

IL TEST SIEROLOGICO: ASPETTI GENERALI ED APPLICATIVI IN FARMACIA

PREMESSA

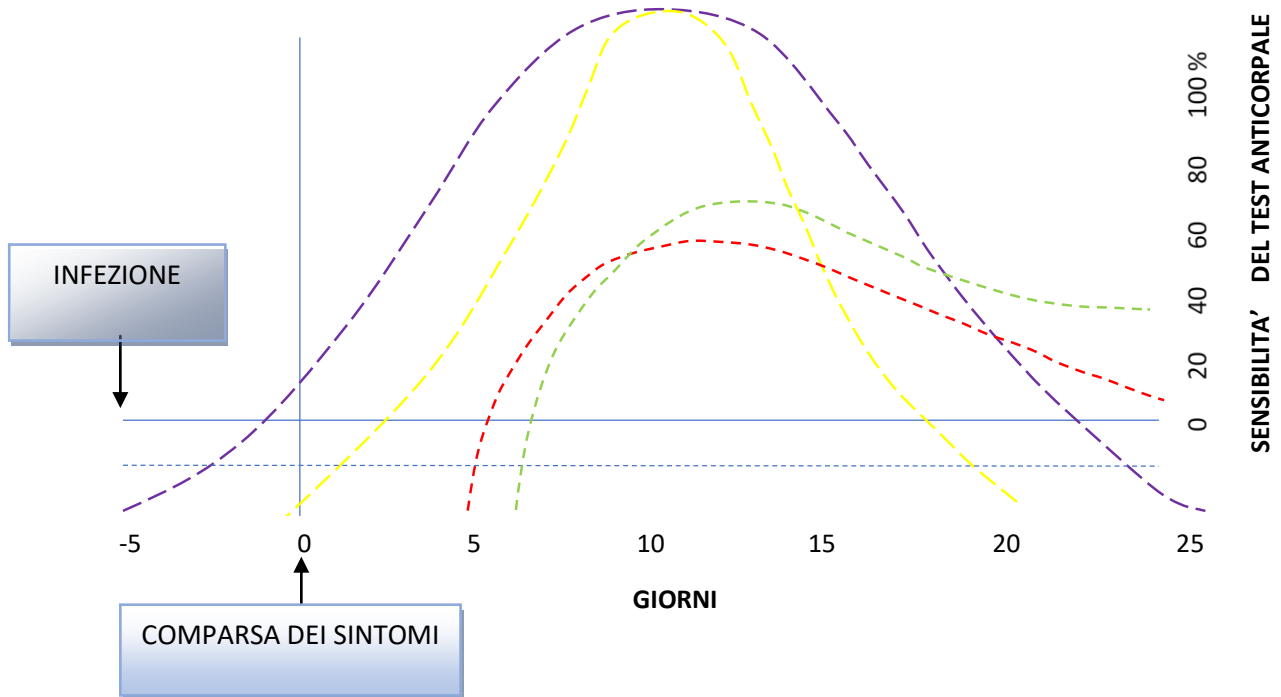
Da lunedì 7 dicembre 2020 è possibile effettuare, nelle farmacie della Regione Marche, il test rapido sierologico per la rilevazione degli anticorpi (classe IgM ed IgG) diretti verso il COVID-19. Sperando di fare cosa gradita, ho fornito alcune informazioni sul funzionamento, su aspetti tecnici e, più in generale, sul significato di tali test, specie nel contesto della farmacia di comunità. Il testo è però tutt'altro che completo e definitivo. E' infatti la qualità delle pubblicazioni -talvolta non sottoposte a valutazione alla pari o con medio/alto rischio di un qualche *bias*, ovvero di un pregiudizio che possa in qualche modo invalidare i risultati dei trial- nonché le nuove evidenze scientifiche che impongono al lettore la necessità di un continuo aggiornamento, alla luce delle nuove scoperte e della vigente normativa.

