Forum
Laboratori
Clinici

FORUM LABORATORI CLINICI

Suggerimenti operativi nella diagnosi e screening di Laboratorio del Covid-19

Premessa

La Pandemia Covid-19 ha richiesto una così grande mole di accertamenti di laboratorio da coinvolgere non soltanto i laboratori specialistici ma l'intera rete di laboratori del Paese pubblici e privati ed in particolare i grandi laboratori ospedalieri che per loro natura posseggono la struttura professionale, organizzativa, tecnologica e produttiva per fornire e mettere a disposizione della comunità grandi volumi di test diagnostici indispensabili nella lotta contro il virus. In questo senso sono crollate le barriere esistenti tra le diverse branche specialistiche della Medicina di Laboratorio ed il cittadino/paziente è stato posto al centro del sistema.

In particolare fin dall'inizio della pandemia da virus SARS-CoV-2, il laboratorio clinico ha cercato di utilizzare test sempre più affidabili e robusti per la corretta individuazione del virus SARS-CoV-2 al fine di identificare sia i soggetti asintomatici/paucisintomatici infetti e potenziali veicolo di diffusione del virus, sia i pazienti sintomatici affetti dalla malattia COVID-19.

La brevissima sintesi qui riportata vuole puntualizzare le principali caratteristiche dei test diagnostici utilizzabili ed il loro campo di applicazione nell' attività di prevenzione della trasmissione virale così come nella diagnosi della malattia Covid-19, sia all'interno che all'esterno dei laboratori ospedalieri.

I test per la diagnosi di presenza di positività al virus SARS-CoV-2 utili alla diagnosi della patologia COVID-19 possono essere distinti in tre grandi categorie (World Health Organization. Target product profiles for priority diagnostics to support response to the COVID-19 pandemic v.1.0. Geneva:WHO;2020):

- diagnosi mediante tampone molecolare ovvero determinazione della presenza del RNA virale;
- diagnosi mediante tampone rapido per la determinazione di antigeni rappresentativi di componenti virali;
- test sierologici per la determinazione di anticorpi di classe IgG ed IgM, rivolti contro il Virus SARS-CoV-2.

Preliminarmente si deve considerare che, nei test diagnostici utilizzabili per determinare la presenza o meno dell'infezione da SARS-CoV-2 (in particolare nel caso dei test antigenici e nei test sierologici anticorpali verso il virus SARS-CoV-2), le caratteristiche di sensibilità e specificità analitica, nonché sensibilità, specificità clinica, accuratezza diagnostica e valore predittivo sono basati sui dati forniti dal produttore mancando studi clinici indipendenti di robustezza adeguata. In particolare mancano dati di ampia casistica anche quando i diagnostici siano autorizzati trattandosi in realtà di autocertificazioni. Per sopperire a questa criticità, la Foundation for Innovative New Diagnostic (FIND) ha creato un sito ove è possibile consultare le varie ricerche che documentano i dati dei vari test dalle prime fasi di sviluppo fino alla loro approvazione (https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=show-all#diag_tab).

In questo contesto il Forum dei Laboratori Clinici si mette a disposizione per eventuali richieste di approfondimento dei parametri sopra indicati ed indispensabili per il corretto utilizzo di qualsiasi metodo/ tecnologia di Laboratorio.

Date le dimensioni delle strutture dirette dai professionisti che fanno riferimento al FLC, il processo di verifica di quanto riportato dalle Aziende produttrici nonché di validazione clinica delle metodiche sarebbe estremamente rapido ed efficace.

Test Molecolari

In genere si effettua il test diagnostico molecolare basandosi su una tecnica di retrotrascrizione ed amplificazione del RNA virale, capace di rilevare la presenza del genoma del virus SARS-CoV-2 nel campione biologico. Questo viene normalmente ottenuto attraverso l'esecuzione di un tampone oro-naso-faringeo. Questo tipo di esame è altamente sensibile e specifico perché permette di identificare i geni bersaglio propri del virus presenti nel campione biologico del paziente e di misurare le concentrazioni delle sequenze target.

Questi saggi permettono di ottenere una curva di amplificazione virale misurabile come ciclo soglia (CT), ove il valore espresso è inversamente proporzionale alla quantità di target genico presente nel campione. Di conseguenza tanto più il CT sarà basso, maggiore sarà il numero delle molecole virali presenti nel campione e di converso CT elevati sono evocativi di bassa presenza di target virali. Ad oggi, la rt-Real Time PCR è considerata il "gold standard" per la diagnosi di positività al virus SARS-CoV-2 e la diagnosi della malattia COVID-19, infatti la determinazione dell'RNA virale di SARS CoV2 eseguita in laboratorio nei campioni clinici è l'esame di riferimento riconosciuto internazionalmente per avere un' adeguata sensibilità e specificità cliniche e quindi in grado di determinare anche la presenza di una bassa carica virale in soggetti asintomatici o pre-sintomatici.

