

## PROGETTO PER LA DIAGNOSTICA SIEROLOGICA DI COVID-19 NEL VENETO

L'importanza della diagnostica di laboratorio nel caso della pandemia da COVID-19 è emersa con maggior forza dal momento in cui si è avuta la certezza che soggetti **asintomatici o paucisintomatici, o con il virus ancora in fase di incubazione** possono essere **contagiosi**, giocando quindi un ruolo importante nella diffusione della malattia.

Numerosi esami di laboratorio, in ambito ematologico (conta leucocitaria differenziale), coagulativo (d-dimero, tempo di protrombina), enzimatico (LDH e transaminasi) e biomarcatori quali proteina C reattiva, procalcitonina e troponina cardiaca risultano strettamente correlati con la **severità** della malattia e rivestono un determinante valore prognostico; ma è l'ambito della **diagnostica precoce** e accurata che oggi desta maggior interesse clinico.

Vista l'impossibilità di stabilire una diagnosi certa e precoce su base sintomatologica e dei segni clinici, sono stati sviluppati metodi di laboratorio, in particolare test molecolare basati su real-time RT-PCR per rilevare il patogeno e sierologia per identificare il contatto con il virus espresso da risposta **anticorpale precoce** (IgM) e **ritardata** (IgG).

Il test molecolare è ormai ampiamente diffuso, esiste letteratura sulla sua accuratezza, sulle variabili anche extra-analitiche che possono determinare errori nei risultati (1). Viene usato per determinare l'incidenza dei casi SARS-COV-2 positivi.

La sierologia è invece indagine atta a misurare la prevalenza dell'infezione a livello di popolazione.

Un passo avanti nella comprensione del valore della sierologia è la recente dimostrazione che gli anticorpi rilevabili con metodi immunometrici hanno proprietà neutralizzanti. Gli autori sottolineano che *“the SARS-CoV-2 CPE-based MN test using live virus appeared to be very specific, while laborious to conduct requiring a BSL-3 laboratory. An increase of at least 4-fold in the neutralising antibodies indicating a positive response was detected at day 9–10 after the first symptoms and at day 20, the antibody levels were still increasing. Our findings indicate that the MN assay is specific for functional SARS-CoV-2 antibodies and could be applied in surveillance of population immunity for this virus”*.

### Caratteristiche dei metodi sierologici per l'applicazione clinica

Le caratteristiche essenziali che i test sierologici devono possedere per dare un effettivo contributo alla diagnosi del COVID-19 sono, **in aggiunta** ai tradizionali e fondamentali criteri di **validata accuratezza analitica e diagnostica**:

- a) Ampia cadenza analitica e possibilità di automazione, al fine di poter processare volumi significativi di campioni biologici
- b) Disponibilità di strumentazione e reagenti, onde supportare il programma per un arco temporale di almeno alcuni mesi, allorché non è definibile con certezza la fine della pandemia
- c) Possibilità di collegamento della strumentazione ai sistemi informatici di laboratorio (LIS), di ospedale (HIS) e successiva connettività e condivisione dei flussi informatici a livello regionale
- d) Sostenibilità economica

Sulla base di queste caratteristiche, e visto l'acquisto da parte di Azienda Zero di kit per la sierologia del COVID-19 sviluppati da Snibe Diagnostics, commercializzati in Italia da Medical Systems e automatizzabili su uno strumento per analisi in chemiluminescenza (Maglumi) presente nei principali laboratori clinici (hub) della Regione Veneto, si ritiene di proporre un progetto per l'utilizzo della sierologia nella Regione Veneto modulato in due tempi, come successivamente dettagliato.

### ***Basi laboratoristiche***

Il test della Ditta Snibe nell'esperienza maturata presso il Dipartimento Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedale-Università di Padova (UOC Microbiologia-Virologia e UOC Medicina di Laboratorio) ha dimostrato di rispettare le caratteristiche analitiche descritte da produttore in termini di utilizzo del campione di siero dopo inattivazione, ripetibilità nella serie e fra giorni, linearità e recupero.

