

Diagnosi microbiologica di SARS-CoV₂: l'evoluzione continua

Microbiological diagnosis of SARS-CoV₂: evolution continues

Webinar 24-11-2020

A cura di **Annibale Raglio**

Con la partecipazione di

Guido Antonelli, Maria Rosaria Capobianchi, Concetta Castelletti, Antonio Goglio, Mauro Pistello, Andrea Rocchetti, Mario Rasso e Mario Sarti

Introduzione

La tempestiva e accurata diagnosi microbiologica di COVID-19 è una parte essenziale della sorveglianza, del tracciamento dei contatti, della prevenzione, del controllo e della gestione clinica delle infezioni da SARS-CoV-2.

Ad oggi, i test per l'infezione da SARS-CoV-2 si basano principalmente sulla reazione a catena della polimerasi a trascrizione inversa (RT-PCR) eseguita su un campione rinofaringeo. Questo metodo rimane il *gold standard* per la rilevazione di SARS-CoV-2 ed è caratterizzato da una discreta sensibilità e specificità. La RT-PCR ha però costi elevati, tempi lunghi di esecuzione e necessita di personale altamente esperto. Di conseguenza, il tempo tra la raccolta del campione e la produzione del referto può richiedere anche diversi giorni.

All'inizio della pandemia, la maggior parte dei test è stata riservata alla conferma dei casi sospetti negli ospedali e in ambienti ad alto rischio. Successivamente, la potenzialità diagnostica dei laboratori è aumentata e i test sono stati estesi all'identificazione dei casi sintomatici, dei contatti dei casi e nell'ambito di programmi di screening.

L'aumento dei casi di COVID-19 in Europa, legato anche all'aumento "stagionale" di altre infezioni respiratorie, ha portato a un drammatico aumento della domanda di test SARS-CoV-2 e ha mandato in sofferenza i laboratori, impossibilitati a far fronte alle richieste diagnostiche per mancanza di personale, ma soprattutto per carenza di reagenti e monouso (in particolare dei test molecolari con risposta più rapida, ma non solo), come del resto già accaduto durante la prima fase della pandemia. Particolarmente critico è l'aumento dei tempi di attesa nella fase di triage dei pazienti al pronto soccorso o che necessitano di interventi urgenti.

Per compensare le carenze dei test molecolari RT-PCR, diversi Paesi hanno avviato procedure per la convalida e l'uso dei test rapidi antigenici (TAG). In questa linea si è mossa anche SIMPIOS, che in collaborazione con AMCLI, SIM e EUCIC IT, ha organizzato, sin dall'inizio della pandemia COVID-19, Webinar sulla diagnosi microbiologica di SARS-CoV₂ mettendo a confronto esperienze fra i centri ed evidenziando valori e limiti dei test in uso e il loro impatto

sull'organizzazione della diagnostica. Durante questi Webinar sono stati presentati numerosi dati ricavati dalle raccomandazioni della Commissione Europea, dai rapporti tecnici dell'ECDC, dalle circolari e documenti Ministeriali e Regionali, dalla letteratura, da studi *ad hoc* sui diversi test bio-molecolari e antigenici in commercio, incluse le esperienze riportate dai centri partecipanti ai Webinar.

Negli ultimi Webinar si è cercato di valutare i valori e i limiti di alcuni test antigenici (TAG) in commercio e, in particolare, di definire possibili flussi operativi per poterli applicare nella pratica quotidiana con l'obiettivo di avere risposte più tempestive e risparmiare, così, i test di biologia molecolare che sono più rapidi ma assai ridotti come scorte.

Di seguito si propone un riassunto di quanto raccolto e discusso, incluse le revisioni di alcune delle fonti sopra ricordate.

