

# APPROCCIO DIAGNOSTICO SARS-COV-2

## PREMESSA:

SARS-CoV-2 è un virus ad acido ribonucleico a filamento singolo (RNA) a senso positivo di grandi dimensioni, composto da quattro proteine strutturali, ovvero proteina nucleocapsidica (NP) che contiene l'RNA virale, proteina spike (SP), proteina dell'involucro (EP) e proteina della membrana (MP), che creano l'involucro virale. Ha un diametro di 50-200 nm e possiede punte sulla sua superficie, fino a 20 nm di lunghezza, che gli conferiscono la forma di una corona, una caratteristica dei coronavirus (CoV). Giusto lo scorso lunedì 16 marzo, Tedros Adhanom Ghebreyesus, capo dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, in conferenza stampa, aveva ribadito l'importanza di effettuare il maggior numero di test possibile, **“non si può fermare la pandemia da Covid-19 se non si sa chi viene contagiato e chi no”**.

## 1. ALGORITMO BASATO SULLO SCREENING MEDIANTE TEST MOLECOLARE CON METODICA PCR - TAMPONE

I test diagnostici attualmente utilizzati in Italia per evidenziare la positività al Covid-19, si basano sulla metodica molecolare di reazione a catena della polimerasi PCR. Questa è stata messa a punto in base alla sequenza genetica del virus SARS-CoV-2 isolata dai ricercatori cinesi.

Con il **tampone** “si prende un po' di muco dal naso e dalla faringe e si esegue l'amplificazione genomica con metodica PCR per identificare la presenza del virus.

Sottoporre tutta la popolazione a questo test diagnostico per scovare il Sars-cov-2, divide esperti e istituzioni. Da una parte c'è chi sostiene che sia irrealistico e poco utile uno screening di massa, diversamente c'è chi pensa che sia la soluzione vincente, come successo in Corea del Sud.

Tuttavia il test non sembra infallibile, infatti ci sono segnalazioni che la ricerca dell'RNA virale con metodica PCR ha dato **falsi negativi** fino a due settimane. La ragione di risultati falsi negativi da RT-PCR potrebbe essere dovuta a diversi fattori:

1. se la carica virale è bassa e non rilevabile, materiale cellulare insufficiente per la rilevazione;
2. un uso improprio dell'estrazione di acido nucleico da materiali clinici;
3. esecuzione non corretta del tampone da parte dell'operatore;
4. se la localizzazione dell'infezione è prevalente nelle basse vie respiratorie rispetto alle alte vie dove si preleva il materiale biologico. .

Queste probabilità di errori analitici potrebbero arrivare anche ad incidere fino al 30%, se non addirittura oltre, secondo quanto evidenziato da numerosi esperti.

Per questi motivi il tampone una volta negativo è necessario ripeterlo per tre volte a distanza di una settimana.

### Effettuato il tampone distinguiamo due diversi casi clinici:

Primo caso: **Tampone positivo contagiosità in atto:**

1. Anticorpi IgM positivi e IgG negativi contagio in atto nella prima settimana;
2. Anticorpi IgM positivi e IgG positivi evoluzione del contagio in atto alla seconda e terza settimana.
3. Anticorpi IgM negativi e IgG positivi, contagio in atto oltre la quarta settimana, comprovata evoluzione verso la guarigione.

#### Secondo caso: **Tampone Negativo assenza di replicazione virale**

1. Anticorpi IgM positivi, IgG negativi, il tampone va ripetuto a distanza di una settimana e comunque il paziente va messo in quarantena.
2. anticorpi IgG positive e IgM negative il paziente ha sviluppato l'immunità, in tal caso è auspicabile ripetere il tampone a distanza di una settimana.
3. Anticorpi IgM e IgG negativi il paziente è sano, non contagiato. In questo caso per maggiore sicurezza potrebbero essere ripetute le sole IgM a distanza di 30 giorni. Per il personale sanitario addetto a reparti Covid ogni 15 giorni.

