

Raccomandazione sulla procedura per la qualifica del test NAT DENV per lo screening delle donazioni in corso di emergenza epidemiologica

Elaborato prodotto dal Tavolo tecnico “ad hoc” coordinato dal Centro Nazionale Sangue e composto da:

Maria Bortolati (AULSS 8 Veneto)

Giuseppina Cappiello (Ospedale Sandro Pertini, ASL Roma 2)

Rosa Chianese (SRC Lombardia, Coordinatore)

Francesco Fiorin (SIMT Vicenza, Direttore)

Stefania Iovino (Ospedale Sandro Pertini, ASL Roma 2)

Alessandra Livraghi (Policlinico S. Matteo Pavia)

Ilaria Pati (CNS)

Giulio Pisani (Centro nazionale per il controllo e la valutazione dei farmaci, Direttore)

Simonetta Pupella (CNS)

Vanda Randi (SRC Emilia Romagna, Coordinatore)

Deborah Ruggeri (AUSL Bologna)

Stefania Vaglio (SRC Lazio, Coordinatore)

Giulietta Venturi (Laboratorio di riferimento Nazionale per gli Arbovirus, ISS)

Rev. 0 – Agosto 2023



Centro Nazionale Sangue

Via Giano della Bella, 27 - 00162 Roma
Tel: +39 06 4990 4953 / 4963
Email: segreteria generale.cns@iss.it

Premessa

A seguito della segnalazione, in data 18 e 20 agosto 2023, rispettivamente dalla Regione Lombardia e dalla Regione Lazio, di due casi confermati di Dengue non correlati a viaggi in aree endemiche per l'infezione, il Centro Nazionale Sangue ha attivato i provvedimenti necessari per la prevenzione della trasmissione dalle donazioni di sangue ed emocomponenti da donatori potenzialmente viremici asintomatici: sospensione temporanea dei donatori che risiedono o hanno soggiornato, anche per poche ore, nelle aree affette o, in alternativa, l'esecuzione del test di screening DENV NAT.

Attualmente per lo screening delle donazioni di sangue sono disponibili commercialmente due test NAT a marcatura CE IVD: 1) metodo real time PCR – kit cobas® CHIKV/DENV (Roche), su piattaforma cobas® 6800/8800, e 2) metodo TMA - Procleix Dengue Virus Assay (Grifols), su strumento Procleix Panther System. I due metodi sono stati convalidati dai rispettivi produttori che, in assenza di un materiale standard universalmente condiviso, hanno impiegato diverse preparazioni generando in questo modo valori di sensibilità analitica non raffrontabili:

- Roche: per i 4 sierotipi intorno a 1 UI/mL (0.6 UI/mL per il DENV-1) riconducibile al 1° pannello di riferimento internazionale per il virus Dengue tipo 1-4 (USA CBER) ottenuto da uno studio collaborativo.
- Grifols: per i 4 sierotipi intorno a 19-29 cp/mL (21 cp/mL per il DENV-1) riconducibile a trascritti sintetizzati in vitro della Dengue.

Il presente documento ha come finalità la definizione di una procedura standard per la qualifica del test NAT DENV per lo screening delle donazioni in situazioni emergenziali, con l'obiettivo di garantire l'affidabilità delle sedute analitiche e l'accuratezza del metodo, nelle more della produzione di una preparazione di riferimento "nazionale" per l'esecuzione delle prove di convalida, secondo quanto definito dalle Linee Guida CNS¹.

Al fine di garantire la continuità delle attività di raccolta, nelle more di una tempestiva implementazione del test laddove si renda necessario procedere con lo screening delle donazioni, si indica la possibilità di quarantenare le unità raccolte da donatori con fattori anamnestici di rischio per DENV.

Considerato il carattere emergenziale dell'introduzione del test e la tipologia dei Kit commerciali utilizzati (entrambi marcati CE-IVD), il presente protocollo potrà essere eseguito in parallelo alle sedute analitiche NAT per lo screening DENV dei donatori.