Difficoltà e limiti

Alcune difficoltà sono ormai ben note:

- il numero elevato di test sul mercato (sul sito di FIND, Foundation for Innovative New Diagnostics, ente istituito dall'OMS per la valutazione dei test in commercio, oltre 945 di cui 118 per Antigeni al 23 novembre 2020);¹
- la scarsità di kit o materiale;
- la limitata validazione clinica con scarso confronto fra metodi con limiti di rilevazione (LOD) e performance variabili;
- la mancanza di Controlli di Qualità Interni e di Valutazioni Esterne di Qualità;
- l'estrema variabilità di test usati a livello Nazionale, Regionale e provinciale a seconda delle strutture;

SIGLE ED ABBREVIAZIONI

RT-PCR: Catena della Reazione Polimerasica in Tempo Reale	ECDC: Centro Europeo per il Controllo delle Malattie
Tag: Test Antigenico	LOD: Limite di Rilevazione
AMCLI: Associazione dei Microbiologi Clinici Italiani	NPV: Valore Predittivo Negativo
EUCIC CI: Comitato Italiano del Comitato Europeo per il Controllo delle Infezioni della Società Europea di Microbiologia Clinica e Malattie Infettive	PPV: Valore Predittivo Positivo
SIM: Società Italiana di Microbiologia	UTM: Terreno di Trasporto Universale
	Ct: Ciclo soglia
	LIS: Sistema Informativo di gestione del Laboratorio
	CO: Cut Off

— la relativamente scarsa performance della PCR (sensibilità 65-85%) e ancor di più dei TAG (sensibilità 23-95%). Altri aspetti meritano di essere considerati.

a) Il ruolo del contesto

Lo studio di Jessica Watson et al.,² aveva già evidenziato come l'accuratezza della RT-PCR nella pratica clinica varia a seconda del sito e della qualità del campionamento. Riferiva inoltre di uno studio di Wang et al.³ dove la sensibilità della RT-PCR in 205 pazienti variava dal 93% per lavaggio bronco-alveolare, al 72% per espettorato e 63% per tamponi nasali e solo il 32% per i tamponi faringei.

L'accuratezza del risultato può variare a seconda dello stadio della malattia e del grado di moltiplicazione virale. Lo studio sottolineava come i valori predittivi negativo e positivo (NPV, PPV) della PCR, con una sensibilità del 70% e una specificità del 98%, variassero in base alla prevalenza dell'infezione.

L'interpretazione del risultato di un test dipende non solo dalle caratteristiche del test stesso ma anche dalla probabilità pre-test di malattia, che può essere ricavata dall'analisi

- dei tassi di infezione da COVID-19 locali, nazionali e regionali,
- del quadro clinico dei pazienti,
- della probabilità di diagnosi alternative e
- del rischio di esposizione a COVID-19.

L'analisi del contesto non è semplice, può quindi essere utile usare il dato della prevalenza.

Queste informazioni assumono un ruolo ancor più rilevante con l'uso dei TAG.

La FDA ha sottolineato e spiegato che il tasso di falsi positivi per un test con una specificità del 98% passa dal 20% in una popolazione con una prevalenza del 10% al 96% in una popolazione con una prevalenza dello 0,1%.

Risulta utile anche la tabella riportata da ECDC nel documento "Options for the use of rapid antigen tests for COVID-19",⁴ che permette di calcolare NPN e PPV in base alla prevalenza e alla sensibilità e specificità media sia di TAG che di PCR.

Ad un livello di prevalenza del 10% e con un TAG con sensibilità 80% e specificità 98% si hanno 2 falsi positivi ogni 90 casi e 2 falsi negativi ogni 10.

Se si fa il test a una popolazione con alta probabilità di infezione/malattia aumenta la possibilità di avere un test

vero positivo. Se il test risulta negativo è opportuno ricontrollarlo.

Questi dati comportano l'esigenza di definire a chi fare il TAG e come interpretarlo.

Il documento ECDC propone una tabella (tabella 1) dove sono riportati esempi della prevalenza attesa di COVID-19 in diverse popolazioni in diverse situazioni.

b) L'idoneità del campione

Come riportato più volte, sia per la PCR che per i TAG la corretta raccolta del campione naso-faringeo è fondamentale. Per i TAG è quasi sempre necessario un sistema di trasporto diverso dall'UTM usato per la PCR.

c) Il valore del Ct

Fino ad ora per i test in PCR il valore di Ct >35 era stato risolto con l'indicazione di refertare comunque come "positivo" poiché si era evidenziato che nel 5% dei casi il virus veniva isolato dalla coltura. Nel confronto con i TAG, il valore del Ct dei diversi geni sta assumendo un significato diverso. Infatti, in tutte le valutazioni delle performance dei TAG, la loro sensibilità è rapportata anche in base al Ct. Per esempio, la valutazione di FIND del test Rapigen Inc, Bio-credit COVID19 Ag, quello prescelto dal Commissario Nazionale, riporta la Sensibilità Clinica al 74%, la Sensibilità con Ct <33 al 82% e con < 22 al 91%.