## **2. TEST RAPIDI - METODO IMMUNOCROMATOGRAFICO MEDIANTE CARD**

I test rapidi basati sull'identificazione di anticorpi IgM e IgG specifici per la diagnosi di infezione da Sars-Cov-2, sono tecnicamente "immunodosaggi a flusso laterale" (LFIA) dove una goccia di sangue (o di siero ottenuto da un prelievo ematico) è fatta scorrere su una piccola lastra contenente proteine virali coniugate con particelle colorate e con anticorpi contro le IgM e IgG umane attaccate su due linee. **Questi test hanno una certa percentuale di errore insita nel metodo utilizzato, soprattutto per i dosaggi non marcatamente positivi o negativi.**

Se l'individuo è in una fase precoce dell'infezione quando ancora l'organismo non ha prodotto gli anticorpi (cosiddetto "periodo finestra"), non possiamo escludere che gli anticorpi nel sangue ci siano ma il test non li ha evidenziati, in tal caso si parla di "**falsi negativi**". È evidente che in queste due ultime circostanze (finestra sierologica e falsi negativi) le persone potrebbero essere infette ed anche contagiose pur in presenza di un test negativo.

Diversamente, è possibile che il test diventi positivo in presenza di anticorpi diretti verso proteine non appartenenti al SARS-COV-2 e che segnali quindi erroneamente la presenza di infezione in soggetti sani, **cosiddetti "falsi positivi"**.

Questo può succedere perché i test rapidi in genere hanno una **specificità e sensibilità molto bassa** compresa tra il 65-75%, diversamente dai dosaggi di tipo immunometrico-quantitativo molto più precisi. **Tuttavia possono essere utilizzato per la facilità di utilizzo e il costo basso, come controllo periodico una volta definito il profilo anticorpale eseguito con i test sierologici.**

## **3. TEST SIEROLOGICI QUANTITATIVI NELLO SCREENING DI MASSA - RICERCA DEGLI ANTICORPI SARS-COV-2 IGG - IGM**

**L'obiettivo di questi esami è determinare la quantità di due proteine specifiche sulla mappatura del Coronavirus:** si tratta degli anticorpi che rilevano l'attività del sistema immunitario, e precisamente i due valori definiti **IgM e IgG**.

Al momento sono in fase di sviluppo una vasta gamma di test immunologici (IA) sierologici che completano i saggi molecolari per la diagnosi di COVID-19, e soprattutto che possano sostituire i test rapidi nello screening di massa. Le IA più importanti sono IA in chemiluminescente automatizzato ed il metodo ELISA, per rilevare l'immunoglobulina M (IgM) e l'immunoglobulina G (IgG) prodotte nelle persone in risposta a Infezione da SARS-CoV-2.

**Per uno screening di massa attendibile** la sola esecuzione del tampone non permette di ottenere la certezza diagnostica e soprattutto la storia anamnestica del paziente, ovvero in che settimana si trova il contagio da Covid19.

Tutto ciò semplicemente perché se il tampone dà un esito negativo per i motivi sopra descritti, la ricerca quantitativa degli anticorpi invece permette l'evoluzione clinica del contagio.

Inoltre uno screening di massa basato sulla rilevazione di anticorpi IgG e IgM con dosaggi immunometrici-sierologici basato su metodiche ad alta sensibilità e specificità. **Il punto centrale dell'utilizzo di tali metodiche nello screening di massa è legato all'informazione che essi danno del livello di immunizzazione della popolazione.**

#### **4. ALGORITMO PER LO SCREENING DI MASSA MEDIANTE RICERCA DI ANTICORPI - SARS-CoV-2 IgG e SARS-CoV-2 IgM**

Il dosaggio SARS-CoV-2 IgG viene utilizzato come ausilio nella diagnosi di infezione da SARS-CoV-2 congiuntamente alla valutazione del quadro clinico e di altri test di laboratorio. E' stato segnalato che tali anticorpi compaiono nel siero o nel plasma di soggetti infetti dopo la rilevazione di acido ribonucleico virale (RNA) nei tamponi a distanza di pochi giorni.