Dal punto di vista della accuratezza diagnostica, nella Tabella si riportano i dati forniti dal produttore, e che derivano da due studi clinici eseguiti in diversi ospedali della Cina

Study 1	Specimen Category	2019-nCoV IgM (CLIA)			2019-nCoV IgM (CLIA)+2019-nCoV IgG (CLIA)		
		No.	Positive	%Sensitivity	No.	Positive	%Sensitivity
Clinical Sensitivity	Clinically Confirmed Positive Samples	No.	70	78.65%	No.	80	89.89%
		89			89		
Clinical Specificity	Negative Specimens	No.	195	97.50%	No.	193	96.5%
		200			200		

  

Study 2	Specimen Category	2019-nCoV IgG (CLIA)			2019-nCoV IgM (CLIA)+2019-nCoV IgG (CLIA)		
		No.	Positive	%Sensitivity	No.	Positive	%Sensitivity
Clinical Sensitivity	Clinically Confirmed Positive Samples	No.	83	91.21%	No.	87	95.6%
		91			91		
Clinical Specificity	Negative Specimens	No.	730	97.33%	No.	720	96.0%
		750			750		

I dati di specificità e sensibilità dichiarati e derivanti da questi studi appaiono molto soddisfacenti. Dati preliminari ottenuti presso il Dipartimento Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedale-Università di Padova sembrano confermare, almeno in parte, questi risultati anche se sono necessarie ulteriori prove su casistica più rappresentativa. Uno studio recente ha anche evidenziato come la risposta immunologica al virus si accompagni alla comparsa in circolo di anticorpi neutralizzanti (bloccanti) e quindi potenzialmente idonei a prevenire la reinfezione (5).

## *Il progetto*

### **Background**

L'ondata epidemica della malattia da Coronavirus 2019 (COVID-19), causata dal nuovo coronavirus SARS-Cov-2 e caratterizzata da grave sindrome respiratoria acuta (6), ha interessato oltre 8.700 persone e causato oltre 400 decessi in Veneto al 30/03/2020.

Il nuovo virus, che ha acquisito fin da subito caratteristiche pandemiche, si diffonde in modo molto rapido ( $R_0 > 2,5$ ) tra la popolazione che è totalmente esposta al contagio in quanto priva di immunità specifica. Mentre alla popolazione generale si possono applicare misure di distanziamento sociale e di isolamento domiciliare per minimizzare il contagio, gli operatori del comparto sanitario (medici, infermieri, tecnici di radiologia) sono necessariamente esposti al rischio di infezione per assolvere il loro compito primario di curare pazienti affetti da COVID-19. Da dati nazionali e delle Regioni più colpite dall'epidemia, si stima che l'incidenza relativa di tamponi positivi sia di circa il 20% tra tutti gli addetti (7) con diversi casi. Tale situazione, drammatica per gli aspetti assistenziali riguardanti la cura dei malati, offre però la possibilità di stabilire con certezza la circolazione del virus in uno strato di popolazione particolarmente esposto al rischio di infezione.

### **Razionale**

Il test sierologico viene utilizzato per rilevare la presenza di anticorpi che accertino l'avvenuto contatto con il virus (**contagio**) e la successiva risposta anticorpale contro lo stesso (**immunizzazione**).

L'indagine sierologica potrà inoltre tracciare cluster di soggetti contagiosi, identificare positività al di fuori della fascia temporale di positività del test molecolare (diagnosi retrospettiva), monitorare pazienti in via di guarigione, accertare potenziali ricadute della malattia.

Un principio basilare di sanità pubblica, soprattutto a seguito di una epidemia (pandemia in questo caso) causata dall'emergere di un nuovo agente infettivo, è quello di accertare con precisione la circolazione di detto agente all'interno della popolazione generale e in particolari strati di questa (8). Solo una misura di prevalenza può infatti permettere di stabilire il reale numero di persone venute in contatto con SARS-CoV-2 (denominatore) e far conoscere i tassi relativi di morbosità e letalità di COVID-19. Tale misura darebbe inoltre la vera dimensione dei soggetti infettati e paucio o asintomatici (portatori sani) stimata attualmente aggirarsi intorno all'80%. Uno studio di prevalenza andrebbe sicuramente condotto sulla popolazione generale suddivisa per strati di rischio all'infezione da SARS-CoV-2 ed alle conseguenze di questa, considerando parametri come età, esposizione e suscettibilità da immunosenescenza. A mero scopo di esemplificazione per popolazione a basso rischio: bambini 0-10 anni, adolescenti-giovani 10-30 anni; a medio rischio: adulti 30-50, 50-70 anni; ad alto rischio: over 70 anni e personale sanitario di ospedali, case di ricovero, medici di medicina generale. In prima istanza però sembra ragionevole ed opportuno, per ragioni logistico-organizzative e per ottenere risultati in tempo rapido non da un singolo ospedale ma da una più ampia base regionale, dare la priorità al personale ospedaliero (medici e/o infermieri). Questo personale è quello che ha di gran lunga la maggior esposizione al contagio. Per tale personale, inoltre, sono già o saranno da subito disponibili i dati di positività al test del tampone, con possibilità di raffronti crociati tra un saggio che determina nel soggetto infettato la presenza del virus in un determinato momento ed un saggio che stabilisce l'avvenuto contatto con il virus e dà indicazioni sul tempo intercorso.