Secondo uno studio di Nature e altre pubblicazioni^{5,6,7}, la curva di rilevazione dei TAG è uguale a quella dell'isolamento colturale del virus. Questo conferma la minor sensibilità dei TAG, ma, secondo alcuni autori, anche la miglior capacità dei TAG di identificare i pazienti a maggior rischio di trasmissione.

d) Esecuzione, lettura e interpretazione dei TAG

Altri punti critici dei TAG sono le modalità di esecuzione, l'esperienza di chi esegue il test e come, il risultato.

Le raccomandazioni al riguardo sono univoche sia dalla Commissione Europea che dagli ECDC.^{4,8}

Per i TAG è anche particolarmente critica la tempestività di esecuzione. Riguardo a TAG, FDA fa un richiamo al rispetto delle indicazioni fornite dalla ditta produttrice del test e per l'esecuzione contemporanea di grossi numeri di campioni, in particolare per il rischio di falsi positivi e di cross-contaminazioni.

La maggior parte dei TAG sono interpretati in base alla

Tabella 1 – Esempi della prevalenza attesa di COVID-19 in diverse popolazioni target in diverse situazioni.

Popolazione target	Esempio del range di prevalenza
Comunità con alta prevalenza, con epidemia in corso, con operatori sanitari sintomatici	Alta a molto alta (10-≥30%)
Operatori asintomatici ma con lato rischio di esposizione, Comunità con alta prevalenza	Alta (10%)
Contatti di casi confermati	Bassa a molto alta (2-30%)
Persone sintomatiche in comunità con trasmissione bassa	Bassa a alta (2-10%)
Popolazione asintomatica	Molto bassa a bassa (≤2%)

comparsa o meno della banda colorata ed è quindi facile immaginare il rischio di una interpretazione variabile. Per questo, nel limite della disponibilità di mercato e di costi, è preferibile usare TAG che diano anche un risultato numerico che permetta anche una migliore interpretazione.

Esperienze e commenti da diversi centri

Andrea Rocchetti (Alessandria) sottolinea la scelta di usare TAG, dettata dalla disponibilità scarsa di test molecolari e dalla necessità di accelerare il TAT in alcuni “setting” quali lo screening degli operatori sanitari e la diagnosi dei sintomatici in Pronto Soccorso.

La loro esperienza ha messo in evidenza una buona concordanza fra il TAG (LumiraDx, Dumyat Business Park Alfoa FK10 2PB, Regno Unito) e la RT_PCR Cobas® SARS-CoV-2 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germania). Conferma una migliore concordanza con Ct <30 e quindi una affidabilità maggiore per TAG positivi.

Il TAG negativo deve essere valutato caso per caso secondo algoritmi decisionali concordati ed inseriti in un documento a valenza aziendale (DVA).

Sottolinea l'utilità di gestire il risultato in modo informatizzato interfacciando con il LIS.

Mario Sarti (Modena) presenta un protocollo integrato di utilizzo dei TAG e della PCR per pazienti ricoverati da Pronto Soccorso finalizzato alla eliminazione delle cosiddette “aree filtro” e al contenimento del consumo di dispositivi “rapidi” per PCR. Tale protocollo prevede che la tempistica di esecuzione della PCR e l'area in cui ricoverare il paziente (COVID o NO COVID) siano decise sulla base sia dell'esito del TAG sia della valutazione clinica (presenza o meno di sintomi suggestivi di COVID).

L'esperienza descritta è basata sull'uso di TAG SD Biosensor, che permette un risultato numerico, raccolto al PS ed eseguito in Microbiologia in un contesto con il 15-25% di prevalenza.