Tale metodica deve essere eseguita in laboratori con competenze, tecnologie analitiche ed esperienza adeguate. Il risultato può essere ottenuto in ragione delle metodologie utilizzate e dell'organizzazione in 3-5 ore o anche 24-48 ore in ragione dei carichi di lavoro e dei flussi produttivi.

Possono essere eseguiti test molecolari "rapidi" che hanno una sensibilità e specificità simili ai test più convenzionali e quindi con performances adeguate. Questi test tuttavia sono contingentati nell'ambito del mercato nazionale e internazionale ed inoltre sono eseguiti su strumentazioni con una produttività ridotta rispetto alla metodica tradizionale. Con i test rapidi molecolari il risultato in genere viene ottenuto in circa 1 ora.

Da sottolineare che le modalità di raccolta del campione biologico attraverso il tampone naso-faringeo sono estremamente importanti per la buona riuscita del test molecolare e per questo gli operatori che eseguono tale prelievo debbono essere adeguatamente formati. Inoltre è molto importante la tempistica di esecuzione del tampone rispetto al possibile contagio. Si richiedono almeno 24-48 ore perché una eventuale replicazione del virus sia evidenziabile come positività. Quindi in caso di soggetto asintomatico contatto di un soggetto positivo, l'esecuzione del tampone deve essere fatta tenendo conto di questa tempistica e se negativo ripetuto a distanza di altre 24 ore soprattutto in caso di comparsa di sintomatologia.

Recentemente, a causa della difficoltà di approvvigionamento di strumenti e reagenti a fronte di un'aumentata richiesta di tamponi molecolari, è stata proposta la possibilità di eseguire in prima istanza il dosaggio di un pool di campioni biologici ottenuti da diversi soggetti. Qualora il dosaggio del RNA virale risultasse positivo nel pool viene poi eseguita l'analisi dei singoli campioni biologici al fine di individuare il soggetto o i soggetti positivi appartenenti al pool. Questa metodica deve essere validata in ciascun laboratorio, comprendere un massimo di 10 individui per pool ed essere utilizzata soltanto in contesti di bassa prevalenza (<1%) per essere economicamente e organizzativamente conveniente. Quindi si suggerisce, per le caratteristiche proprie del pooling, di applicare questa metodica a popolazioni ritenute a bassa prevalenza, come la sorveglianza di operatori sanitari, protocolli di sorveglianza aziendale, pazienti in regime di pre-ricovero, ossia popolazioni in cui la probabilità di trovare individui positivi è bassa.

Test Antigenico rapido eseguito su tampone nasale, naso-oro-faringeo o salivare

I test antigenici sono test di tipo diretto perché identificano la presenza del virus nel campione biologico tramite la determinazione delle proteine virali chiamate antigeni, sia come proteine intere o parti di esse, in particolare viene misurata la eventuale presenza della proteina S (Spike), o N (nuclecapside) presenti sulla superficie del virus. I test si basano sulla reazione tra anticorpi (come substrato per la reazione) in grado di legarsi alle proteine virali con la conseguente lettura di questo legame quando si ha la presenza del virus nel campione biologico (tampone) del paziente. Il risultato di questa reazione può essere o qualitativa per presenza/assenza a lettura visiva diretta da parte di un operatore oppure può essere effettuata mediante una strumentazione che fornisce un risultato numerico e quindi una quantificazione oggettiva dell'antigene virale anche in ambito di Point of Care con collocazione esterna al laboratorio.

Il test antigenico può essere utile quando si voglia una risposta analitica rapida e organizzativamente sostenibile, quando i tempi d'esecuzione del test siano un elemento condizionante in quanto il test antigenico può offrire una risposta in 15-30 minuti. Ulteriori vantaggi del test antigenico sono che non richiede personale altamente specializzato per le metodologie analitiche utilizzate, che la strumentazione è facilmente trasportabile e implementabile in postazioni decentrate e che la disponibilità dei reagenti è sufficientemente ampia. Purtroppo vi sono condizioni che possono portare a un risultato falsamente negativo quale la bassa concentrazione di antigene virale e la conseguente insufficiente sensibilità del test a rilevarne la presenza, un prelievo inadeguato, il trasporto improprio o la scorretta conservazione che possa determinare una degradazione campione.

