

**Prot. 001-2021**

Milano, 4 gennaio 2021

## Indicazioni operative AMCLI su quesiti frequenti relativi alla diagnosi molecolare di infezione da SARS-CoV-2

### **Appropriatezza dell'esecuzione del saggio real-time RT-PCR specifico per SARS-CoV-2**

Gli esami di laboratorio sono uno strumento fondamentale per garantire la diagnosi dell'infezione e l'assistenza del malato. Allo stesso tempo, però, devono essere utilizzati con competenza. Infatti, una richiesta inappropriata rischia di fornire risultati fuorvianti nell'interpretazione delle condizioni di salute del paziente. Pare evidente, che la questione da derimere sia dare indicazione in merito a quale test di screening sia opportuno utilizzare nella pratica quotidiana. I test antigenici licenziati inizialmente (test immunocromatografici lateral flow) gravati da grande variabilità in relazione anche alla matrice biologica utilizzata, risentono egualmente della prevalenza dell'infezione nella popolazione e devono essere riservati al contact tracing.

Al contrario, i test antigenici a lettura fluorescente hanno migliori prestazioni ed in particolar modo quelli di più recente introduzione (immunofluorescenza con lettura in microfluidica) sembrano mostrare risultati sovrapponibili a quelli del saggio di real-time RT-PCR. L'uso dei test a fluorescenza è indicato in un setting a bassa prevalenza di infezione, ad. es. il personale sanitario (Drain et al. 2020; ECDC November 19 2020).

Il saggio di real-time RT-PCR per l'identificazione dell'RNA di SARS-CoV-2 nei secreti nasofaringei deve essere considerato solo a scopo diagnostico e va utilizzato in presenza di un forte sospetto clinico di infezione o in presenza di un contatto stretto con un soggetto con positività accertata. Pertanto, va sottolineato che questo saggio non è da considerarsi adeguato allo screening di massa della popolazione. Infatti, più è bassa la probabilità di avere un vero positivo più diminuisce il valore predittivo positivo del test (Pham Huy P et al. Laboratory medicine 2020; Loh Tze Ping et al. Clinical biochemistry, 2020).

I test di rilevazione molecolare o antigenica di SARS CoV-2 non trovano indicazione scientifica al di fuori di tali casi (diagnosi eziologica dei casi di "malattia da infezione da SARS CoV-2" i primi, contact tracing dei casi di "infezione da SARS CoV-2" i secondi). Perciò, l'utilizzo di test diagnostici al di fuori di tali indicazioni si configura come un ricorso "inappropriato" alla diagnostica virologica, che si traduce in un'inappropriata gestione delle risorse (economiche, strumentali, umane).

### **Saggi ripetuti a distanza di tempo e determinazione della fase di infezione**

In base alla circolare del Ministero della Salute n. 0032850 del 12/10/2020 (Circ. Min. 0032850 del 12/10/2020 "COVID-19: indicazioni per la durata ed il termine dell'isolamento e della quarantena") nei soggetti sintomatici, dopo 21 giorni dal primo test positivo ed in assenza di sintomatologia da almeno 7 giorni (escluse anosmia ed ageusia), non è necessario eseguire alcun test per porre termine al periodo di isolamento.

La decisione del Ministero della Salute, corroborata dalle linee guida dell'organizzazione Mondiale della Sanità (OMS, WHO/2019-nCoV/Sci\_Brief/Discharge\_From\_Isolation/2020.1) e dai Centers for Diseases Control and Prevention americani ed europei (CDC, Duration of Isolation & Precautions for Adults, Updated Oct. 19, 2020; ECDC, Guidance for discharge and ending isolation of people with COVID-19, 16 October 2020), si basa sui dati pubblicati che la comunità scientifica in questi mesi ha condiviso. Infatti, è stato ampiamente dimostrato, che la presenza a basso titolo dell'RNA virale (determinabile semiquantitativamente sulla base di elevati Ct) nelle fasi tardive dell'infezione (soprattutto se vengono utilizzati saggi che hanno come target geni virali più espressi di altri), non è supportata dalla possibilità di isolare il virus, se non nel 2-5% dei casi, né tantomeno di trasmettere l'infezione grazie anche alla comparsa dell'immunità umorale specifica (Paul A. Rota, et al. Science May 2003; Piralla et al. IJID 2020; Wölfel, R., et al. Nature 2020; Myungsun Park, et al Exp Mol Med. 2020). In altri termini il rischio di avere un soggetto ancora positivo dopo 21 giorni dalla prima positività e che lo stesso, tornando in comunità, possa contagiare l'infezione altri soggetti è sostanzialmente trascurabile (Liotti et al, JAMA Intern. Med., 2020).