Evidenzia la necessità di eseguire due tamponi Naso-Faringei poiché per TAG è necessario un sistema di trasporto diverso da UTM per la PCR.

Vengono illustrate due diverse possibilità per il trasporto del campione per TAG:

- inserire il tampone in una provetta da biologia molecolare previa eliminazione per versamento del liquido di conservazione
- effettuare l'estrazione direttamente in PS e poi inserire la provetta di estrazione in un barattolo con paletta per la raccolta di feci.

Conferma una buona concordanza del TAG con la PCR che, come atteso, diminuisce gradualmente con l'aumento dei Ct (Ct <18 TAG 100% Positivo; Ct <25 <35 TAG 48% Positivo).

Rileva che in 3 casi di pazienti sintomatici, sui 1.241 arruolati di cui oltre il 50% con sintomi compatibili per COVID19, TAG è risultato positivo mentre la PCR di conferma è risultata negativa. La PCR ripetuta ha poi confermato l'esito positivo. Il dato conferma il rischio, noto, di

falsi negativi anche con PCR, per campioni non raccolti in modo adeguato.

Sottolinea l'utilità del valore numerico del TAG in particolare per valori al limite del CO.

riportato il flusso operativo definito dopo la fase di valutazione in Figura 1.

Guido Antonelli (Roma) riferisce dell'uso del TAG al PS eseguito da personale infermieristico per poter risparmiare i test rapidi in PCR. Il protocollo che la loro struttura ha in uso prevede di eseguire sempre dopo TAG anche la PCR nelle 12-24 ore successive. In caso di sintomi compatibili ma TAG Neg, eseguono PCR rapida.

Mario Rassu (Vicenza) indica la necessità di dover utilizzare diversi TAG nei vari livelli Regionali e Provinciali perché non vi sono gli stessi test per tutti.

Sottolinea l'utilità dei TAG eseguiti come controllo in infetti dopo la quarantena per diminuire il rischio di PCR altalenante Negativa o Positiva per cariche virali basse con capacità infettante praticamente nulla.

In pazienti sintomatici con esiti negativi propone l'esecuzione di TAG dopo 2/3 giorni.

Mauro Pistello (Pisa) presenta l'esperienza di 3 laboratori in Toscana sull'uso di Lumiplus (Fujirebio) per lo screening nelle scuole.

Sottolinea l'utilità di poter usare con questo tipo di TAG lo stesso terreno UTM della PCR e l'importanza di avere un esito numerico. In particolare, per i casi con valori fra 1 e 50, evidenzia come, soprattutto in due laboratori, si siano ottenuti il 50% e il 75% di falsi positivi.

Propone che con valori >50 non sia più necessario fare conferma con PCR

Maria Rosaria Capobianchi e Concetta Castelletti (Roma) confermano le informazioni delle diverse esperienze riportate. Sottolineano in particolare che

- le performance dei TAG riportate sui fogli illustrativi delle varie ditte sono sempre più alte di quelle che poi si ritrovano in letteratura o sul sito FIND (ritenuto affidabile) perché sono con molta probabilità diversi i tipi di campionamento o di contesto
- l'indicazione della sensibilità e specificità di un test dovrebbe sempre essere accompagnata dalla descrizione della casistica sulla quale è stata effettuata la valutazione
- occorre considerare che la sensibilità “analitica” non necessariamente corrisponde alla sensibilità “clinica”.

Conclusioni

Nelle conclusioni si raccomanda di applicare le Raccomandazioni Internazionali,⁸ Nazionali⁹ e Regionali¹⁰ in particolare riguardo:

- l'uso di TAG con Sensibilità > 80%, come indicato da OMS, o >90% secondo ECDC;
- la ripetizione del TAG ogni 3-4 giorni per lo screening a operatori sanitari o dei residenti nelle RSA: anche se si considera che sarebbe difficilmente sostenibile una tempistica inferiore a 7 o 15 gg.

A. Raglio – Seminari online –
Diagnosi microbiologica di SARS-CoV2: l'evoluzione continua

Figura 1.

