

“Position paper”: uso di test immunologici e indagini di sieroprevalenza

Documento elaborato dal gruppo di lavoro composto da Salvatore Scondotto, Lucia Bisceglia, Giuseppe Costa, Francesco Forastiere, Stefania Salmaso, Rodolfo Saracci, Paolo Vineis.

1. Introduzione

Sono emerse negli ultimi giorni proposte che riguardano l'uso di test immunologici con diverse finalità. Il presente documento intende esporre alcuni principi di base di natura epidemiologica che orientino la discussione.

Da un lato e' stata proposta (e risulta gia' in uso in diverse realta') la misurazione degli anticorpi anti-Sars-CoV-2 al fine di identificare persone “protette” e che pertanto potrebbero essere reimmesse in una normale vita sociale e lavorativa. Questo uso dei test anticorpali è del tutto improprio e prematuro come argomentiamo in seguito.

Il secondo uso è per la conduzione di indagini sieropidemiologiche di prevalenza. L'Organizzazione Mondiale della Sanità, in particolare, ha indicato che un'indagine a campione nella popolazione può avere diversi scopi:

1. monitorare e studiare i comportamenti durante il lock-down;
2. stimare la prevalenza dell'infezione o della immunizzazione.

Stimare la prevalenza è utile per sapere quanti individui si sono infettati fino alla rilevazione e valutare la quota di soggetti che potrebbe contribuire a sviluppare l'immunità di gregge; indagini ripetute sono utili per seguire nel tempo l'evolvere dell'epidemia. Tuttavia, l'utilità di tali studi ai fini decisionali nei confronti delle attuali contromisure adottate è ancora in discussione.

Queste proposte richiedono alcuni chiarimenti prima di essere percorse.

Tampone e indagine sierologica hanno significati molto diversi. L'indagine sull'RNA virale (tampone) offre una stima degli infetti in un dato istante e dipende strettamente dalla fase dell'epidemia in cui viene effettuata. Il test per RNA virale (tampone) diventa positivo quando la persona ha il virus presente ed e' contagiosa per 2-3 settimane, dopo le quali il test si negativizza; tuttavia il test puo' in alcuni casi rimanere ancora positivo per alcuni giorni pur non essendo la persona piu' contagiosa. Invece il test

immunologico si positivizza quando la persona, dopo essersi infettata, ha una reazione anticorpale; ma quanto duri l'immunità e quanto sia efficace non è noto.

2. Documenti importanti

In quanto segue facciamo riferimento in particolare ai seguenti documenti:

Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI): "SARS CoV2: la diagnosi sierologica. La posizione di AMCLI", 31 Marzo 2020

Accademia dei Lincei: RAPPORTO COVID-19 (Cecconi, Forni, Mantovani), 25 marzo 2020

WHO Interim guidance "Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19", 22 Marzo 2020

3. Domande di base da porsi per le indagini anticorpali

Sensibilità

i) i test che rilevano la presenza di anticorpi al virus sono in grado di individuare in modo sistematico la risposta immune, o possono determinare risultati falsamente negativi? Specificità i) esistono cross-reazioni con altri (Corona)virus, responsabili di patologie diffuse, tali da determinare risultati falsamente-positivi?

Specificità

i) esistono cross-reazioni con altri (Corona)virus, responsabili di patologie diffuse, 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?

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)?

vi) E' sempre da considerare il valore predittivo positivo di un test. Il valore predittivo positivo (PPV, la possibilità che con un test positivo l'individuo sia stato veramente infetto) sarà limitato in situazioni di prevalenza bassa. Quindi, se il test avesse una sensibilità del 70% e una specificità del 99%, ma la prevalenza dell'infezione fosse solo del 3%, il PPV del test sarebbe solo del 68%. Ciò renderebbe circa un terzo dei casi segnalati falsi positivi. Questo altera le stime di prevalenza e pone grandi problemi per la risposta al singolo individuo.

5. Valutazione da parte della Associazione dei Microbiologi Clinici Italiani

L'AMCLI e' critica verso la misurazione degli anticorpi in popolazioni e conclude che "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."

Secondo l'AMCLI la comparsa di diverse classi di anticorpi 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);

la positività non è rilevabile in tutti i pazienti ricoverati;

i dati (ancora pochi) nei pazienti clinicamente guariti non sono interpretabili.

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 la negativizzazione, lasciando immaginare la possibilità di reinfezioni dopo tale periodo.

