

Documento SIPMeL sulla Diagnostica dell'Infezione da COVID-19

La pandemia da Coronavirus (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2) in Italia sta raggiungendo una fase di *steady state*, che presumibilmente condurrà ad una fase di declino della stessa con un ritorno parziale, frammentato e prolungato alle normali attività sociali interrotte in via precauzionale [1]. La Medicina di Laboratorio ha un ruolo decisivo nella ricerca e nella diagnostica di COVID-19 [2]. Il Laboratorio, infatti, è essenziale per la diagnosi, la diagnosi differenziale, la valutazione del decorso della malattia e del suo superamento [3]. Secondo le conoscenze basilari della Medicina, la diagnosi di laboratorio di una malattia infettiva poggia su una diagnosi diretta dell'agente infettante ed una indiretta della reazione dell'ospite nei confronti dello stesso.

La **diagnosi diretta** si attua attraverso la determinazione molecolare dell'agente patogeno raccolto in almeno 2 tamponi naso-faringei, prelevati a distanza di 1-3 giorni, preferendo la metodica (rt)RT-PCR (*real time - Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) per SARS-CoV-2 RNA [4]. Metodi e protocolli sono stati stabiliti dal Ministero della Salute e dal Istituto Superiore di Sanità (ISS)[5], in consonanza con i documenti di WHO [6], ECDC [7] e CDC [8]. Quest'ultimo organismo ha dettagliato gli elementi base per il metodo molecolare, come *primer*, *probe*, materiali, reagenti e metodi. Per quanto riguarda i metodi, CDC fornisce, in collegamento con FIND [9], l'elenco dei metodi validati e, in collegamento con FDA, i metodi ammessi come EUA (*Emergency Use Authorized*) [10]. Gli obiettivi della diagnostica diretta sono la diagnosi di certezza dei sintomatici, la ricerca dei possibili "diffusori" [11] data l'alta prevalenza degli asintomatici (da 50 a 90 % nelle diverse ricerche ed aree geografiche) e per tracciare le rotte del virus. La diagnostica virologica deve tener sempre presenti le possibili altre cause della malattia di origine virale (influenza, virus respiratori sinciziali, ecc.) o meno [12]. La diagnosi finale, comunque, si basa sempre sull'integrazione dei dati e, quindi, sulle capacità cliniche dei medici [13]. Infatti, la diagnostica (rt)RT-PCR è di elevata qualità ma non priva di problematiche, quali la complessità di esecuzione su strumenti dedicati e con elevato TAT (3-5 h) che incide sul percorso del paziente e sulla sicurezza dei sanitari [14], i problemi preanalitici [15] sia generali (manovre di campionamento, tipo di campione, manipolazione sotto cappa *biohazard* BLS 2, operatore con maschera almeno PF2 meglio PF3 e camice chirurgico, trasferimento campioni da cappa a strumento, corretto trattamento e smaltimento dei rifiuti ed altre procedure) che specifici (finestra diagnostica, carica virale, ricombinazione attiva)[16] e i problemi analitici con Falsi Negativi(FN) in pazienti con *imaging* diagnostica [17] e, talora, con Falsi Positivi(FP) [18].

Per rispondere ai limiti di TAT del sistema molecolare di riferimento sono nati sistemi che compattano alcune fasi della PCR ottenendo tempi più rapidi (90 min.) con gli stessi principi tecnici (PCR) e la stessa qualità di performance e che sono stati approvati dagli organismi ad hoc come FDA (esempio Simplexa) [19] oppure sistemi POCT (Rapid diagnostic test-RDT) che ricercano l'Ag basandosi su principi tecnici diversi

(immunocromatografia) e dalle performance analitiche inferiori (80-90% di accuratezza, secondo il campione prelevato). Un elenco è presente in FIND [9], ma solo taluni sono certificati da FDA. Rispetto a questi sistemi va posta grande attenzione alla scelta, in particolare a certificazioni, performance, disponibilità e continuità dei lotti, per evitare situazioni simili a quanto accaduto in Spagna dove un RDT di questo genere, accreditato di un'affidabilità dell'80%, ne ha dimostrata sul campo una del 30%: il prodotto è stato ritirato e sostituito e, in relazione a ciò, la Cina ha introdotto un nuovo livello di controllo delle esportazioni in campo sanitario [20].

