

Prot. U035-2020

Milano, 31 marzo 2020

SARS CoV2: la diagnosi sierologica La posizione di AMCLI

Premessa

La recente rapida diffusione dell'epidemia di COVID-19 (Coronavirus Infectious Disease-2019) ha determinato la crescente richiesta di diagnosi (e di diagnosi rapida) di infezione da virus SARS-CoV2.

L'*World Health Organization* (WHO) ha diffuso, lo scorso 22 marzo, l'*interim guidance "Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19"*. Questo documento compendia lo stato-dell'arte valido, a quella data, in tema di strategie diagnostiche.

Pragmaticamente, riconosce – tra l'altro – che l'efficacia diagnostica dei *test* è fortemente minacciata da criticità di tipo organizzativo (carichi di lavoro eccessivi; carenza di personale; carenze manutentive degli analizzatori; impossibilità di conservare i campioni in fase pre-analitica). Più serie sono, però, le conseguenze che si verificano - in due specifiche circostanze - sull'efficacia "pratica" delle informazioni che dai *test* derivano: se i risultati dei *test* sono rilasciati oltre le 48 ore dal prelievo, e se la richiesta di reagenti da parte dei laboratori eccede la disponibilità dei fornitori ad evaderne le richieste. Tali aspetti sono fortemente connessi, e dipendono dalla continua evoluzione della situazione epidemiologica che COVID-19 comporta: essi sono verosimilmente in aggravamento, stante il massivo diffondere del virus a livello pandemico.

Il documento tratteggia quattro diverse opzioni strategiche in funzione dell'intensità e della diffusione virale, del numero di casi clinicamente individuati e delle capacità della rete dei laboratori presenti sul territorio, distinguendo quattro scenari: 1. assenza di casi; 2. casi sporadici; 3. *cluster* di casi; 4. trasmissione comunitaria. Specifica, inoltre, che la fluidità della situazione epidemiologica può rapidamente determinare il passaggio da un livello all'altro anche per l'approccio diagnostico, e raccomanda che differenti strategie nell'operatività diagnostica siano adottate - anche all'interno di uno stesso Paese – in ragione dello scenario di volta in volta localmente registrato.

Il documento conferma che la diagnostica molecolare è l'unico metodo, al momento, raccomandato per l'identificazione dei casi infettivi. Conferma inoltre che i *test* sierologici (per la rilevazione anticorpale o antigenica) saranno destinati a rivestire un ruolo importante nella ricerca e nella sorveglianza ma che non sono, ad oggi, affatto raccomandati per l'individuazione dei casi.

L'offerta di test sierologici

I *test* sierologici sono comunemente indirizzati alla ricerca di anticorpi generati in risposta ad un'infezione. In questo senso, il modello dell'approccio sierologico per il riscontro – indiretto - di infezione da SARS CoV-2 non differisce da quello descritto per altre infezioni virali.

La risposta sierologica (umorale) è caratterizzata da una fase precoce e solitamente limitata nel tempo (IgM) e da una fase più tardiva e solitamente stabile nel tempo (IgG). Ancora più incerto è il ruolo di anticorpi di classe IgA. In tutti i casi, il significato del riscontro di anticorpi delle diverse classi immunoglobuliniche (M, G ed A) dipende dalla cinetica anticorpale, dalla durata della presenza degli anticorpi nel tempo, e dalla loro immunogenicità. In altre parole, è necessario che vengano date risposte ai quesiti seguenti, riguardanti specificità, sensibilità e affidabilità del metodo:

- Sensibilità
 - i) i *test* che rilevano la presenza di antigeni virali sono in grado di individuare in modo elettivo e sistematico il virus, o possono determinare risultati falsamente negativi?

