

Comisia de Microbiologie Medicală a Ministerului Sănătății Comisia de Microbiologie Medicală a Colegiului Medicilor din România

Infecția cu SARS-CoV-2

Introducere

SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) aparține grupului beta-coronavirusuri, linia 2, subgenul Sarbecovirus. Coronavirusurile sunt virusuri anvelopate, de tip ARN monocatenar cu polaritate pozitivă (ARN ss+), cu dimensiuni mari, de cca 125 nm.

SARS-CoV-2 determină o infecție respiratorie denumită COVID-19 (Coronavirus infectious disease - 2019), cu perioadă de incubație medie de cca 5 zile (limite 2-14 zile). Boala este caracterizată prin simptomatologie predominant respiratorie (febră, tuse, dificultăți de respirație) de intensitate moderată în cca 80% din cazuri, dar poate avea manifestări severe (pneumonie bilaterală interstițială), cu evoluție către insuficiență respiratorie, detresa respiratorie acută (ARDS) fiind principala cauză de mortalitate. Există și cazuri cu manifestări gastrointestinale (mai ales diaree), iar la unii pacienți (în special la cei tineri) au fost semnalate hipo/anosmie și hipo/disgeuzie ca simptome precoce.

Codificarea CIM-10 a COVID-19

U07.1 - COVID-19 cu virus identificat = valabil pentru cazurile CONFIRMATE

U07.2 - COVID-19 cu virus neidentificat = valabil pentru cazurile SUSPECTE

Definiția de caz

Notă: Definiția de caz este actualizată periodic (<http://cnscbt.ro/index.php/informatii-pentru-personalul-medico-sanitar>)

Caz suspect

1) Pacient cu infecție respiratorie acută (debut brusc al cel puțin unuia din următoarele: **tuse, febră, scurtarea respirației** (creșterea frecvenței respiratorii) ȘI fără o altă etiologie care să explice pe deplin tabloul clinic ȘI cu istoric de călătorie internațională (sau reședință într-o locație care raportează transmiterea comunitară a bolii COVID-19), în perioada de **14 zile** anterioare datei debutului

SAU

Pacient cu infecție respiratorie acută ȘI care s-a aflat în contact apropiat cu un caz confirmat cu COVID-19 în perioada de 14 zile anterioare datei debutului

SAU

3) Pacient cu pneumonie fără altă etiologie care să explice pe deplin tabloul clinic

*ATENȚIE: Din cauza riscului crescut de expunere la aerosoli trebuie aplicate măsuri stricte de prevenire și control a infecției

Comisia de Microbiologie Medicală a Ministerului Sănătății **Comisia de Microbiologie Medicală a Colegiului Medicilor din România**

SAU

4) Pacient cu infecție respiratorie acută severă (SARI) (febră sau istoric de febră ȘI tuse ȘI scurtarea respirației (creșterea frecvenței respiratorii) ȘI care necesită spitalizare peste noapte)) ȘI fără altă etiologie care să explice pe deplin tabloul clinic

Caz confirmat

O persoană cu confirmare de laborator a infecției cu COVID-19, indiferent de semnele și simptomele clinice.

Confirmarea de laborator

Testarea se face DOAR la recomandarea medicului, atât în sistemul public cât și în cel privat de sănătate

Recoltarea probelor*

Recoltarea produselor patologice trebuie realizată imediat în cazul unei persoane ce întrunește criteriile unui caz suspect de infecție cu SARS-CoV-2. Exsudatul nazofaringian este produsul patologic optim pentru diagnostic.

Produsele patologice pot fi recoltate, conform recomandărilor OMS și CDC, de la nivelul:

- **tractului respirator superior** (exsudat nazal, exsudat faringian), în cazurile ușoare sau asimptomatice. Pentru recoltare se recomandă utilizarea unui tampon din fibre sintetice cu tija de plastic, deoarece alte modele de recoltare pot genera rezultate fals negative. În cazul în care se recoltează atât exsudat nazal cât și faringian, se recomandă plasarea celor două tampoane în același tub steril, în 2-3 ml de mediu de transport pentru virusuri (VTM). În cazul în care se poate exista un singur tampon se recomandă recoltarea exudatului nazal.
- **tractului respirator inferior**: sputa (pentru pacienții cu tuse productivă, inducerea sputei nu este recomandată) și/sau aspirat endo-traheal sau lavaj bronhoalveolar pentru pacienții cu infecție respiratorie severă. Sputa conține material mucoïd sau mucopurulent ce poate perturba eficiența testelor de detecție a acidului nucleic viral, de aceea fiind necesară lichefierea prealabilă a acestui produs patologic cu ditiotreititol (DTT).

