

VALUTAZIONE DI UN PROTOCOLLO RAPIDO EXTRACTION-FREE PER LA DIAGNOSTICA MOLECOLARE DI SARS-COV-2 E PATOGENI RESPIRATORIE VIRALI

E. Mandalà¹, C. Amato¹, W. Razete¹, N. Spuria¹, G. D'Alessandro¹, S. De Grazia¹, S. Russo¹, G.M. Giammanco¹

¹U.O.C. Microbiologia e Virologia, A.O.U.P. "Paolo Giaccone", Palermo, Italy

BACKGROUND-AIM

I protocolli per diagnostica molecolare convenzionali prevedono processi di estrazione e purificazione degli acidi nucleici che allungano i tempi di lavorazione (TAT). Seegene con il kit Allplex SARS-CoV-2 (SC2) Assay propone un protocollo extraction-free (EFPS) che sostituisce le fasi di estrazione con delle fasi di diluizione e termolisi cellulare. In questo lavoro proponiamo un protocollo extraction-free modificato (EFPM) per il kit Allplex SC2 Assay di Seegene volto a ridurre ulteriormente il TAT, saltando la fase di termolisi e amplificando direttamente la matrice diluita. L'EFPM è stato applicato anche ai kit Seegene per la ricerca di Virus influenzale A (FluA) e Rhinovirus (HRV).

METHODS

Al fine di testare la sensibilità dell'EFPM sono stati selezionati 118 tamponi nasofaringei già risultati positivi per SC2 con metodo convenzionale (CEP) e conservati a -80°C. Tutti i campioni sono stati saggiati con i due protocolli extraction-free: EFPS e EFPM. Dopo una diluizione 1:4 in 45ul di acqua RNAsi-free, la metodica EFPS prevede la lisi termica del campione a 98°C (3 min + 5 min di raffreddamento a 4°C), passaggio che viene saltato nel protocollo modificato EFPM, che prevede la sola diluizione del campione prima dell'amplificazione con il kit SeeGene Allplex Sars-CoV-2 assay, in grado individuare 4 geni target (E,N e S/RdRp). Il metodo EFPM è stato saggiato anche su 10 campioni positivi per FluA e 10 campioni positivi per HRV ed amplificati con i kit per la ricerca di virus respiratori di Seegene.

RESULTS

Tra i 118 campioni rilevati come positivi per SC2 dal CEP, EFPS ed EFPM hanno identificato rispettivamente 86 (72,9%) e 90 (76,3%) infezioni da SC2. Pertanto, EFPS ha prodotto 16 (13,5%) falsi negativi, mentre EFPM ha prodotto 12 (10,2%) falsi negativi, i restanti campioni non hanno riscontrato positività a tutti i geni target e sono dichiarati presunti positivi. Tuttavia, tutti i campioni falsi negativi o presunti positivi prodotti dai protocolli EF corrispondevano a campioni che originariamente mostravano un Ct>35 con CEP. In media, i protocolli EFPS ed EFPM hanno mostrato un ritardo rispettivamente di 3 e 2 Ct rispetto alla metodica CEP. Infine, rispetto ai virus respiratori EFPM ha prodotto una concordanza del 80% per FluA e del 70% per HRV rispetto al metodo d'estrazione convenzionale, anche in questo caso i falsi negativi sono dei campioni con Ct>35 con metodica convenzionale.

CONCLUSIONS

Considerando che i campioni falsi negativi ottenuti con i metodi EF per SC2 avevano tutti un Ct>35 con il CEP, espressione di una carica virale molto bassa, la perdita di sensibilità dei metodi EF non appare critica, specialmente per EFPM, e potrebbe anche tradursi in una migliore gestione del paziente in termini di isolamento, dimissioni e ricoveri. Per quanto ridotta, la coorte dei test per i virus respiratori mostra analoghi promettenti risultati. Pertanto, i metodi EF possono rappresentare una valida alternativa per la diagnostica molecolare rapida.