COVID-19 E RISPOSTA IMMUNITARIA

COVID-19 è un virus a RNA a filamento singolo (ssRNA) a senso positivo. Studi di modellazione molecolare dimostrano che è circondato da una membrana a doppio strato lipidico, contenente proteine strutturali della membrana (M) e dell'involucro (E). Lo strato esterno contiene anche glicoproteine spike (S) che determinano il caratteristico aspetto a "corona" di questa famiglia di virus. E' proprio tramite le proteine S che il virus lega specifici recettori della cellula ospite al fine di facilitare il processo adesivo e l'ingresso nella cellula medesima. Oltre a queste, sono presenti altre proteine accessorie. Le strutture proteiche virali sono i target degli anticorpi diretti verso il virus. Mutazioni strutturali proteiche, conseguenti a quelle genetiche, si riflettono teoricamente quindi nella riduzione di efficacia e/o sensibilità dei test rapidi rivolti alla valutazione anticorpale dell'individuo.

I test sierologici si basano sulla valutazione (qualitativa oppure quantitativa) degli anticorpi prodotti dai linfociti B. Durante le infezioni, le prime immunoglobuline a comparire nel siero sono le IgM mentre le IgG aumentano la loro quantità nel sangue nel tempo. Normalmente la comparsa degli anticorpi si ha mediamente alcuni giorni dalla comparsa dei sintomi. Ovviamente la difesa immunitaria non si basa solo su anticorpi, ma è anche cellulare, ovvero legata alle cellule T. Una terza categoria di anticorpi, le IgA, sembrano possedere un ruolo importante nella protezione da COVID-19, specie nelle mucose e nella fase acuta del processo infettivo. Quest'ultima categoria di anticorpi, molto sensibili ma poco specifici, potrebbe rappresentare nel futuro un ulteriore target di ricerca anticorpale per una corretta e tempestiva diagnosi. Per quanto concerne la tempistica, si può senz'altro asserire che esiste una certa variabilità della risposta anticorpale individuale, derivata dal modo con cui l'agente patogeno interagisce con il sistema immunitario e dalla diversa risposta immunitaria da paziente a paziente. Nella maggior parte dei casi le immunoglobuline G crescono tra il 10° e 18° giorno dalla comparsa dei sintomi, mentre le IgM compaiono in maniera più incostante (dal 50% al 90% dei pazienti) anche se precocemente rispetto alla precedente classe anticorpale (5-7 giorni dalla comparsa dei sintomi, in media). Per quello che concerne le IgA, queste compaiono tra il 7° e 15° giorno e sono presenti nel 90-95% dei pazienti dopo 3-4 settimane dalla comparsa dei sintomi. Ad oggi non sono disponibili evidenze conclusive in merito alla cinetica di comparsa delle varie classi di anticorpi (IgM, IgG ed IgA) nell'infezione da COVID-

19, con discrepanze derivanti in parte dalle diverse metodologie utilizzate, in parte dalla variabilità individuale già vista e, probabilmente, anche dall'epidemiologia locale delle infezioni determinate da diversi Coronavirus. Un altro studio specifico sul COVID-19 ha evidenziato che le IgA (dirette verso la proteina S del virus) sono elevate in un numero pressoché totale di pazienti (il 100% dopo due settimane), mentre le IgG si elevano, in tutti i casi, dopo 19 giorni. Come era prevedibile la risposta temporale delle IgM è più incostante e si eleva nel 95% dei casi entro 22 giorni dalla comparsa dei sintomi. Studi non definitivi riportano che il titolo anticorpale elevato potrebbe talvolta indicare una prognosi più sfavorevole, forse legata agli effetti delle IgG su altri target immunitari. Alcuni lavori scientifici indicano invece che la classica sequenza di risposta anticorpale, con la comparsa precoce delle IgM seguita da quella delle IgG, non viene sempre rispettata e che ci sono casi in cui la comparsa delle IgG precede o si sovrappone a quella delle IgM. In alcuni i soggetti asintomatici o oligosintomatici non sono stati addirittura rilevati anticorpi entro le prime 4 settimane. Nel grafico seguente sono riassunti (tratto dai dati della fonte bibliografica 15) gli andamenti anticorpali e della carica virale più frequenti durante l'infezione da COVID-19.



Legenda:

- Carica virale
- Sintomi
- IgM
- IgG
- Linea soglia rilevamento tramite tecnica molecolare (tamponi).

I TEST SIEROLOGICI RAPIDI

I test sierologici rapidi sono basati sul prelievo di sangue capillare mediante puntura al polpastrello e sulla valutazione della presenza di IgG e di IgM. In genere si tratta di test qualitativi e la rilevazione viene effettuata o “a colpo d’occhio” o mediante la lettura di un segnale fluorescente mediante un lettore. Il meccanismo di funzionamento è schematizzato nella fig.1.