In sintesi le criticità maggiori in rapporto all'utilizzo del test antigenico sono stanzialmente tre: la minore sensibilità e specificità rispetto al test molecolare, la mancanza di studi clinici indipendenti sulle performances diagnostiche di questi esami e quindi la necessità di doversi affidare a quanto dichiarato dal produttore, la difficile tracciabilità.

Da sottolineare la recente introduzione nei Laboratori Clinici di test antigenici NON rapidi ma eseguibili con metodiche di routine sicuramente più affidabili rispetto ai test rapidi in termini di sensibilità e specificità analitica e clinica (metodologie Immunoenzimatica e Chemiluminescenza). Le strumentazioni che eseguono questi test sono già ampiamente diffuse e disponibili nei laboratori clinici.

Test Antigenico o molecolare (rt)-real Time PCR eseguito su saliva

I test salivari potrebbero offrire per la semplicità e non invasività del prelievo una soluzione efficiente nel processo diagnostico per l'identificazione di soggetti positivi al Sars-CoV-2, ma sono ancora in fase di sperimentazione e valutazione sebbene di probabile prossima introduzione. Da sottolineare che le migliori perfomances si ottengono dalla saliva del retro-faringe raccolta con la collaborazione attiva del soggetto.

Sono stati validate anche modalità di raccolta della saliva utilizzando salivette, ossia spugnette che messe in bocca si impregnano di saliva e poi vengono messe in contenitore primario di raccolta (provetta) e a sua volta in un contenitore secondario di trasporto. La saliva raccolta in tale modo attraverso centrifugazione risulta concentrata in modo da assicurare un'idoneità del campione che massimizzi la probabilità di rilevazione delle proteine virali. L'utilizzo delle saliva sembra essere appropriato soprattutto in particolari popolazioni quali soggetti in età pediatrica in contesti come le scuole o i drive-in pediatrici e soggetti anziani in cui l'uso di anticoagulanti predispone facilmente ad epistassi o sanguinamenti oppure in soggetti non collaborativi all'esecuzione del tampone.

Strategie di Utilizzo per Test Molecolare e test antigenico per diagnosi di Sars-CoV-2

1) In soggetti sintomatici con o senza contatto stretto esplicitamente identificato e tracciato, nei soggetti sintomatici in quarantena, nei contatti stretti conviventi con soggetti fragili, negli asintomatici per ricovero programmato ospedaliero o per l' ingresso in comunità chiuse (ad esempio CRA), nello screening per operatori sanitari, nei soggetti in isolamento per conferma della guarigione, nei contatti asintomatici in quarantena per conferma di guarigione è indicato come test di prima scelta il test molecolare su tampone oro-naso-faringeo. In queste condizioni il test rapido antigenico è di seconda scelta qualora il test molecolare non sia disponibile per motivi di approvvigionamento o per problematiche di sostenibilità da parte del laboratorio e/o della rete di laboratori.

2) Nei soggetti asintomatici o paucisintomatici senza contatto epidemiologico, negli screening di comunità, nei contatti stretti asintomatici con richiesta d'esame su base volontaria per finalità lavorative, di viaggi all'estero o di ritorno, nei soggetti asintomatici proveniente da Paesi individuati come a rischio, può essere indicato il test antigenico rapido su tampone orofaringeo perché eseguibile rapidamente anche in Point of Care Testing decentrati nella sede di prelievo.
Il principale limite, in questo caso del test antigenico è, come detto, la minore sensibilità rispetto al test molecolare e quindi la possibilità di avere risultati falsamente negativi. I vantaggi consistono nella rapidità del risultato e nella disponibilità di volumi di esami importanti. È da prevedersi la conferma molecolare dei risultati positivi ai test rapidi antigenici soprattutto nei contesti di bassa prevalenza dell'infezione dove si possono presentare molti falsi positivi.

Test Sierologici

I test sierologici misurano l'esposizione e il contatto con il virus con conseguente produzione di anticorpi specifici IgG e IgM contro il virus SARS-CoV-2, dopo almeno 10 giorni dall'infezione. I test sierologici non sono in grado di definire la presenza effettiva del virus e non sono quindi test diagnostici diretti in grado di rilevare la presenza dell'infezione.