I dati di sensibilità analitica sono modesti: risultati sono per lo più difficilmente valutabili per la mancanza, spesso dichiarata, dei test di neutralizzazione; l'impatto diagnostico è modestissimo se non fuorviante

4. I diversi metodi sierologici

Esistono numerosi kit commerciali e metodi usati in contesti di laboratori specializzati.

Il metodo **DiaSorin** usa frammenti di spike protein (S1 e S2) predetti essere altamente immunogenici ma che non corrispondono al Receptor Binding Domain, per cui la correlazione tra positività nel test DiaSorin e capacità neutralizzante del virus richiede ulteriori dati e validazioni su un campione ampio di popolazione; inoltre la piccola dimensione dei frammenti utilizzati non esclude la possibilità che individui esposti sviluppino prevalentemente anticorpi contro altre regioni della proteina, risultando in falsi negativi. Per motivi di protezione industriale, non è chiaro come è stata prodotta la proteina, in particolare se in batterio (che è probabile visti i tempi rapidi e la scala di produzione). Inoltre la proteina non è glicosilata e dunque potrebbe non essere identificata da anticorpi che vedono epitopi glicosilati (che per proteine di superficie sono prevalenti). Sulla base delle informazioni fornite da DiaSorin, il metodo non identifica le IgA.

Lo IEO (Natoli, Mapelli, Facciotti) in collaborazione con l'Università di Pavia (Forneris) sta mettendo a punto un ELISA che consiste nella espressione in cellule eucariote del receptor binding domain di spike protein (comunicazione personale)

Alcuni metodi sono in corso di validazione (tramite confronto reciproco) a Padova da parte del gruppo di Andrea Crisanti: metodo immunocromatografico (qualitativo – “rapido”, tempi di risposta di circa 15 minuti); ELISA per la presenza di IgM e/o IgA ed IgG anti Sars CoV-2; e il metodo commerciale DiaSorin.

Indipendentemente dal metodo, sarà fondamentale stabilire attraverso una opportuna sperimentazione longitudinale, la correlazione tra titoli anticorpali sierici (IgG e IgA) e protezione dalla reinfezione in un campione ampio di popolazione ad alta esposizione.

Altri metodi sono disponibili commercialmente o sono in corso di sviluppo.

5. La posizione dell'AIE è dunque la seguente.

- 1. Non esiste al momento alcuna possibilità di usare i test sierologici (e tantomeno quelli commerciali) a fini diagnostici individuali e dunque neppure per “certificati di immunità”, per esempio per allentare il lock-down per individui o categorie**
- 2. Date le incertezze che ancora regnano sulle caratteristiche di base dei test anticorpali, qualunque indagine sierio-epidemiologica richiede di essere accompagnata da un'indagine che miri a misurare sensibilità, specificità e valori predittivi (in diversi contesti di prevalenza). A questo scopo è opportuno identificare possibilmente un gold standard, basato su anticorpi neutralizzanti che misurino quantitativamente il titolo anticorpale. Le stime di accuratezza saranno anche consentite dal follow-up delle popolazioni sottoposte a test.**
- 3. In ogni caso prima di un sufficiente periodo di follow-up non sarà possibile conoscere la durata e l'entità della protezione dalle reinfezioni.**
- 4. Gli studi pilota in cantiere dovrebbero essere omogeneizzati in modo da avere almeno un test in comune e possibilmente lo stesso questionario, o questionari tra loro armonizzati, per la raccolta delle informazioni sui partecipanti agli studi.**
- 5. Occorre predisporre adeguati dispositivi (“biobanche”) di conservazione almeno a medio termine di aliquote dei campioni di siero usati negli studi, così da rendere possibile test ripetuti nel tempo.**

6. L'esecuzione di un prelievo di sangue richiede un contesto adeguato e un consenso informato e la necessità di informazioni chiare sul significato del test e sul valore predittivo positivo per il singolo individuo. Gli aspetti etici, inclusa la comunicazione ad ogni partecipante, di un piano di indagine sierologico-epidemiologica vanno valutati attentamente.

7. Le indagini estese di sierologia epidemiologica hanno bisogno di una gran quantità di risorse umane. Ogni sovraccarico di lavoro per i Dipartimenti di Prevenzione delle ASL può comportare una sottrazione delle forze alla attività di sorveglianza attiva, contact tracing ed isolamento, cruciali in questa fase e per un lungo periodo.

10 Aprile 2020