Per rispondere ai problemi di FN, relativi in particolare al momento della finestra diagnostica, è stato proposto di integrare la ricerca dell'Ag con quella degli anticorpi, in particolare IgM e IgA [21-23]. Tale opzione è descritta anche da WHO [6]: *Serological surveys can aid investigation of an ongoing outbreak and retrospective assessment of the attack rate or extent of an outbreak. In cases where NAAT assays are negative and there is a strong epidemiological link to COVID-19 infection, paired serum samples (in the acute and convalescent phase) could support diagnosis once validated serology tests are available. Serum samples can be stored for these purposes.*

La **diagnosi indiretta** si basa sulla ricerca degli anticorpi anti SARS-CoV-2 nel plasma/siero/sangue intero di tipo IgM/IgA ed IgG, rivolti verso proteine specifiche del nucleocapside o degli *spike* virali. Ad oggi i meccanismi [24,25] e i tempi della risposta anticorpale sono noti [11,21,23,26-31]. I livelli di sieroconversione sono al 99% con mediana a 15 giorni da esposizione e a 9 giorni da sintomi (come attestato in soggetti asintomatici); i livelli anticorpali aumentano rapidamente dopo 6 giorni, con un gap tra IgM e IgG di pochi giorni. La loro quantificazione, insieme con la sintomatologia, indica la progressione e la guarigione [29]. Non sono ancora chiare la durata della presenza delle IgG (ad oggi sicuramente mesi, non sappiamo se anni) e, in parte, la protezione rispetto a reinfezioni, anche se esistono indicazioni di capacità neutralizzante degli anticorpi nei sieri di convalescenti [32].

E' in atto un dibattito scientifico e politico sull'uso più corretto della diagnostica sierologica, in particolare sul momento più opportuno in cui usarla e cioè nel momento della crescita esponenziale del contagio (come test di screening, con conferma dei positivi con test molecolare, o in fase diagnostica, affiancata alla diagnostica molecolare al fine di raggiungere la migliore accuratezza) e/o nella fase finale per avere un reale quadro di quella che è stata la diffusione del virus e quindi per valutare lo stato di immunizzazione della popolazione. In ogni caso la mappatura dei soggetti che hanno avuto contatto con il virus, molto spesso in modo del tutto asintomatico, e hanno maturato un'immunità (si spera duratura), di quelli che sono ancora infettivi, seppur a/paucisintomatici, e di quelli che sono privi di anticorpi e quindi potenzialmente suscettibili di contagio sarà necessaria per la riammissione alle attività lavorative (a cominciare dalle prime linee, specialmente sanitarie, e via via in cerchi concentrici di necessità pubblica), per isolare nuovi focolai (bastano 4 casi per avere una probabilità di oltre il 50% di una nuova epidemia), per selezionare i primi vaccinandoli (quando un vaccino sarà disponibile) e a scopi epidemiologici indispensabili per una adeguata epicrisi del fenomeno.