Di conseguenza è sempre necessario un test di conferma diretto quando si voglia una diagnosi d'infezione in atto. Non esiste una normativa di legge vincolante se non una raccomandazione ministeriale (circolare del Ministero della Salute 16106 del 9 maggio 2020) a utilizzare test di laboratorio del tipo Chemiluminescenza e/o Immunoenzimatica con una specificità non inferiore al 95% e una sensibilità non inferiore al 90% per ridurre (non eliminare, falsi positivi o falsi negativi), sotto queste soglie il risultato ottenuto non è adeguato alle finalità diagnostiche. Da considerare che i numerosissimi test rapidi a lettura diretta da parte dell'operatore (saponette o card) hanno caratteristiche di qualità basate sull'autodichiarazione del produttore, non viene tracciata l'esecuzione, e non si hanno garanzie sull'efficacia diagnostica derivante dal loro impiego.

I test sierologici eseguiti con tecnologie Immunoenzimatica e Chemiluminescenza presso i laboratori clinici, oltre ad assicurare la tracciabilità dal momento del prelievo al momento della refertazione, in genere hanno mostrato sensibilità e specificità cliniche superiori ai test rapidi per anticorpi eseguiti con saponette/card.

Quando eseguire un test di laboratorio e quale test eseguire

È estremamente importante che il test di laboratorio sia eseguito nei tempi corretti rispetto all'evoluzione dell'infezione. Dal punto di vista concettuale va ben distinta la data d'inizio del contagio dalla data d' inizio della sintomatologia e le date d' inizio e termine della contagiosità.

In genere il periodo d'incubazione è di 7-14 giorni ma può variare da soggetto a soggetto, la contagiosità inizia generalmente dopo pochi giorni dall'inizio dell'infezione (2-3 gg); la durata della contagiosità non è ancora ben definibile ma certamente non inferiore a 21 giorni dall'inizio della sintomatologia.

La probabilità che un test di laboratorio risulti positivo in presenza di un soggetto infetto da SARS-CoV2 dipende dal momento in cui viene eseguito la specifica tipologia di test:

1. Il test molecolare tradizionale o rapido in genere risulta positivo pochi giorni prima dell'inizio della sintomatologia, raggiunge la massima sensibilità dopo una settimana (picco del RNA virale) e si negativizza dopo circa 3 settimane;
2. Il test antigenico risulta positivo soltanto in presenza di una carica virale moderatamente alta o alta e quindi sicuramente dopo la positività del test molecolare;
3. Il dosaggio delle IgM risulta in genere positivo dopo 5-7 giorni dall'inizio della sintomatologia e si negativizza dopo circa 30 giorni dall'inizio dei sintomi;
4. Il dosaggio delle IgG risulta in genere positivo dopo 10-14 giorni dall'inizio dei sintomi e permane elevato nella maggioranza dei soggetti dopo almeno 3 mesi.

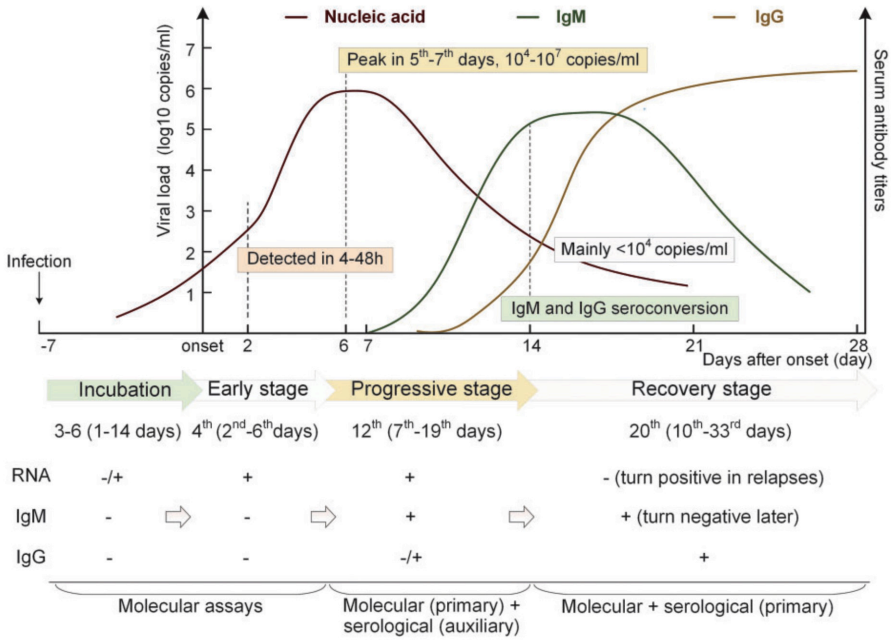
Non sappiamo ancora con certezza quale percentuale di questi anticorpi abbia un potere neutralizzante il virus e quindi non conosciamo il livello sierico di anticorpi necessario a proteggere gli individui da possibili re-infezioni.