- Specificità
 - i) esistono *cross*-reazioni con altri Coronavirus, responsabili di patologie diffuse e benigne, tali da determinare risultati falsamente-positivi?
- Affidabilità
 - i) a che distanza dalla comparsa dei sintomi è possibile identificare IgM nel siero dei pazienti ?
 - ii) per quanto tempo le IgM specifiche perdurano (IgM-positivo significa infezione recente o passata)?;
 - iii) quando compaiono le IgG specifiche dopo la comparsa dei sintomi e a che distanza dalla scomparsa delle IgM (sieroconversione)?;
 - iv) per quanto tempo le IgG specifiche perdurano nel tempo?;
 - v) la presenza di IgM o IgG specifiche è sinonimo di protezione (attività neutralizzante)?

Pare evidente che le risposte a tali quesiti non sono affatto di poco conto: il loro chiarimento serve a non fraintenderne il risultato, a condizione di rispondere correttamente ai quesiti diagnostici: la persona che ho davanti ha o non ha il virus SARS CoV-2? oppure ha un altro Coronavirus diverso da SARS CoV-2? è o non è guarita? è o non è in grado di infettare ancora i suoi contatti? E' evidente che non si può correre il rischio di dare risposte errate, non interpretabili o di incerta interpretazione. D'altra parte i *test* di laboratorio che si utilizzano per la diagnosi di tutte le malattie infettive sanno rispondere a queste domande, e sono utilizzati solo quando a queste domande sanno effettivamente dare risposta.

Sono, ad oggi, disponibili *test* che utilizzano, per la rilevazione di anticorpi anti-SARS CoV-2, metodi in chemiluminescenza, in EIA ed in immunocromatografia: i primi due, quantitativi, comportano che siano effettuati in laboratorio; il terzo, qualitativo – definibile “rapido” (tempi di risposta di circa 15 minuti) – potrebbe essere utilizzato anche in situazioni di reale emergenza, al di fuori del laboratorio. Questi ultimi sono però gravati da sensibilità e specificità variabile (in particolare per IgM) e sono assolutamente “operatore-dipendente” nella loro interpretazione, oltre a consentire una gestione assolutamente incontrollata del loro utilizzo se fossero licenziati per un utilizzo anche extra-ospedaliero.

Il censimento dei *test* sierologici disponibili sul mercato mondiale annovera prodotti di più di 100 aziende, di molte delle quali è difficile, tuttavia, identificare produttore e distributore. Di questi, i prodotti di cui è autocertificata la marcatura CE – e che, pertanto, sarebbero utilizzabili per prove che comportano la refertazione dell'esito - costituiscono l'80% del totale.

Le conoscenze attuali – fatti salvi alcune casistiche assai limitate e alcuni *case report*, certamente interessanti ma ancora solo aneddotici – confermano che la cinetica anticorpale del virus SARS CoV-2 è sconosciuta, sia in fase iniziale di COVID-19, sia in fase conclamata sia, da ultimo, dopo la risoluzione clinica della malattia. Alcuni dati preliminari indicano che la comparsa degli anticorpi (IgM, IgG ed IgA) si sviluppa dopo diversi giorni dall'infezione (7-14, mediamente 10, tanto che sembrerebbe che solo il 20% dei soggetti malati presenti anticorpi dopo 4 giorni), che la positività non è rilevabile in tutti i pazienti ricoverati e che i dati (ancora pochi) nei pazienti clinicamente guariti non sono interpretabili.

D'altra parte, dati di sieroprevalenza effettuati nei confronti del virus SARS hanno confermato la positività per IgG specifiche per un tempo limitato (2 anni), cui ha fatto seguito – a far corso dal terzo anno – dalla negativizzazione, lasciando immaginare la possibilità di reinfezioni dopo tale periodo dall'esposizione.

D'altra parte, non sono neppure note le *performance* analitiche dei singoli *kit* diagnostici disponibili in commercio, la cui variabilità è verosimilmente estesa e comunque, certamente, da valutare.