Protocollo per la qualifica del test NAT DENV

Materiali

Campioni DENV positivi

La qualifica del metodo deve essere fatta utilizzando campioni di siero o di plasma di pazienti risultati viremici e possibilmente caratterizzati (risposta immunitaria IgM/IgG, sierotipo e carica virale); i campioni potranno essere analizzati non diluiti. In caso di alte cariche virali è possibile analizzare gli stessi campioni pre-diluiti in plasma (es. 1:10, 1:100 ecc), aliquotati e conservati a temperatura inferiore a -70°C o in ghiaccio prima dell'esecuzione del saggio.

In alternativa, possono essere impiegati campioni di plasma opportunamente contaminati da virus DENV isolato su colture cellulari. In questo caso il sopranatante dovrà essere sottoposto ad inattivazione virale (es. calore) ed opportunamente diluito in plasma fino ad avere una concentrazione di genomi virali tali da dare una risposta positiva alla real-time PCR con valori di ciclo-soglia (Ct) di circa 30 – 33 cicli. I campioni così

¹ Centro nazionale sangue. Guida alle attività di convalida dei processi nei Servizi Trasfusionali e nelle Unità di Raccolta del sangue e degli emocomponenti. Seconda edizione, luglio 2021.

ottenuti potranno essere aliquotati e conservati a temperatura inferiore a -70°C.

Nella prima fase di qualifica, è sufficiente analizzare campioni di DENV sierotipo 1, quello attualmente isolato nei casi umani autoctoni.

In un secondo tempo la qualifica potrà essere estesa anche agli altri sierotipi di DENV se disponibili.

Campioni DENV negativi

Campioni di plasma ottenuto da donatori non correlabili alle aree affette.

Nota bene: la preparazione dei campioni negativi e positivi dovrà avvenire in aree separate. Gli operatori dovranno utilizzare i dispositivi di sicurezza previsti per la manipolazione di campioni infetti.

ESECUZIONE

Accuratezza diagnostica: sensibilità e specificità diagnostica

Analizzare (anche in sessioni diverse, giorni diversi) un totale di 10 campioni DENV positivi e 10 campioni DENV negativi (il numero dei campioni può essere ridotto a 5 positivi in caso di ridotta disponibilità).

Se si analizzano più campioni positivi e negativi nella stessa seduta analitica, alternare i campioni in modo tale da avere i campioni positivi separati fra loro dai campioni negativi.

Sensibilità analitica

Questo parametro, espresso come Limit of Detection al 95%, può essere valutato utilizzando un campione DENV-1 RNA positivo ben caratterizzato per quanto riguarda la carica virale (es. Preparazione di Riferimento). Preparare una serie di diluizioni logaritmiche (1:10) della Preparazione di Riferimento. Ogni diluizione andrà analizzata almeno in triplicato.

Identificare l'ultima diluizione (end-point) che fornisce il 100% di risposta positiva (le tre repliche risultano reattive alla NAT).

Eeguire ulteriori prove diluendo la Preparazione di Riferimento intorno al valore di end-point trovato.

Organizzare le sedute analitiche in modo tale da analizzare 4 o 6 repliche di ciascuna diluizione in giorni diversi. Ottenere almeno 24 risultati per ogni diluizione analizzata e procedere con analisi statistica (es. analisi dei probit) per definire il LoD al 95% (ove necessario, l'ISS fornirà supporto per l'analisi statistica).

Ripetibilità del test NAT

Questa informazione si potrà ricavare dai risultati ottenuti nel corso della sensibilità analitica.

Cross-contaminazione

Per valutare l'assenza di contaminazione crociata del test NAT, predisporre un pannello di almeno 10 campioni costituito da 5 campioni DENV positivi ad alto titolo alternati a 5 campioni DENV negativi.