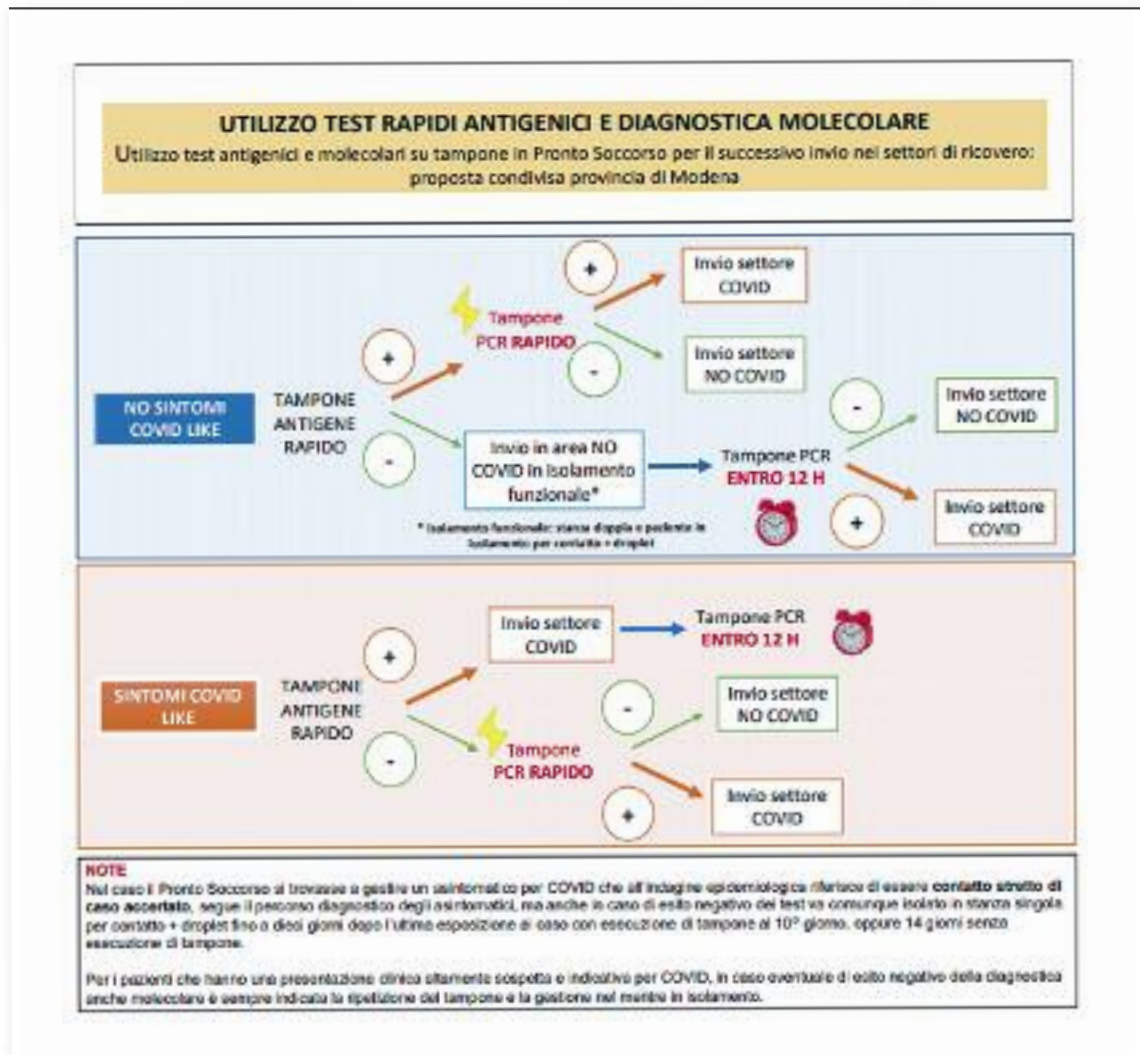
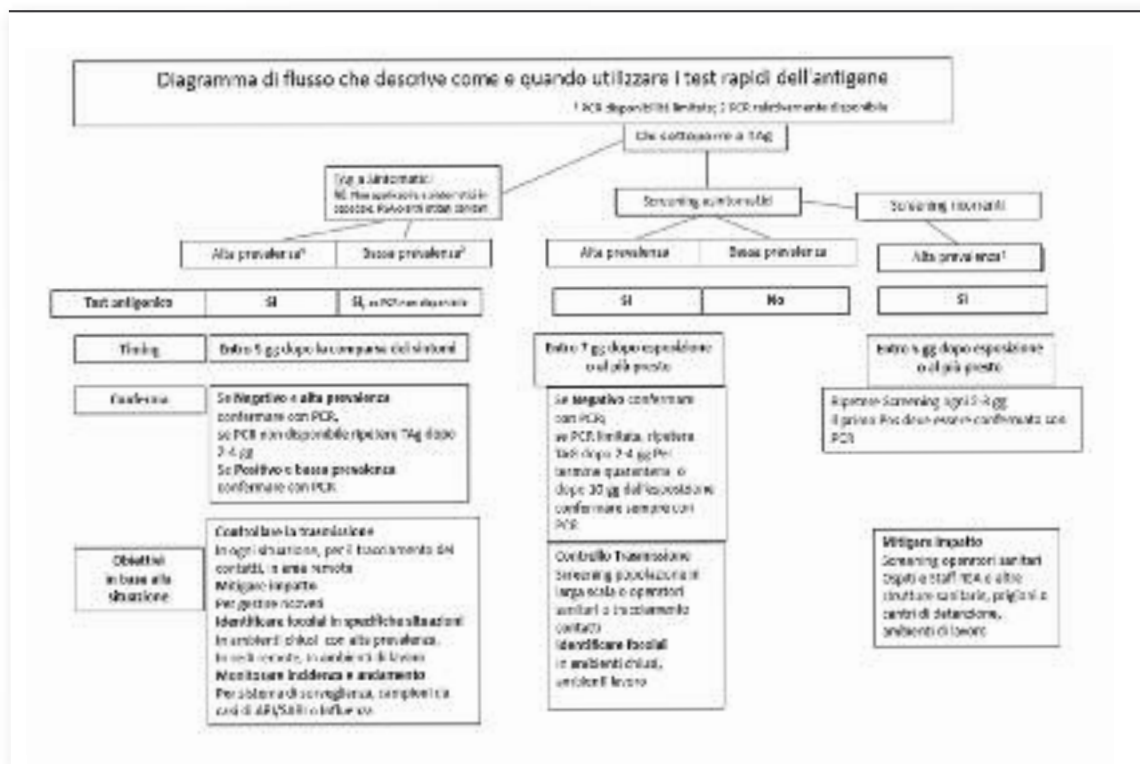