Un elemento importante del dibattito è la qualità della performance della ricerca anticorpale. Molti metodi immunometrici sono disponibili, sia “classici” quantitativi (ELISA, CLIA) sia rapidi (15 min.) qualitativi e manuali (RDT) basati sulle tecniche del flusso laterale ed oro colloidale (LFIA) o dell’immunocromatografia a fluorescenza (IFA). La disponibilità di test di questo genere aumenta continuamente per cui non è sempre agevole distinguere qualità ed efficacia clinica. FDA [33] offre un elenco di test, seppur non validati, e Nature [34] una tabulazione con *link* illustrativi. Tuttavia, in letteratura vi sono già valutazioni ben costruite per i test ELISA [21,23,26,27,35], per i test CLIA [29,36-38] e per gli RDT LFIA [14,30] e IFA [30,39,40]. Un dato importante è la mancanza di cross-reattività con i comuni coronavirus (talora con SARS e MERS) [41]. L’insieme dei dati consente di sostenere che i test RDT hanno prestazioni inferiori a quelli quantitativi (sensibilità 89% e specificità 91%)[14]. Anche se di semplice uso i test RDT vanno comunque impiegati da personale addestrato, all’interno di protocolli ospedalieri e/o territoriali codificati, interpretati alla luce delle conoscenze cliniche e di laboratorio. Dati i limiti tecnici e di performance, al fine di evitare false negatività nella popolazione che indurrebbero comportamenti incauti, non vanno utilizzati per *self-testing* (neanche nelle Farmacie) né in Laboratori non inseriti nelle catene ufficiali di controllo della pandemia. Tale indicazione dovrebbe avere valore non solo scientifico ma normativo. I metodi quantitativi (ELISA, CLIA) presentano un’elevata affidabilità (accuratezza e precisione, sensibilità >95% e specificità >99%), la possibilità di quantificare la siero conversione (elemento importante per le valutazioni cliniche ed epidemiologiche) e per l’automazione, in grado di produrre molti dati confrontabili nell’unità di tempo. In ogni caso, anche questi test devono: presentare riconoscimenti formali (marchio CE), prove di affidabilità (accuratezza, precisione, specificità, sensibilità) da rivalutare in fase di acquisizione e sul campo, forniture assicurate ed omogenee, essere eseguiti da personale certificato e interpretati da personale abilitato, ed inseriti nelle procedure di rilevamento e trattamento dei positivi normativamente stabilite. Numerose iniziative in tema, con lo scopo di valutare i test e poi di stratificare i pazienti e la popolazione, sono già in essere in molte Regioni (Veneto, Toscana, Puglia, ecc.) ed Aziende Sanitarie (Niguarda, Modena, Ancona, che stanno eseguendo la sierologia con test in chemiluminescenza per IgG e IgM sulla popolazione degli operatori sanitari, ecc.) ma con metodi e, talora, finalità diverse. Senza nulla togliere a tali sperimentazioni, che sono essenziali per l’immediato futuro, sarebbe opportuna la creazione di una rete nazionale, collaborativa e coordinata, per mettere a sistema i risultati, renderli confrontabili ed omogenei nell’utilizzo, e indicare una via nazionale di *exit-strategy*, tenuto conto anche che la stratificazione della popolazione richiederà molto probabilmente ripetute campionature.

Per quanto riguarda la fattibilità, la rapidità con cui i Laboratori italiani si sono riorganizzati per la diagnostica di COVID-19 attesta la potenza di fuoco del sistema e della Medicina di Laboratorio italiana. In relazione ai costi, esistono peraltro dati di letteratura (su metodi molecolari) che mostrano il vantaggio, anche economico, di testare la popolazione [42].

In ultimo non si può non evidenziare come in questa occasione si siano manifestati e continuino a manifestarsi i problemi legati alla “regionalizzazione della Sanità” sia per quanto è accaduto nelle fasi iniziali della gestione della pandemia, sia attualmente, per quanto concerne la scelta e l’utilizzo dei test diagnostici, per le quali si rimanda alla rete collaborativa e coordinata di cui sopra.