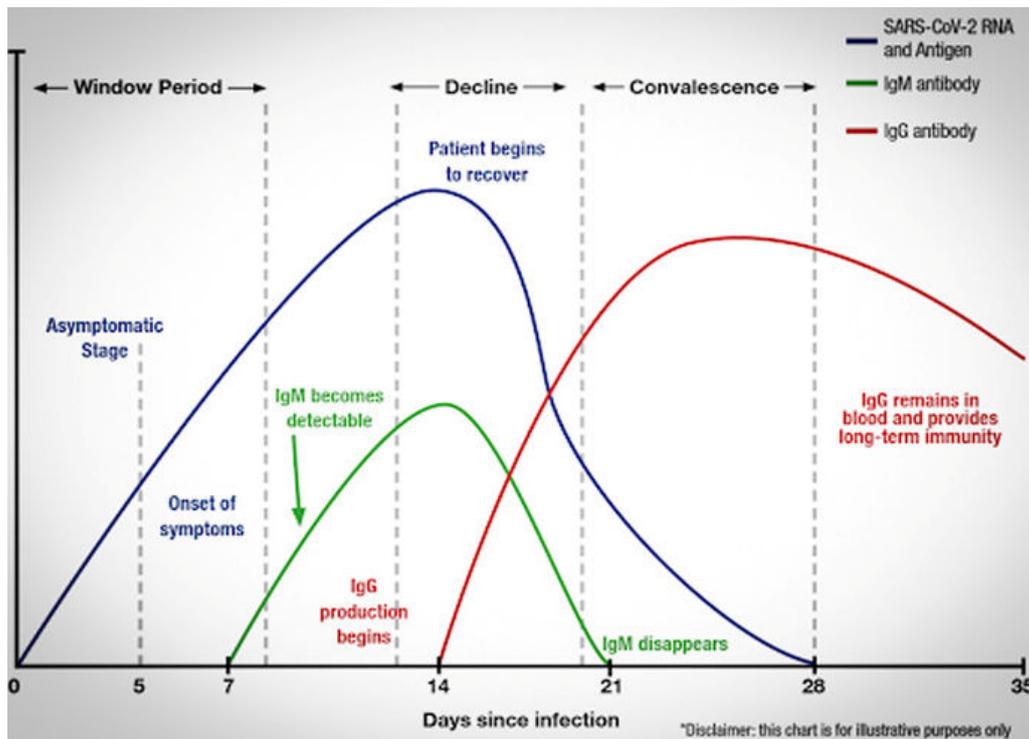
**Gli anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2** specifici sono rilevabili nei pazienti affetti da COVID-19 sia asintomatici che sintomatici. La sensibilità in combinazione con i risultati degli anticorpi è indicata > 99%.

**La persistenza degli anticorpi IgG consente di identificare gli individui che hanno contratto l'infezione in passato, sono guariti dalla malattia e ne sono verosimilmente diventati immuni.** Resta da verificare nel tempo l'andamento della risposta anticorpale.

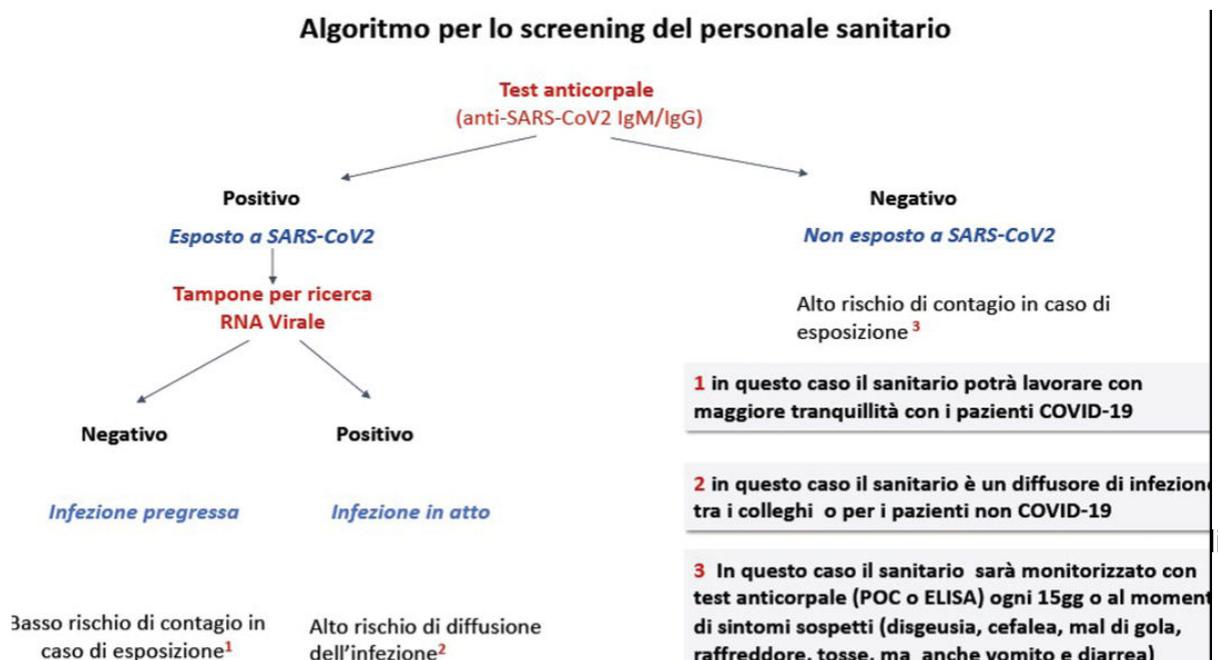
**Gli anticorpi IgM anti-SARS-CoV-2** sono la manifestazione della prima risposta del sistema immunitario e compaiono normalmente non prima di 5 giorni dopo che il virus viene contratto e tendono a negativizzarsi dopo qualche settimana.