Il FLC ritiene inoltre di fondamentale importanza l'armonizzazione delle refertazioni per tutte le metodiche molecolari ad oggi disponibili e quindi stabilire quali target genetici vadano considerati in via prioritaria, quale è il CT soglia per la positività, esprimere il risultato in "copie virali/ml"; armonizzare le soglie di positività degli esami sierologici e antigenici qualora eseguiti su strumentazione che riporti dati numerici. Molto più difficile se non impossibile la standardizzazione degli esami sierologici e antigenici su saponette/card a lettura diretta da parte dell'operatore.

Il FLC è disponibile a collaborare in questa azione di armonizzazione delle metodiche.

Nella scelta del test da utilizzare, oltre alla tempistica dell'infezione va anche considerata la Prevalenza della malattia nel contesto locale. Test con minore sensibilità (es. dosaggio dell'antigene) possono essere utili soltanto in contesti ad alta Prevalenza dell'infezione e dei contagi.

In conclusione, l'esperienza della pandemia ci offre importanti indicazioni per il futuro ed ha evidenziato molte criticità derivanti dalle recenti riorganizzazioni della rete dei Laboratori pubblici italiani. Riteniamo necessaria la creazione di una efficace rete territoriale dei laboratori pubblici che, insieme ai laboratori privati accreditati, agisca sinergicamente difronte alle emergenze e non solo, che non sia parcellizzata all'interno delle singole aziende sanitarie. Inoltre la pandemia ha dimostrato che la concentrazione di alcune competenze in poche strutture specialistiche su grandi territori non è stata sufficiente ad affrontare l'enorme richiesta di dati diagnostici e ha determinato la mancanza di un numero adeguato di professionisti formati per l'emergenza pandemica. In aggiunta, la recente esperienza delle analisi decentrate sul territorio al di fuori dei Laboratori clinici, pur se necessaria in questa emergenza, non può assicurare le caratteristiche di Qualità, affidabilità e tracciabilità proprie dei Laboratori Clinici.



Jiping Shi et al.
Clinical Chemistry 66:8;
1030–1046 (2020)

Il Forum dei Laboratori Clinici (aggregazione spontanea di Direttori di Laboratori Clinici pubblici e privati, universitari ed ospedalieri, nata nell'emergenza della pandemia) auspica un nuovo approccio alla Medicina di Laboratorio dopo la pandemia, nel quale siano finalmente abbattute le barriere tra le diverse Discipline; sia avviato un percorso di formazione degli operatori alle nuove tecnologie disponibili e a quelle emergenti; vengano presi in considerazione nuovi modelli organizzativo-manageriali; venga sviluppata diffusamente la digitalizzazione dei dati e attivata la gestione degli stessi attraverso le nuove capacità dell'Informatica.

Il Forum dei Laboratori Clinici è disponibile ad un dialogo con le Istituzioni nel quale possa fornire competenze tecnico-scientifiche e nuove idee per il raggiungimento di una sinergia ottimale tra la Medicina di Laboratorio di Prossimità e la Medicina di Laboratorio Ospedaliera ponendo sempre al centro del sistema il cittadino ed il paziente.

Il Forum dei Laboratori Clinici
(in ordine alfabetico)

Silvia Angeletti (Campus Biomedico, Roma)
Edmondo Adorisio (Ospedale Di Venere, Bari)
Rosalia Aloe (Azienda Ospedaliera Universitaria di Parma)
Sergio Bernardini (Policlinico Tor Vergata, Roma)
Paolo Bucchioni (AUSL 5 Liguria, Sarzana)
Graziella Calugi (Lifebrain, Guidonia, RM)
Paolo Carraro (Azienda UUSL 3 Serenissima Veneto)
Patrizia Casprini (AUSL Centro Toscana)
Maurizio D'Amora (ASL 1 Napoli Centro)
Giorgio Da Rin (IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova)
Romolo Dorizzi (AUSL Romagna)
Cristina Kullmann (Synlab, Brescia)
Giovanni Guerra (ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo)
Rita Mancini (AUSL Bologna)
Giulio Mengozzi (Azienda Ospedaliera Universitaria Città della Salute e della Scienza , Torino)
Agostino Ognibene (AUSL SudEST Toscana)
Massimo Quercioli (Synlab, Firenze)
Maurizio Ruscio (ASUGI Trieste)
Elisabetta Stenner (USL Nord-Ovest Toscana)
Tommaso Trenti (Azienda Ospedaliera Universitaria -AUSL Modena)