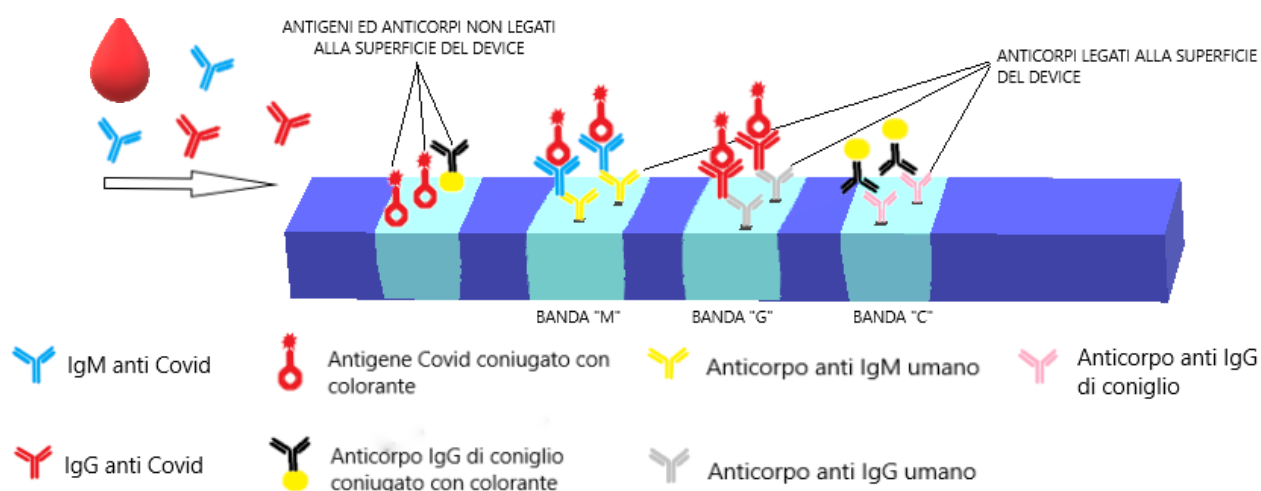


Fig. 1. Gli anticorpi presenti nel sangue (classe IgM e IgG) migrano attraverso una matrice (nitrocellulosa) ed incontrano gli antigeni marcati liberi (legati ad un colorante, spesso particelle d’oro) presenti in un’opportuna porzione del device. Nelle due bande successive (banda M ed G) sono fissati anticorpi sintetici anti IgM ed anti IgG rispettivamente che interagiscono con i complessi antigene-anticorpo anti-COVID precedentemente formati, determinando la colorazione delle stesse porzioni. Gli anticorpi IgG del coniglio, opportunamente coniugati con lo stesso colorante, interagiranno con la porzione “C” del device (contenente anticorpi sintetici anti IgG del coniglio) al fine di verificare che il flusso ematico sia sufficiente e lo strumento funzionante.

Sebbene la metodica presenti una facile esecuzione ed un interessante mezzo attraverso il quale rilevare una risposta anticorpale (abbastanza specifica) presenta diverse criticità. In *primis*, nella fase iniziale dell’infezione, tale ruolo appare di modesta entità (nei sette giorni che intercorrono tra la manifestazione dei sintomi e la valutazione sierologica la presenza di anticorpi era presente solo nel 40% dei casi). In *secundis*, sebbene i test rapidi siano semplici da usare e non richiedano particolari strumenti o personale esperto, non hanno le medesime performance dei test convenzionali. Per la comprensione piena della strumentazione e dei suoi limiti occorre, dunque, conoscere alcuni parametri che la caratterizzano. Si definisce la **sensibilità** dello strumento (test rapido o qualsiasi altro) la capacità di un test di risultare positivo quando applicato ad un malato: più è alta è la sensibilità di un test, più è bassa la probabilità di incorrere in falsi negativi (ossia persone che secondo il test non sono infette, ma che in realtà lo sono). Schematizzando:

ALTA SENSIBILITÀ = alta probabilità che un soggetto malato risulti positivo al test; = bassa probabilità che un soggetto malato risulti negativo al test.