Dal punto di vista biologico, è opportuno rammentare che SARS-CoV-2 è un virus con genoma RNA a filamento positivo, quindi con lo stesso orientamento dei diversi messaggeri virali i quali vengono pertanto amplificati assieme al genoma. Inoltre, i diversi messaggeri sono espressi in maniera quantitativamente differente, quindi il segnale generato in real-time PCR non è uguale per tutti i geni virali. Tuttavia, solo la presenza del genoma virale integro è espressione diretta di avvenuto completamento del ciclo replicativo e di infettività.

Pertanto, si sconsiglia fortemente la ripetizione al di fuori dei tempi indicati dalle Circolari Ministeriali di saggi molecolari in soggetti/pazienti con una precedente positività accertata dopo l'avvenuta negativizzazione del test molecolare su tampone naso faringeo.

Nel caso in cui sussista un forte sospetto diagnostico di polmonite da SARS-CoV-2, ma ci si trovi in presenza di risultati di real-time RT-PCR su tampone nasofaringeo ripetutamente negativi, si consiglia l'analisi di campioni biologici alternativi, come ad esempio i campioni raccolti dalle basse vie respiratorie (e.g. lavaggio broncoalveolare o aspirato bronchiale). In questi casi è anche utile ricorrere ai saggi sierologici, nella tabella riportata di seguito sono indicati i test diagnostici utili durante le diverse fasi di infezione (Lippi G. et al. 2020).

Infatti, si possono distinguere tre fasi principali:

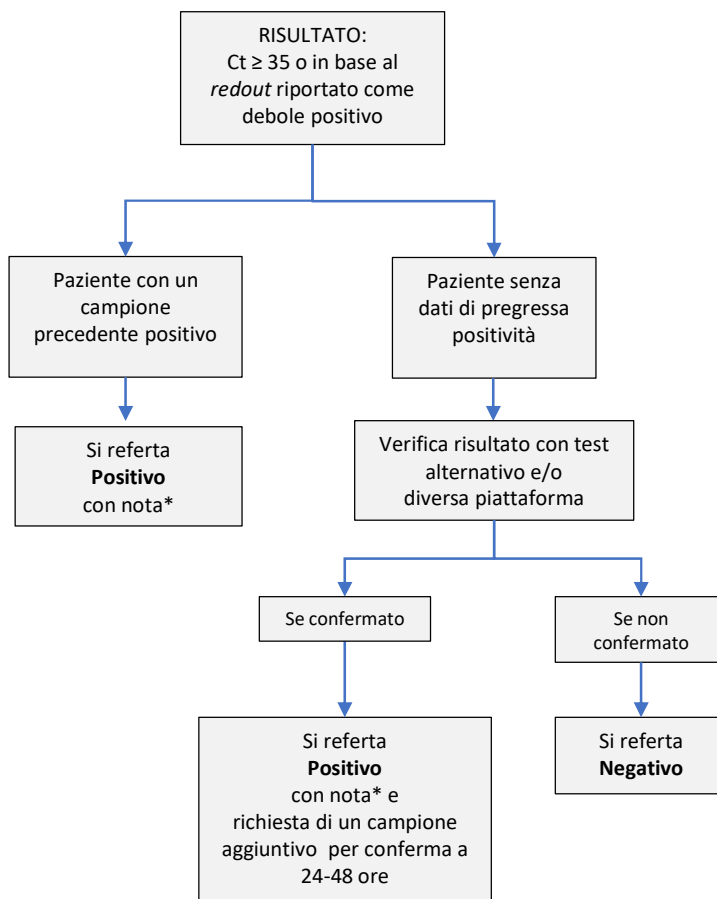
<b>Fase (giorni dall'esordio dei sintomi)</b>	<b>Test molecolare</b>	<b>Test Sierologico</b>
Iniziale (1-5 giorni)	+	-
Intermedia 6-10	+/-	+/-
Finale*(>10)	-	+
* È da tenere sempre presente che nella fase di risoluzione dell'infezione possono essere individuate positività basse ed intermittenti ai test molecolari, che vanno criticamente interpretate (Paul A. Rota, et al. Science May 2003; Piralla et al. IJID 2020; Wölfel, R., et al. Nature 2020; Myungsun Park, et al Exp Mol Med. 2020).		