Castelfranco Veneto (TV), 19 aprile 2020

Bibliografia

1. Istituto Superiore di Sanità. Epidemia Covid-19. Aggiornamento nazionale 30 marzo 2020 [Internet]. Disponibile alla pagina: https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/bollettino/Bollettino-sorveglianza-integrata-COVID-19_30-marzo-2020.pdf [citato 5 aprile 2020].
2. Villalta D, Cappelletti P. Il Covid-19 e noi. Riv Ital Med Lab 2020 Mar 25. Online first.
3. Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. Clin Chem Lab Med 2020 Mar 19. Online first.
4. Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory Diagnosis of Emerging Human Coronavirus Infections-The State of the Art. Emerg Microbes Infect 2020;9:747-56.
5. Ministero della Salute. Nuovo Coronavirus [Internet]. Disponibile alla pagina: <http://www.salute.gov.it/portale/nuovocoronavirus/archivioNormativaNuovoCoronavirus.jsp> [citato 5 aprile 2020].
6. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [citato 5 aprile 2020].
7. ECDC (European Center for Disease Prevention and Control). Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update. Pag. 15 [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf> [citato 5 aprile 2020].
8. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). CDC Diagnostic Test for COVID-19 [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/testing.html> [citato 5 aprile 2020].
9. FIND. SARS-COV-2 diagnostic pipeline [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/> [citato 5 aprile 2020].

10. FDA (Food and Drug Administration) EUA (Emergency Use Authorization) [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorizations> [citato 5 aprile 2020].
11. Rothe C, Schunk M, Sothmann P, Bretzel G, Froeschl G, Wallrauch C, *et al.* Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *N Engl J Med.* 2020;382:970-1.
12. Bajema KL, Oster AM, McGovern OL, Lindstrom S, Stenger MR, Anderson TC, *et al.*; 2019-CoV Persons Under Investigation Team. Persons Evaluated for 2019 Novel Coronavirus - United States, January 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020; 69:166-70.
13. Wang Y, Kang H, Liu X, Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J Med Virol* 2020 Feb 25. Online first.
14. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, *et al.* Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol* 2020 Feb 27. Online first.
15. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med* 2020 Mar 16. Online first.
16. Ye B, Fan C, Pan Y, Ding R, Hu HX, Xiang ML. [Which sampling method for the upper respiratory tract specimen should be taken to diagnose patient with COVID-19?] *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 2020 Mar 13. Online first. [Chinese].
17. Xie X, Zhong Z, Zhao W, Zheng C, Wang F, Liu J. Chest CT for Typical 2019-nCoV Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. *Radiology* 2020 Feb 12. Online first.
18. Lan L, Xu D, Ye G, Xia C, Wang S, Li Y, *et al.* Positive RT-PCR Test Results in Patients Recovered From COVID-19. *JAMA.* 2020 Feb 27. Online first.
19. FDA (Food and Drug Administration). Simplex™ COVID-19 Direct [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.fda.gov/media/136286/download> [citato 5 aprile 2020].

20. Dark Daily 3 aprile 2020. Chinese Firm to Replace Clinical Laboratory Test Kits After Spanish Health Authorities Report Tests from China's Shenzhen Bioeasy Were Only 30% Accurate [Internet]. Disponibile alla pagina: <http://tracking.whatcounts.com/dm?id=BC1DB61F33B10BFD74A2B63136B1223BC642981F76BF3D97> [citato 5 aprile 2020].
21. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, *et al.* Profiling early humoral response to diagnose novel Coronavirus disease (COVID-19). *Clin Infect Dis* 2020 Mar 21. Online first.
22. Liu Y, Liu Y-p, Diao B, Ren F, Wang Y, Ding J. Diagnostic indexes of a rapid IgM/IgG combined antibody test for SARS CoV-2. medRxiv 2020 Mar 26. Online first. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.26.20044883v1>
23. Zhao Jr J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. medRxiv 2020 Feb 03. Online first. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.02.20030189v1>
24. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, *et al.* Coronavirus infection and immune responses. *J Med Virol* 2020;92:424-32.
25. Tan W, Lu Y, Zhang J, Wang J, Dan Y, Tan Z, *et al.* Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19. medRxiv 2020 Mar 24. Online first. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.24.20042382v1>
26. Okba NM, Müller MA, Li W, Wang C, Geurts van Kessel CH, Corman VM, *et al.* SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. medRxiv 2020 Mar 18. Online first. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.18.20038059v1>
27. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen T, Chromikova V, McMahon M, *et al.* A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. medRxiv 2020 Mar 17. Online first. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.17.20037713v2>
28. Woo PC, Lau SK, Wong BH, Chan KH, Chu CM, Tsoi HW, *et al.* Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:665-8.
29. Lou B, Li T, Zheng S, Su Y, Li Z, Liu W, *et al.* Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset. medRxiv 2020 Mar 23. Online first. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.23.20041707v1>