Un risultato negativo di un test sierologico può essere dovuto a tre diverse casistiche:

- il soggetto può non aver mai incontrato il virus o lo ha fatto in tempi remoti e non sono più misurabili gli anticorpi;
- il soggetto è stato infettato molto recentemente e quindi il suo organismo non ha ancora prodotto né IgM né IgG (falso negativo);

- il soggetto è infetto ma il titolo anticorpale è così basso da non essere rilevabile dalla sensibilità del test (falso negativo).

In questi casi la situazione va quindi comunque approfondita attraverso l'indagine molecolare (prelievo con tampone), un esame che dia maggiori certezze sulla presenza o meno di infezione in corso. I falsi negativi sono molto importanti poiché non colgono un'infezione in atto in fase precoce o asintomatica e relativo rischio di contagiosità dell'individuo.

La **specificità** è esattamente l'opposto ovvero è del caso appena visto: è la capacità di un test di risultare negativo se applicato ad un non malato. Schematizzando:

ALTA SPECIFICITA'= alta probabilità che un soggetto sano risulti negativo al test = bassa probabilità che un soggetto sano risulti positivo al test;

La specificità è legata influenzata dalla cross-reattività con altri patogeni affini come altri coronavirus umani, circolanti specialmente durante la stagione invernale. Si deduce che il rilevamento degli anticorpi potrebbe non essere specifico della infezione da COVID-19, soprattutto nella stagione invernale. Ovviamente se il test utilizza come target l'anticorpo verso la proteina spike avrà probabilmente una buona specificità.

L'impatto della specificità dipende però dalla prevalenza (rapporto tra numero totale dei malati ed il numero totale degli individui della popolazione in un dato istante) della malattia nella popolazione. Un test ad alta specificità (anche del 99%), applicato in aree a bassa prevalenza di infezione da COVID-19, ha un valore predittivo positivo (ovvero il nostro risultato positivo sarà un positivo vero o falso?) troppo basso. Questa è un'altra ragione per cui tali test, da soli, non possono rappresentare uno strumento diagnostico completo.

Qual è dunque la valenza di tali indagini sierologiche? In primo luogo assumono la valenza di test epidemiologico sulla diffusione del COVID-19 tra la popolazione. In secondo luogo rilevano una risposta anticorpale, sebbene non precocemente, che potrebbe essere indicativa di una infezione in atto. Da un punto di vista teorico tali test potrebbero inoltre completare, in aggiunta ai test PCR, la valutazione clinica di un processo infettivo, specie in certe fasi. Vi sono diverse prove che la diffusione virale nel sistema respiratorio superiore diminuisca profondamente da 7 a 10 giorni dopo l'infezione, determinando risultati negativi del tampone in almeno il 30-50% dei casi di COVID-19.

Proprio a causa della variabile ed incerta tempistica di comparsa degli anticorpi nonché del loro ruolo nella rimozione del virus COVID-19, i risultati positivi devono essere sottoposti ad indagini diagnostiche più accurate. In aggiunta a ciò il test sierologico, pur rilevando la presenza degli anticorpi, non è tuttavia in grado di sottolineare quale possa essere o possa essere stato il loro ruolo definitivo nella eventuale eliminazione del virus o addirittura nel peggioramento della medesima. Nella nota tecnica ad interim "Test di laboratorio per SARS-CoV-2 e loro uso in sanità pubblica" si ribadisce ufficialmente che i test sierologici rilevano l'esposizione al virus SARS-COV-2, ma non sono in grado di confermare o meno una infezione in atto. Per questo, in caso di positività si necessita di un test molecolare su tampone per conferma.

LA STRUMENTAZIONE E LA SUA NORMATIVA

La normativa dei dispositivi medici in vitro (*IVD-In Vitro Diagnostic Devices*) è in buona parte racchiusa nel D.Lgs 332/00 (recepimento della direttiva 98/79/CE ovvero della normativa speciale dedicata agli IVD), modificato dal D.Lgs 37/2010. Tutti i dispositivi medici, compresi i diagnostici in vitro, per poter essere utilizzabili o vendibili devono possedere il marchio CE (nello strumento, nella confezione e nelle istruzioni). La normativa prevede che per i dispositivi relativi ad alcuni agenti infettivi (quelli elencati nell'allegato II della Direttiva) e per i dispositivi auto-diagnostici (dispositivi utilizzabili dal paziente stesso in ambito domestico) sia necessaria la valutazione