### **Risultato debole positivo con uno o più target (geni)**

Strategie di *testing* molto estese stanno facendo emergere, in alcuni casi, problemi di interpretazione dei test molecolari in relazione ai risultati positivi a bassa carica virale (“deboli positivi”), riscontrabili nelle fasi iniziali (più raramente) e tardive (più frequentemente) nell’infezione. L’interpretazione dei risultati “deboli positivi” risulta particolarmente complicata in assenza di dati di laboratorio attestanti una pregressa positività e/o per il mancato accesso da parte dei laboratori a informazioni riguardanti la storia clinica e il contesto epidemiologico del paziente.

Genericamente possono essere considerati “deboli positivi” i campioni con cycle threshold (Ct)  $\geq 35$ . Dal momento che i diversi test hanno *readout* differenti, i risultati “deboli positivi” devono essere identificati per ciascun laboratorio in base alle diverse piattaforme in uso e secondo l’algoritmo diagnostico proposto. In questo scenario si possono però verificare diverse situazioni (schema sotto). Tuttavia, sono escluse da questo algoritmo le piattaforme che non forniscono come *readout* un Ct o sono prodotti con altre tecnologie (LAMP o TMA).

Flowchart "bassi positivi"



\*Nota: il riscontro di positività a bassa carica (indicare la soglia individuata come ultimo percentile) indica che SARS-CoV-2 è presente nel campione biologico in forma non infettante nel 95% dei casi.

## Riferimenti bibliografici

- CDC, Duration of Isolation & Precautions for Adults Updated Oct. 19, 2020. Disponibile al seguente link: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/duration-isolation.html>
- Drain PK, Ampajwala M, Chappel C, Gvozden AB, Hoppers M, Wang M, Rosen R, Young S, Zissman E, MMontano M. A rapid, high-sensitivity SARS-CoV-2 nucleocapsid immunoassay to aid diagnosis of acute COVID-19 at the point of care medRxiv 2020.12.11.20238410; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.11.20238410>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Options for the use of rapid antigen tests for COVID-19 in the EU/EEA and the UK. 19 November Stockholm: ECDC; 2020. Disponibile al seguente link: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/options-use-rapid-antigen-tests-covid-19-eueea-and-uk>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance for discharge and ending isolation of people with COVID-19, 16 October 2020. Stockholm: ECDC; 2020. Disponibile al seguente link: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Guidance-for-discharge-and-ending-of-isolation-of-people-with-COVID-19.pdf>
- Liotti FM, Menchinelli G, Marchetti S, Posteraro B, Landi F, Sanguinetti M, Cattani P. Assessment of SARS-CoV-2 RNA Test Results Among Patients Who Recovered From COVID-19 With Prior Negative Results. *JAMA Intern Med.* 2020 Nov 12:e207570. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.7570.
- Lippi, Giuseppe et al. "Updates on laboratory investigations in coronavirus disease 2019 (COVID-19)." *Acta bio-medica: Atenei Parmensis* vol. 91,3 e2020030. 7 Sep. 2020.
- Loh, Tze Ping et al. "Setting minimum clinical performance specifications for tests based on disease prevalence and minimum acceptable positive and negative predictive values: Practical considerations applied to COVID-19 testing." *Clinical biochemistry*, S0009-9120(20)30880-8. 20 Nov. 2020, doi:10.1016/j.clinbiochem.2020.11.003
- Myungsun Park, et al Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR *Exp Mol Med.* 2020 Jun; 52(6): 963–977.
- Paul A. Rota, et al. Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *Science* May 2003: 1394-1399
- Pham, Huy P et al. "Laboratory Assay Evaluation Demystified: A Review of Key Factors Influencing Interpretation of Test Results Using Different Assays for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis." *Laboratory medicine* vol. 51,5 (2020): e66-e70. doi:10.1093/labmed/lmaa045
- Piralla A, et al. Residual SARS-CoV-2 RNA in nasal swabs of convalescent COVID-19 patients: Is prolonged quarantine always justified? *Int J Infect Dis.* 2020 Oct 30;102:299-302.
- WHO, Criteria for releasing COVID-19 patients from isolation, 17, June 2020. Disponibile al seguente link: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332451/WHO-2019-nCoV-Sci\\_Brief-Discharge\\_From\\_Isolation-2020.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332451/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-Discharge_From_Isolation-2020.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 581, 465–469 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>