SARS-CoV-2 a fost de asemenea detectat în materii fecale și în sânge, dar nu și în urină. Un raport din China semnalează detecția acidului nucleic viral la 4 donatori asimptomatici în momentul donării, dar nu se cunoaște dacă aceasta indică prezența virusului infecțios și capacitatea de transmitere prin sânge. Probele pereche de ser (faza acută și faza de coalescență) pot fi utile pentru diagnosticul retrospectiv al infecției cu SARS-CoV 2.

Stocarea probelor

*ATENȚIE: Din cauza riscului crescut de expunere la aerosoli trebuie aplicate măsuri stricte de prevenire și control a infecției

Comisia de Microbiologie Medicală a Ministerului Sănătății Comisia de Microbiologie Medicală a Colegiului Medicilor din România

Probele pot fi stocate la 2-8°C pentru 72 de ore. În cazul în care există întârzieri în testarea produsului patologic, se recomandă congelarea la -20°C sau ideal la -70°C.

Transportul probelor*

Probele pentru diagnosticul SARS-CoV 2 trebuie transportate la laboratorul de diagnostic cât mai rapid posibil din momentul recoltării. Transportul se realizează optim la 2-8°C (pe gheață dacă durata de transport este mare), în mediu de transport pentru virusuri (dacă acesta lipsește se poate transporta în E-MEM (Eagle Minimum Essential Medium), în tampon fosfat salin sau ser fiziologic). Mediul de transport viral poate fi preparat in house, folosind rețetele :

OMS - <https://www.who.int/ihr/publications/Annex8.pdf?ua=1>

CDC - <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/Viral-Transport-Medium.pdf> , cu mediu HBSS cu 2% ser fetal de vițel, antibiotic și antifungice. În cazul mediilor care permit menținerea la temperatura camerei până la 24 de ore, se vor respecta recomandările producătorului.

Diagnosticul de laborator*

Condiții de biosiguranță

Testarea produselor patologice recoltate de la o persoană ce întrunește criteriile unui caz suspect de infecție cu SARS-CoV-2 trebuie realizată în laboratoare cu nivel de biosiguranță nivel 2 (BSL-2), de către un personal calificat și antrenat conform procedurilor de biosiguranță și normelor de bună practică microbiologică, inclusiv în domeniul diagnosticului molecular.

Izolarea virală pe culturi de celule necesită un laborator de biosiguranță nivel 3 (BSL-3) și nu este recomandată în prezent în scop diagnostic.

1. Teste pentru detecția acidului nucleic viral

Metoda recomandată în prezent pentru diagnosticarea infecției cu SARS-CoV-2 este detecția ARN viral prin Real-Time RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction).

În cazul în care este necesar, confirmarea se realizează prin secvențiere nucleotidică. Au fost dezvoltate o serie de teste *in-house*** sau teste comerciale pentru detectarea ARN SARS-CoV-2, care identifică genele virale pentru N (nucleocapsida), E (anvelopa), S (spike) și RdRP (RNA-dependent RNA polymerase).

***Testele in-house trebuie să corespundă protocoalelor acceptate de OMS și să fie validate prin utilizarea de materiale de referință și/sau comparații interlaboratoare*

*ATENȚIE: Din cauza riscului crescut de expunere la aerosoli trebuie aplicate măsuri stricte de prevenire și control a infecției

Comisia de Microbiologie Medicală a Ministerului Sănătății Comisia de Microbiologie Medicală a Colegiului Medicilor din România

Lista producătorilor autorizați de FDA se regăsește la <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization#2019-ncov>

În zonele în care virusul SARS-CoV-2 este răspândit pe scară largă trebuie adoptat un algoritm de diagnostic simplu în care, de exemplu, examinarea prin RT-PCR a unei singure ținte este considerată suficientă. În special în acest caz este recomandată utilizarea de teste validate pentru diagnostic in vitro (CE IVD).