(documentazione, sito produttivo, talvolta anche di singoli lotti) da parte di un Organismo Notificato (O.N.). Tuttavia, proprio a causa della recente apparizione del virus e conseguentemente dei devices dedicati, tali strumentazioni non sono ricomprese nell'Allegato II per cui non è attualmente necessario l'intervento dell'O.N., a meno che si tratti di strumentazioni per autoanalisi. Questo si riflette nella assenza del noto numero a quattro cifre, a seguito del marchio CE, che identifica l'O.N. intervenuto nella valutazione della strumentazione.

Il marchio CE da solo non è sufficiente per indicare la sufficiente qualità clinica dello strumento. La circolare del Ministero della Salute n. 16106, del 9 maggio 2020, afferma che “ la qualità e l'affidabilità di un test dipendono in particolare dalle due caratteristiche di specificità e sensibilità, e pertanto, sebbene non sussistano in relazione ad esse obblighi di legge, è fortemente raccomandato l'utilizzo di test del tipo CLIA e/o ELISA che abbiano una specificità non inferiore al 95% e una sensibilità non inferiore al 90%, al fine di ridurre il numero di risultati falsi positivi e falsi negativi. Al di sotto di queste soglie, l'affidabilità del risultato ottenuto non è adeguata alle finalità per cui i test vengono eseguiti”.

Inoltre, non essendo marcati come test autodiagnostici, non possono essere usati da chi non abbia qualificazione/competenza nel merito e, pertanto, l'eventuale fornitura al pubblico generale sarebbe del tutto incoerente con la loro destinazione d'uso.

LE SANZIONI PREVISTE

Il settore degli IVD viene pienamente a ricadere nel più ampio quadro normativo ed istituzionale comunitario in tema di dispositivi medici, distaccandosi nettamente da quello dei farmaci, cui talvolta viene erroneamente assimilato da taluni operatori del settore. Secondo l'art. 19 del D.Lgs 332/2000 “Chiunque immette in commercio o mette in servizio dispositivi privi della marcatura CE o della dichiarazione CE di conformità è punito, salvo che il fatto sia previsto come reato, con la sanzione amministrativa pecuniaria del pagamento di una somma da 15.493,70 a 92.962,24 €. La stessa pena si applica a chi appone la marcatura CE indebitamente o in maniera tale da violare i divieti di cui all'articolo 15, comma 3, o di cui all'articolo 16, comma 2”.

Si rammenta che gli operatori sanitari, sulla base di quanto rilevato nell'esercizio delle proprie attività, sono tenuti a comunicare immediatamente al Ministero della Salute, direttamente o tramite la struttura sanitaria di appartenenza, qualsiasi incidente ovvero alterazione delle caratteristiche e delle prestazioni di un dispositivo o inadeguatezza nelle istruzioni per l'uso, da cui potrebbe derivare il decesso o il peggioramento delle condizioni di salute di un paziente o di un operatore. La mancata comunicazione da parte del sanitario è punibile con l'arresto del medesimo fino a 6 mesi ed una ammenda da 7.200 a 43.200 € (art. 4, comma 1, lettera “a” del D.Lgs 37/2010). Il mancato ritiro di un d.m., il mancato rispetto del divieto di vendita, di messa in servizio, delle limitazioni o delle particolari condizioni prescritte dal Ministero della Salute sono puniti con l'arresto fino ad un anno ed ammenda da 10.000 € a 100.000 €. Quando le prescrizioni violate riguardano limitazioni o condizioni particolari di immissione in commercio o di messa in servizio, la pena è diminuita in misura non eccedente ad un terzo. queste sanzioni sono previste dall'art. 4, comma 1, lettera “a” del D.Lgs 37/2010; Si deduce infine che, in base al Decreto ministeriale 23 febbraio 2006, non possono essere pubblicizzati i test COVID-19 come tali, poiché non vendibili al pubblico.