Figura 2.



A. Raglio – Seminari online –
Diagnosi microbiologica di SARS-CoV2: l'evoluzione continua

Nella figura 2 è riportato il flusso proposto da ECDC per decidere quando e come usare i TAG, flusso che non è sempre facilmente applicabile nelle nostre realtà.

Punti basilari riguardo ai TAG sono:

— Scelta del Tag

In merito alla scelta occorre:

- a. rilevare le performance in particolare la sensibilità clinica,
- b. preferire TAG con esito numerico,
- c. valutare il contesto di utilizzo.

I TAG possono essere utili come screening o per la diagnosi rapida perché:

- a. possono ridurre il carico e i tempi di risposta che in caso di bassa prevalenza possono essere utili per la sanità pubblica,
- b. possono permettere il tempestivo isolamento di soggetti con carica virale elevata e quindi ridurre il rischio di trasmissione, in particolare quando i test con PCR non sono disponibili in tempi brevi.

Secondo l'ISS appaiono importanti per la scelta del test:

- i tempi di esecuzione del test (alcune ore per i test molecolari, contro i 15-30 minuti di un test antigenico rapido, ad esempio);
- necessità di personale specializzato e di strumentazione dedicata disponibile solo in laboratorio vs. piccole strumentazioni portatili da utilizzare ovunque;
- i costi da affrontare per una politica basata sulla ripetizione dei test; il trasporto dei campioni vs l'esecuzione in loco;
- l'accettabilità del test da parte dei soggetti per l'invasività del test; la facilità di raccolta del campione; l'addestramento necessario a raccogliere/processare i campioni;
- la disponibilità dei reagenti; la stabilità dei campioni. Critica è anche la raccolta dati relativamente ai test eseguiti con la conseguente possibilità di analisi e valutazione delle strategie adottate piuttosto che della diffusione della infezione;
- prevenire la (re)introduzione nelle aree che hanno raggiunto un controllo sostenuto del virus.

