Covid. Interpretare i test diagnostici

Data 28 maggio 2020
Categoria infettivologia

Covid. Interpretare i test diagnostici

La conoscenza dei test diagnostici per il coronavirus SARS-CoV-2 è ancora in evoluzione e una chiara comprensione della natura dei test e l'interpretazione dei loro risultati sono ancora oggetto di studi.

Il link sotto mostra la variazione stimata nel tempo nei test diagnostici per il rilevamento dell'infezione da SARS-CoV-2 in relazione all'insorgenza dei sintomi.(1)

https://tinyurl.com/ybv2mpy4

A causa della variabilità dei valori tra gli studi, gli intervalli di tempo stimati devono essere considerati approssimazioni e la probabilità di rilevazione dell'infezione da SARS-CoV-2 è di tipo qualitativo.

Rilevazione di RNA virale mediante RT-PCR

Il test più comunemente usato e affidabile per la diagnosi di COVID-19 è il RT-PCR eseguito utilizzando tamponi rinofaringei o altri campioni del tratto respiratorio superiore o, più recentemente, su saliva. Vari geni RNA sono utilizzati, la maggior parte mirati a 1 o più geni envelope (env), nucleocapsidi (N), spike (S), RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) e ORF1 . Le sensibilità dei test ai singoli geni sono comparabili secondo gli studi di confronto. Nella maggior parte degli individui con infezione sintomatica di COVID-19, l'RNA virale nel tampone rinofaringeo è rilevabile già dal primo giorno dei sintomi e il picco entro la prima settimana dall'esordio dei sintomi. Il Ct (cycle threshold) è il numero di cicli di replicazione richiesti per produrre un segnale fluorescente, con valori Ct più bassi che rappresentano carichi di RNA virale più elevati. Un valore Ct inferiore a 40 è definito come RT-PCR positivo. Questa positività inizia a diminuire entro la terza settimana e successivamente diventa non rilevabile. Tuttavia, i valori Ct ottenuti in pazienti ospedalizzati gravemente malati sono inferiori ai valori Ct dei casi lievi e la positività della RT-PCR può persistere oltre 3 settimane dopo l'insorgenza della malattia quando la maggior parte dei casi lievi produrrà un risultato negativo. Tuttavia, un risultato RT-PCR "positivo" riflette solo il rilevamento dell'RNA virale e non indica necessariamente la presenza di virus vitale. In alcuni casi, l'RNA virale è stato rilevato da RT-PCR anche oltre la sesta settimana dopo il primo test positivo. Alcuni casi sono stati segnalati positivi anche dopo 2 test RT-PCR negativi consecutivi eseguiti a distanza di 24 ore. Non è chiaro se si tratta di un errore, reinfezione o riattivazione. In uno studio su 9 pazienti, i tentativi di isolare il virus in coltura non hanno avuto successo oltre l'ottavo giorno di insorgenza della malattia. I Centers for Disease Control and Prevention (CDC) definiscono la guarigione clinica, basata sui sintomi, quando sono trascorsi 3 giorni senza febbre e senza l'uso di farmaci antipiretici e miglioramento dei sintomi respiratori, come tosse o mancanza di respiro, e sono trascorsi almeno 10 giorni dalla prima comparsa dei sintomi. La sequenza temporale della positività della PCR varia seconda della sede del prelievo. La positività della PCR diminuisce più lentamente nell'espettorato e può essere ancora positiva dopo che i tamponi rinofaringei sono negativi. La positività della PCR nelle feci è stata osservata in 55 pazienti su 96 (57%) ed è rimasta positiva nelle feci per una mediana da 4 a 11 giorni dopo negatività del tampone rinofaringeo, ma non era correlata alla gravità clinica. In uno studio su 205 pazienti con infezione da COVID-19 confermata, la positività RT-PCR è risultata più elevata nei campioni di lavaggio broncoalveolare (93%), seguita da espettorato (72%), tampone nasale (63%) e tampone faringeo (32%) . I risultati falsi negativi si sono verificati principalmente a causa di una tempistica inappropriata della raccolta del campione in relazione all'insorgenza della malattia e alla carenza della tecnica di campionamento, in particolare dei tamponi rinofaringei. La specificità della maggior parte dei test RT-PCR è del 100%. Occasionalmente possono verificarsi risultati falsi positivi a causa di errori tecnici e contaminazione dei reagenti. (1)

