ai manuali di biosicurezza dell'OMS e alle disposizioni nazionali vigenti.

Per eventuali ulteriori informazioni, chiarimenti tecnico-scientifici o supporto operativo rivolgersi all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e al Laboratorio di Virologia e Laboratori di Biosicurezza dell'Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L. Spallanzani" IRCCS.