30. Jia X, Zhang P, Tian Y, Wang J, Zeng H, Wang J, *et al.* Clinical significance of IgM and IgG test for diagnosis of highly suspected COVID-19 infection. medRxiv 2020 Feb 28. Online first. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.28.20029025v2>
31. Long Q-x, Deng H-j, Chen J, Hu J, Liu B-z, Liao P, *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: the perspective application of serological tests in clinical practice. medRxiv 2020 Mar 18. Online first. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.18.20038018v1>
32. Poh CM, Carissimo G, Wang B, Amrun SN, Lee CY-P, Chee R S-L, *et al.* Potent neutralizing antibodies in the sera of convalescent COVID-19 patients are directed against conserved linear epitopes on the SARS-CoV-2 spike proteins. bioRxiv 2020 Mar 30. Online first. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.30.015461v1>
33. FDA (Food and Drug Administration) What Laboratories and Manufacturers are Offering Tests for COVID-19? [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/faqs-diagnostic-testing-sars-cov-2#offeringtests> [citato 5 aprile 2020].
34. Nature. Fast, portable tests come online to curb coronavirus pandemic [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.nature.com/articles/d41587-020-00010-2> [citato 5 aprile 2020].
35. Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, Ding Y, Ni W, *et al.* Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2. medRxiv 2020 Mar 16. Online first. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.16.20035014v1>
36. Zhang J, Liu J, Li N, Liu Y, Ye R, Qin X, *et al.* Serological detection of 2019-nCoV respond to the epidemic: a useful complement to nucleic acid testing. medRxiv 2020 Apr 03. Online first. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.04.20030916v2>
37. Padoan A, Cosma C, Sciacovelli L, Faggian D, Plebani M. Analytical performances of a chemiluminescence immunassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics. Clin Chem Lab Med 2020 Apr 16. Online first.
38. Lippi G, Salvagno GL, Pegoraro M, Militello V, Caloi C, Peretti A, *et al.* Assessment of immune response to SARS-CoV-2 with fully automated MAGLUMI 2019-nCoV IgG and IgM chemiluminescence immunoassays. Clin Chem Lab Med 2020 Apr 16. Online first.

39. Xiang J, Yan M, Li H, Liu T, Lin C, Huang S, *et al.* Evaluation of Enzyme-linked Immunoassay and Colloidal Gold-Immuno-chromatographic Assay kit for detection of novel coronavirus (SARS-CoV-2) causing an outbreak of Pneumonia (COVID-19). medRxiv Feb 27. Online first.
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.27.20028787v1>
40. Pan Y, Li X, Yang G, Fan J, Tang Y, Zhao J, *et al.* Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients. medRxiv Mar 13. Online first.
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.13.20035428v1>
41. Ju B, Zhang Q, Ge X, Wang R, Yu J, Shan S, *et al.* Potent human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. bioRxiv 2020 Mar 21. Online first.
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.21.990770v2>
42. Sousa-Pinto B, Fonseca JA, Costa-Pereira A, Rocha-Goncalves FN. Is scaling-up COVID-19 testing cost-saving? medRxiv Mar 22. Online first.
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.22.20041137v1>