Rilevazione di anticorpi verso SARS-CoV-2
Anche la diagnosi sierologica sta diventando uno strumento importante per comprendere l'estensione di COVID-19 nella comunità e per identificare le persone immuni e potenzialmente "protette" dall'infezione.
Il marker sierologico più sensibile e più precoce sono gli anticorpi totali, i cui livelli iniziano ad aumentare a partire dalla seconda settimana di insorgenza dei sintomi. Sebbene ELISA IgM e IgG si siano dimostrate positive già dal quarto giorno dopo l'insorgenza dei sintomi, si verificano livelli più elevati nella seconda e terza settimana di malattia. Ad esempio, in due studi la sieroconversione di IgM e IgG si è verificata in tutti i pazienti tra la terza e la quarta settimana di insorgenza della malattia. Successivamente le IgM iniziano a diminuire e raggiungono livelli più bassi entro la quinta settimana e quasi scompaiono entro la settima settimana, mentre le IgG persistono oltre le sette settimane. In uno studio su 140 pazienti, il confronto tra la sensibilità della PCR e delle IgM ELISA dirette all'antigene nucleocapsidico (NC) era del 98,6% contro il 51,9% con un singolo test PCR. Durante i primi 5 giorni, la PCR quantitativa ha mostrato un tasso di positività più elevato rispetto alle IgM, mentre ELISA IgM ha mostrato un tasso di positività più elevato dopo il giorno 5 della malattia. I test sugli anticorpi IgM e IgG basati su ELISA hanno una specificità superiore al 95% per la diagnosi di COVID-19. Il test di campioni di siero accoppiati con la PCR iniziale e le 2 settimane dopo può aumentare ulteriormente l'accuratezza diagnostica. In genere, la maggior parte degli anticorpi viene prodotta contro la proteina più abbondante del virus, che è l'NC. Pertanto, i test che rilevano gli anticorpi anti-NC sarebbero i più sensibili. Tuttavia, il

recettore della proteina S (S-RBD, Receptor-Binding Domain) è la proteina necessaria affinché avvenga il primo legame della proteina S di SARS-CoV-2 al recettore cellulare ACE2 umano e gli anticorpi anti-RBD-S sarebbero più specifici e ci si aspetta che siano neutralizzanti. Pertanto, l'uso di uno o entrambi gli antigeni per rilevare IgG e IgM comporterebbe un'alta sensibilità. Gli anticorpi possono tuttavia avere reattività crociata con SARS-CoV e possibilmente altri coronavirus. I test rapidi point-of-care per la rilevazione di anticorpi sono stati ampiamente sviluppati e commercializzati e sono di qualità variabile. Molti produttori non rivelano la natura degli antigeni utilizzati. Questi test sono di natura puramente qualitativa e possono solo indicare la presenza o l'assenza di anticorpi SARS-CoV-2. Tuttavia, titoli elevati di anticorpi IgG rilevati da ELISA hanno dimostrato di correlarsi positivamente con anticorpi neutralizzanti. La persistenza a lungo termine e la durata della protezione conferita dagli anticorpi neutralizzanti rimangono sconosciute. (1)

Conclusioni

Usando le prove disponibili, è stata ideata una sequenza temporale clinicamente utile di marker diagnostici per il rilevamento di COVID-19. La maggior parte dei dati disponibili riguarda le popolazioni adulte che non sono immunocompromesse e molte altre domande ancora senza risposta ci attendono. Per ora tutti gli studiosi concordano che i test sierologici hanno valenza epidemiologica per determinare la prevalenza della dalla SARS-CoV-2 nella popolazione con particolare attenzione ai casi asintomatici, molto frequenti. Prevalenza che è fondamentale per la valutazione dei casi positivi con i test sierologici a tappeto. Nell'attuale pandemia, nella maggior parte dei casi è preferito massimizzare la specificità e quindi il valore predittivo positivo in un algoritmo sierologico, poiché la prevalenza complessiva di anticorpi nella maggior parte delle popolazioni è probabilmente bassa. Ad esempio, in una popolazione in cui la prevalenza è del 5%, un test con una sensibilità del 90% e una specificità del 95% produrrà un valore predittivo positivo del 49%. In altre parole, meno della metà di coloro che risultano positivi avrà veramente anticorpi. In alternativa, lo stesso test in una popolazione con una prevalenza di anticorpi superiore al 52% produrrà un valore predittivo positivo maggiore del 95%, il che significa che meno di una persona su 20 che risulta positiva avrà un risultato falso positivo.

Tre strategie possono essere utilizzate per migliorare il valore predittivo positivo:
* La scelta di un test con una specificità molto elevata, forse del 99,5% o superiore, produrrà un alto valore predittivo positivo nelle popolazioni testate con prevalenza > 5%.
* Un'altra strategia è quella di focalizzare i test su persone con un'alta probabilità pre-test di avere anticorpi SARS-CoV-2, come persone con una storia di malattia simile a COVID-19.
* Un terzo approccio consiste nell'utilizzare un algoritmo di test ortogonale in cui le persone che inizialmente risultano positive sono testate con un secondo test. Gli algoritmi ortogonali efficaci si basano generalmente sul test di un campione di paziente con due test, ciascuno con caratteristiche di progettazione uniche. (2,3)

ClementinoStefanetti

Bibliografia
1.Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020 May 6.
2.Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing in Clinical and Public Health Settings. CDC https://tinyurl.com/y984stjv
3.Serological testing for SARS-CoV-2 antibodies. American Medical Association. https://tinyurl.com/ydyb9lub