Utile, anche, una strategia di testing che andrebbe implementata per quanto possibile e organizzata in modo omogeneo sul territorio nazionale.

— Raccolta del Campione.

- TAG devono, in ogni caso, essere utilizzati correttamente (diversi sistemi di trasporto, diversa tipologia di campione).

— Esecuzione ed Interpretazione⁴ (Fig 2).

- I TAG devono essere eseguiti con rigido rispetto delle modalità indicate dalle ditte. A tal fine il personale deve essere formato e monitorato.
- Evitare di eseguire contemporaneamente un numero troppo elevato di campioni con i TAG immunocromatografici che comporterebbe un aumento del rischio di cross-contaminazione.

- L'interpretazione dell'esito del Tag deve sempre considerare il contesto di esecuzione (prevalenza dell'infezione, presenza di sintomatologia, ingresso in struttura sanitaria o socio-sanitaria..).
- Un TAG positivo in situazione di bassa prevalenza (2%) deve essere considerato un possibile falso positivo e quindi deve essere confermato con un test in PCR.
- Un TAG positivo in alta prevalenza (>10%) può non essere riconfermato con PCR⁴, valutando che il valore numerico non sia troppo prossimo al CO.
- Un TAG negativo deve essere sempre considerato come possibile negativo e deve essere riconfermato con la PCR in caso di pazienti ad alto rischio o in particolari ambiti (per esempio in ambiente ospedaliero).

— Refertazione.

- Valutare l'utilità di indicare anche il valore numerico, sia del TAG che del Ct, per un migliore coinvolgimento del clinico.
- Spiegare con attenzione al paziente/utente che l'esito negativo non comporta la possibilità di diminuire l'applicazione delle procedure di prevenzione.

Bibliografia essenziale

1. FIND, Foundation for Innovative New Diagnostics, <https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/>
2. J. Watson et al, Interpreting a covid-19 test result, *BMJ* 2020; 369:bmj.m1808
3. Wang W, Xu Y, Gao R, et al . Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA* 2020. 10.1001/jama.2020.3786. 32159775)
4. ECDC. Options for the use of rapid antigen tests for COVID-19", https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Options-use-of-rapid-antigen-tests-for-COVID-19_o.pdf
5. *Nature* 585, 496-498 (2020) doi: <https://www.nature.com/articles/d41586-020-02661-2>
6. Larremore, D. B. et al. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.06.22.20136309> (2020)
7. Sethuraman, N., Jeremiah, S. S. & Ryo, A. J. *Am. Med. Assoc.* 323, 2249-2251 (2020)
8. European Commission, COMMISSION RECOMMENDATION of 18.11.2020 on the use of rapid antigen tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection, https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/preparedness_response/docs/sarscov2_rapidantigentests_recommendation_en.pdf
9. Ministero della Salute e Istituto Superiore di Sanità. Test di laboratorio per SARS-CoV-2 e loro uso in sanità pubblica. Nota tecnica ad interim, aggiornata al 23 ottobre 2020 https://www.iss.it/documents/20126/0/COVID+19+_test+v4k_last.pdf/gab1f211-7d88-bcb1-d454-cfed04aa8b05?t=1604483686312
10. Delibera Regione Lombardia N XI/ 3777 del 3-11-2020, Disposizioni utilizzo test Antigenici per SARS-CoV2 <https://www.regione.lombardia.it/wps/wcm/connect/8ee134b4-d50e-4df5-af40-eb665d3a7e9/DGR+3777+del+3+novembre+2020.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=ROOTWORKSPACE-8ee134b4-d50e-4df5-af40-eb665d3a7e9-nmk6Fhd>