Conclusioni

Se i metodi biomolecolari si confermano ancora oggi fondamentali quali *test* diagnostici (meno per finalità epidemiologiche), quelli sierologici potranno essere utilizzati massimamente per valutazioni di sieroprevalenza (per le quali le tecnologie biomolecolari non risultano appropriate) e meno – se non in associazione sulla base di precisi e rigorosi algoritmi diagnostici – a fini clinici.

In tutto il mondo si considera la “sierologia” come una speranza. Dal punto di vista tecnico è una sfida. Dal punto di vista diagnostico è, certamente, una necessità. Non si può, tuttavia, correre quel rischio che perfino la grande stampa “laica” spagnola ha riportato: l’assoluta inaffidabilità di *kit* presentati come affidabili, utilizzati ma non credibili. Vale, anche per SARS CoV-2 il detto “*Primum non nocere*”: vale per i clinici, vale anche per i microbiologi.

In conclusione è possibile rilevare che: 1. le conoscenze attuali sono modeste, spesso aneddotiche ed i dati sono non conclusivi su: tecnica di rilevazione, cinetica anticorpale, predittività diagnostica e prognostica, ...; 2. i dati di sensibilità analitica sono modesti (60% in soggetti certamente affetti da COVID 19 perché sintomatici e positivi al *test* biomolecolare); 3. i risultati sono per lo più difficilmente valutabili per la mancanza, spesso dichiarata, dei *test* di neutralizzazione; 4. l’impatto diagnostico è modestissimo se non fuorviante se è vero che i falsi negativi – con taluni *kit* – raggiunge la quota dell’80%; 5. la pressione (e l’interesse) per pervenire a dati che consentano strategie non solo basate sulla tecnologia biomolecolare è massima, a tutti i livelli; 6. è prevedibile la finitezza delle risorse diagnostiche in biologia molecolare in considerazione del cambiamento di scenario a livello mondiale come descritto da WHO nel documento del 22 marzo.

Date le premesse di cui sopra e l’atteggiamento che sempre deve contraddistinguere l’approccio scientifico, è necessario che i microbiologi si facciano carico di una valutazione di merito sulle nuove metodiche, suggerendo nel contempo il migliore utilizzo (diagnostico, analisi di popolazione, epidemiologico, di primo livello o conferma) nella pratica clinica anche proponendo, alla fine, ragionevoli algoritmi di utilizzo, anche combinato.

Fino alla disponibilità di dati di letteratura certi o di risultati consolidati di valutazioni policentriche non si ritiene opportuno procedere con l’introduzione, in algoritmi operativi, dei *test* sierologici né per la definizione eziologica di infezione né per valutazioni epidemiologiche di sieroprevalenza.

In questo momento di assoluta criticità per il Paese, in cui molteplici sono gli scenari descritti da WHO, AMCLI mette a disposizione tutte le competenze tecniche e scientifiche dei laboratori suoi associati e di chi vi lavora per “mettere insieme” – facendo un “passo indietro” quanto a organismo proponente e coordinatore - dati ed esperienze già acquisiti e collaborare alle proposte multicentriche di studio che organismi nazionali di coordinamento (Istituto Superiore di Sanità? Ministero della Salute? Coordinamento delle Regioni?) o singole Regioni dovessero proporre: sarebbe questa non certo una “fuga in avanti” ma la rappresentazione – al Paese e all’esterno – della condivisione di un progetto scientifico che il mondo istituzionale della Sanità italiana promuove.

Il Presidente
Pierangelo Clerici



Bibliografia essenziale

Chenguang S et al. JAMA. March 27, 2020
Guo L et al. Clin Infect Dis. 2020 Mar 21:ciaa310
Lan L et al. JAMA 27 fev 2020
Li Guo et al. Clin Infect Dis 21 Mars 2020
Li.Ping W et al. Emerging Infectious Diseases 13;: 1562-1564; 2007
Wang Y et al. Cell Mol Immunol. 2004 Aug;1(4):304-307
WHO reference number: WHO/COVID-19/lab_testing/2020.1
Zhengtu Li et al. J Med Virol 27 fev 2020