Per una corretta analisi dello stato clinico e soprattutto del **livello di immunizzazione della popolazione** è necessaria una analisi dell'evoluzione degli anticorpi IgM e delle IgG specifiche nel sangue. La loro presenza dovrebbe indicare che la persona ha già "incontrato" sulla sua strada il Coronavirus e ci indica in quale stadio la patologia si trova, a differenza del tampone che indica la sola presenza del RNA virale. Un quadro più completo si può

avere solo dopo essersi sottoposti a un secondo esame sierologico, da farsi a distanza di 10-15 giorni in media 7 giorni, per valutare la "cinetica" degli anticorpi, ovverosia come si muovono i valori secondo le curve del diagramma sotto riportato.



Per uno **screening di massa** si può seguire l’algoritmo già utilizzato per il personale sanitario sotto riportato. Con l’eccezione che in caso di negatività degli anticorpi la ripetizione delle IgM può essere derogato una volta al mese non essendo questi esposti a pazienti Covid ed utilizzando correttamente dispositivi DPI.



## **5. SCREENING PER L'INSERIMENTO DEI LAVORATORI NEL CICLO PRODUTTIVO**

**Il lavoratore NON PUO' ESSERE IMMESSO NEL CICLO PRODUTTIVO in caso di:**

- 1. Anticorpi IgM Positivi e IgG Negativi e Tampone negativo**
- 2. Anticorpi IgM Positivi e IgG Positivi e Tampone negativo**
- 3. Anticorpi IgM negativi, IgG positivi e Tampone Positivo**

**Il lavoratore PUO' ESSERE IMMESSO NEL CICLO PRODUTTIVO solo in in caso di:**

- 1. Anticorpi IgM Negativi e IgG Positivi e Tampone negativo**
- 2. Anticorpi IgM Negativi e IgG Negativi.**

**Per il controllo periodico in quest'ultimi due casi, si possono utilizzare i test veloci (card) per il loro costo più accessibile e la facilità di esecuzione, pur avendo una sensibilità più bassa.**

## **6. SCREENING DI MASSA - DATI EPIDEMIOLOGICI RIGUARDO LA CIRCOLAZIONE VIRALE NELLA POPOLAZIONE**

I test sierologici, secondo le indicazioni dell'OMS, non possono sostituire il test diagnostico molecolare su tampone, tuttavia essi possono fornire dati epidemiologici riguardo la circolazione virale nella popolazione anche lavorativa.

Per ricerca degli anticorpi si intende l'utilizzo di tecniche di IA in chemiluminescente automatizzato ed il metodo ELISA.

Mentre l'esecuzione del Tampone si intende l'utilizzo di tecnica PCR con metodica di biologia molecolare, per verificare se è presente nell'organismo replicazione virale.

### **Test Anticorpale IgM e IgG anti-SARS-CoV-2**

- 1. in caso di IgM Positivo e IgG Positivo** - è necessario eseguire il tampone cadenzalmente fino a negatività del tampone in linea con il punto 3.
- 2. In caso di IgM Positivo e IgG Negativo** - è necessario eseguire il tampone cadenzalmente fino a negatività del tampone in linea con il punto 3.
- 3. In caso di IgM Negativo e IgG Positivo** è necessario eseguire il tampone solo una volta entro una settimana dall'esito del dosaggio delle IgG per confermare la eventuale presenza ancora del virus. Se il tampone è negativo non va più ripetuto.
- 4. In caso di IgM Negativo e IgG Negativo** - non è necessario eseguire il tampone a meno che non ci sia un quadro clinico che possa far sospettare un contagio.