Este important de precizat că unul sau mai multe rezultate negative la testul de detecție a acidului nucleic viral **nu exclud posibilitatea unei infecții cu virusul SARS-CoV-2**, iar în context clinic sugestiv diagnosticul nu trebuie infirmat pe baza unui test negativ.

O serie de factori pot duce la un rezultat negativ la o persoană infectată:

- calitatea slabă a produsului recoltat, care conține puține material provenind de la pacient;
- produsul a fost colectat târziu sau foarte devreme în cadrul infecției;
- produsul nu a fost manipulat și expedit în mod corespunzător;
- motive tehnice legate de test, de exemplu mutația virusului sau inhibarea PCR.

Dacă se obține un rezultat negativ la un pacient cu un indice ridicat de suspiciune pentru infecția cu virusul SARS-CoV-2, în special atunci când au fost colectate numai probe ale tractului respirator superior, ar trebui să fie colectate și testate, dacă este posibil produse suplimentare, inclusiv din tractul respirator inferior.

2. Alte variante de diagnostic care identifică acizi nucleici sau antigene virale

- Testele rapide de detecție a acidului nucleic viral (Abbott ID Now, Cepheid G Xpert®Xpress pt SARS-CoV-2) sunt deja o alternativă simplă și eficientă pentru *point of care*, fără personal cu expertiză înaltă care pot fi foarte utile pentru diagnosticul rapid al personalului medical sau pacienților simptomatici. Ele sunt recomandate în pentru situații de urgență (ATI) și locuri în care lipsește personalul cu experiența în diagnostic molecular.
- Noi teste de detecție a acidului nucleic viral bazate pe tehnologia CRISPR-Cas12/13 sunt în curs de evaluare.
- Testele actuale de detecție a antigenelor virale pot fi relevante numai în context clinic sugestiv, datorită sensibilității/specificității variabile și valorii predictive negative scăzute (circa o treime din probele negative apar pozitive la testare). De aceea acestea nu sunt recomandate pentru screening, iar probele pozitive trebuie confirmate prin RT-PCR.

Organizația non-guvernamentală FIND (<https://www.finddx.org/covid-19/>) enumeră 10 teste rapide de detecție a antigenului SARS-CoV-2, cu marcaj CE (conforme cu legislația UE relevantă, Directiva 98/79/CE privind IVD-urile). Conform ECDC, din datele provenite de la autoritățile competente din 18 țări europene, **numai trei** astfel de teste sunt disponibile pe piața

*ATENȚIE: Din cauza riscului crescut de expunere la aerosoli trebuie aplicate măsuri stricte de prevenire și control a infecției

Comisia de Microbiologie Medicală a Ministerului Sănătății **Comisia de Microbiologie Medicală a Colegiului Medicilor din România**

UE începând cu 26 martie 2020. (An overview of the rapid test situation for COVID-19 diagnosis in the EU/EEA. 1 April 2020. Stockholm: ECDC; 2020)

3. Secvențierea virală

Secvențierea virală poate fi utilizată situații rare în care este necesară pentru confirmarea rezultatelor testelor de detecție a acidului nucleic viral. Secvențierea întregului genom (whole genome și whole exome sequencing) poate furniza informații importante pentru studiile epidemiologice și va aduce date valoroase despre tulpinile circulante și variabilitatea virală. Prima secvență a genomului viral SARS-CoV-2 a fost publicată online pe 10 ianuarie 2020 (virological.org; Wuhan-Hu-1, GenBank accession number MN908947), urmată de alte 4 secvențe virale depozitate în baza de date Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID (<https://www.gisaid.org>)). Sunt disponibile în prezent numeroase baze de date pentru submiterea secvențelor virale, inclusiv baza de date GISAID.