CONCLUSIONI

Da un punto di vista operativo si può concludere che:

- le diverse classi di immunoglobuline sono prodotte in tempi diversi: gli studi attualmente disponibili nel caso di COVID-19, fatti salvi pochi studi scientifici e *case report*, non consentono ancora certezze sull'intervallo temporale né sulla sequenza della loro comparsa;
- i test sierologici per COVID-19 sono *test* indiretti, che mettono cioè in evidenza la risposta del sistema immunitario all'infezione: il rilevamento di anticorpi, seppur specifici, non è indicativo né esclude di un'infezione in atto (specie in fase precoce);
- le evidenze ad oggi disponibili indicano che, indipendentemente dal loro ordine di comparsa la positivizzazione degli anticorpi nei soggetti che contraggono l'infezione non coincide con la fine della replicazione virale nelle vie respiratorie, coincidendo talvolta con la progressione della malattia;
- talvolta la risposta immunitaria sembra evanescente o del tutto assente nei soggetti paucisintomatici e asintomatici;
- non è noto con certezza se la presenza delle immunoglobuline di classe G garantisca protezione dalla reinfezione da COVID-19;
- i positivi al test sierologico rapido devono essere indirizzati a metodiche strumentali e/o cliniche di diagnosi più adeguate.

I test rapidi costituiscono uno strumento per la valutazione epidemiologica molto interessante. Per valutazioni epidemiologiche è particolarmente utile il test rapido mentre quello laboratoristico (quantitativo) appare più indicato per valutazioni differenti. I test sierologici possono costituire in definitiva uno strumento per identificare le persone che si sono infettate, nei casi cui non si disponga di un test molecolare, ovviamente con i limiti discussi e con necessità di conferma con ulteriori indagini.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1 Juanjuan Zhao et al.: Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 71, Issue 16, 15 Ottobre 2020;

2 Liu L, Wei Q, Lin Q, et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight* 2019; 4:e123158;

3 Bernd Sebastian Kamps, Christian Hoffmann: Covid reference. Aggiornamento del settembre 2020. *Steinhäuser Verlag*;

4 Mayara Lisboa Bastos et al.: Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis in *BMJ* 2020;370:m2516;

5 Istituto Superiore di Sanità: Dispositivi diagnostici in vitro per COVID-19. Parte 1: normativa e tipologie. https://www.iss.it/documents/20126/0/Rapporto+ISS+COVID-19+28_2020+%281%29.pdf/d65ed767-8dfe-446b-fa3d-dfc19435259d?t=1590047054934;

6 Giuseppe Lippi, Gian Luca Salvagno, Camilla Mattiuzzi: "Guida sintetica alla diagnostica della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19)" in *Biochimica Clinica* 2020; 44(4) 003-004;

- 7 Abdi Ghaffari et al.: COVID-19 Serological Tests: How Well Do They Actually Perform? *Diagnostics* **2020**, 10, 453;
- 8 Federica Facciotti: I test sierologici. <https://sibbm.zanichelli.it/italiano/2020/08/23/test-sierologici/>;
- 9 Roshan J. D'Cruz, Arthur W. Currier e Valerie B. Sampson: Laboratory Testing Methods for Novel Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 468;
- 10 Mitchell H. Katz, MD. Neutralizing Antibodies Against SARS-CoV-2—Important Questions, Unclear Answers *JAMA Intern Med.* 2020;180(10):1362;
- 11 Mustafa K.Özçürümez et al. SARS-CoV-2 antibody testing—questions to be asked. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* Volume 146, Issue 1, July 2020, Pages 35-43;
- 12 Nisreen M A Okba et al.: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis.* 2020 Jul;26(7):1478-1488;
- 13 E K.K.-W. To, O.T.-Y. Tsang, W.-S. Leung, A.R. Tam, T.-C. Wu, D.C. Lung, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*, 20 (2020), pp. 565-574;
- 14 Ministero della Salute - Istituto Superiore di Sanità-Nota tecnica ad interim. Test di laboratorio per SARS-CoV-2 e loro uso in sanità pubblica. Nota di aggiornamento del 23 ottobre 2020;
- 15 Antonio La Marca et al.: Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reproductive BioMedicine Online* Volume 41, Issue 3, September 2020, Pages 483-499;
- 16 Akiko Iwasaki & Yexin Yang :The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nature Reviews Immunology* volume 20, pages339–341(2020);
- 17 David Jacofsky, Emilia M. Jacofsky, Marc Jacofsky: Understanding Antibody Testing for COVID-19. *The Journal of Arthroplasty*, volume 35, issue 7, supplement S74-S81, July 01,2020.