4. Izolarea virală pe culturi de celule nu este recomandată pentru diagnosticul de rutină.

5. Diagnosticul serologic

Testele serologice evidențiază anticorpii specifici SARS-CoV-2 de tip IgM și IgG. Prezența anticorpilor specifici de tip IgM sau titrul de anticorpi specifici tip IgG din faza de coalescență de ≥ 4 ori mai mare comparativ cu titrul identificat în faza acută pot fi utilizate drept criteriu de diagnostic pentru pacienții suspecți de infecție SARS-CoV-2 cu rezultate negative la testele de detecție a acizilor nucleici virali.

Detecția anticorpilor specifici anti SARS CoV2 de tip IgM (suportul răspunsului imun primar) va permite evidențierea infecțiilor acute, însă cu un interval timp de latență (minim 7 zile post-infecție), față de detecția acidului nucleic viral. Înlocuirea testelor de diagnostic molecular cu teste rapide de detecție a anticorpilor nu este recomandată, deoarece un test negativ poate induce o falsă senzație de siguranță la pacienți infectați datorită apariției tardive a seroconversiei. De asemenea, testele pozitive care indică prezența IgM ar trebui confirmate cu testele de RT-PCR; un test IgM pozitiv poate apărea și la persoane vindecate, ceea ce limitează foarte mult utilitatea acestei metode pentru diagnosticul infecției și limitarea transmiterii.

Testele serologice trebuie realizate numai cu teste validate, cu sensibilitate și specificitate foarte ridicată, care să limiteze rezultatele fals negative și fals pozitive. Testele serologice vor avea relevanță în special post-epidemic pentru evaluarea seroprevalenței infecției în populația generală (IgG) și a infecțiilor asimptomatice, ca și pentru evaluarea persistenței imunității post-infecție naturală. În context pandemic, testele serologice s-ar putea utiliza la externarea pacienților considerați vindecați, eventual după autoizolare/carantinare, în paralel cu testele de detecție ale ARN viral, testare care ar completa profilul epidemiologic, detectând seroconversia în paralel cu clearance-ul viral.

Toate cazurile aflate în investigație și cazurile confirmate trebuie raportate în conformitate cu reglementările stabilite de autoritățile locale de sănătate și de centrul național de supraveghere.

***ATENȚIE:** Din cauza riscului crescut de expunere la aerosoli trebuie aplicate măsuri stricte de prevenire și control a infecției

**Comisia de Microbiologie Medicală a Ministerului Sănătății
Comisia de Microbiologie Medicală a Colegiului Medicilor din România**

Ghiduri, protocoale, cursuri adoptate la nivel internațional

Testarea de laborator pentru infecția cu noul coronavirus 2019 (SARS-2)

<https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>

Strategii de testare de laborator în infecția COVID-19

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331509/WHO-COVID-19-lab_testing-2020.1-eng.pdf

Protocolul pentru investigarea seroepidemiologică a infecției COVID19

<https://www.who.int/publications-detail/population-based-age-stratified-seroepidemiological-investigation-protocol-for-covid-19-virus-infection>

Prevenirea și controlul infecției pentru personalul medical – curs interactiv

<https://openwho.org/courses/COVID-19-IPC-EN>

Recomandări de bază privind biosiguranța în laboratorul de microbiologie (după OMS)

<http://www.cnscbt.ro/index.php/lex/1611-recomandari-privind-biosiguranta-in-laboratorul-clinic-de-microbiologie-1/file>

Virusuri respiratorii emergente, inclusiv COVID-19: metode de detecție, prevenire, răspuns și control – curs

<https://openwho.org/courses/introduction-to-ncov>

Intervenții de sănătate publică în pandemie și epidemie - curs

<https://openwho.org/courses/public-health-interventions>

Apa, sanitația, igiena și managementul deșeurilor în infecția COVID-19

<https://www.who.int/publications-detail/water-sanitation-hygiene-and-waste-management-for-covid-19>

Utilizarea rațională a Echipamentului Individual de Protecție (EIP) pentru COVID-19

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331498/WHO-2019-nCoV-IPCPPE_use-2020.2-eng.pdf

*ATENȚIE: Din cauza riscului crescut de expunere la aerosoli trebuie aplicate măsuri stricte de prevenire și control a infecției