In una fase immediatamente successiva questo approccio diagnostico verrà esteso ad uno strato più ampio della popolazione. Ciò con lo scopo di accertare il livello generale di immunizzazione nei confronti del virus, in previsione di una probabile odiata di contagio di ritorno, oltre che per identificare la percentuale di soggetti sieropositivi che non si sono ammalati e che potrebbero riprendere l'attività lavorativa.

Un approccio di questo tipo non ha precedenti quantomeno in area vasta come la regione del Veneto (4,9 milioni di abitanti).

### **Periodo di studio**

Q2 2020

### **Dimensione del campionamento**

Esiste sicuramente un rischio variabile tra i diversi operatori sanitari all'interno delle singole categorie (medico, infermiere, tecnico di radiologia). Per questioni di omogeneità verranno ottenuti campioni solo da medici appartenenti ai reparti di Malattie Infettive, Pneumologia, COVID-19. Si assume che in questa categoria di soggetti la prevalenza media di positività al test del tampone (come misura certa di avvenuto contatto con il virus, anche se il contatto sarà comunque avvenuto in misura maggiore) si aggiri sul 20%.

In uno studio di prevalenza la formula per il calcolo della numerosità campionaria è la seguente(9):

$$n = \frac{Z^2 P (1 - P)}{d^2}$$

dove n è la dimensione del campione, Z è la statistica relativa al livello di confidenza (assunta al 95%), P è la prevalenza attestata, d è la precisione della stima.

Al fine di avere un'ampiezza massima del 5% per l'intervallo di confidenza, la dimensione minima del campionamento dovrebbe essere di 246 soggetti. Considerando i probabili drop-out, l'arruolamento per la categoria in questione dovrebbe estendersi al numero di 300 soggetti.

## **Obiettivi dello studio**

### Primari

- Ottenere una precisa stima della diffusione di SARS-CoV-2 nella popolazione di medici ospedalieri veneti particolarmente esposti al rischio di contagio (Malattie Infettive, Pneumologia, reparti COVID-19).
- Correlare il dato di sieroprevalenza con parametri quali età, esposizione relativa al rischio contagio, positività/negatività al test del tampone, circolazione del virus nei singoli reparti e ospedali.
- Avere indicazioni presuntive su quello che potrebbe essere il grado di protezione immunitaria dei già infettati nei confronti di una seconda ondata di contagio.

### Secondari:

- Ottenere indicazioni sull'adeguatezza delle strutture, delle procedure di isolamento dei pazienti, di decontaminazione/disinfezione, dei presidi di protezione individuale.
- Avere a disposizione materiale utilissimo per studi di neutralizzazione col virus circolante e di competizione con una batteria di anticorpi monoclonali (Wayne Marasco, Harvard Medical School) che si legano a diversi epitopi della proteina S.

## **Disegno dello studio e metodi**

Studio osservazionale cross-sectional. Reattivi: acquistati da Azienda Zero presso le aziende Medical Biosystems e Pantec che commercializzano test messi a punto da Biotech cinesi e validati CE/IVD (FDA authorization pending). Si tratta di un saggio CLIA (chemoluminescence immunoassay, 10) che legge il legame alla proteina di superficie del virus di anticorpi specifici delle classi IgG ed IgM di soggetti che hanno contratto l'infezione da SARS-CoV-2. Sensibilità e specificità sono nell'ordine del >95% per le IgG mentre valori più bassi sono riportati per le IgM. Verranno prelevati 10 ml di sangue al tempo zero e a distanza di 14 giorni dal primo campionamento per valutare la sierconversione; il siero ottenuto verrà suddiviso in due aliquote e conservato alla temperatura di -20°C. Un'aliquota servirà per futuri (auspicabilmente a brevissimo tempo) saggi di neutralizzazione dell'infettività di SARS-CoV-2 da eseguire in laboratori BSL-3 (Microbiologia-Virologia e IOV Padova) e di competizione con anticorpi monoclonali. Le altre aliquote ottenute al tempo zero e tempo 14gg verranno saggate per la misurazione diretta degli anticorpi specifici IgG e IgM. Siccome lo strumento Maglumi impiegato per eseguire il test CLIA è già disponibile presso i laboratori di Chimica Clinica degli Ospedali di Padova, Verona, Treviso, Vicenza, Mestre, Belluno, Santorso, Legnago, che lo utilizzano per il saggio di ormoni e biomarcatori, il Prof. Plebani e il Prof. Lippi coordineranno questa fase.

### **Criteri di esclusione**

Soggetti con:

- Immunodepressione per cause iatrogene o condizioni cliniche quali tumori o immunodeficienza
- Gravidanza

### **Follow-up**

In relazione all'effettuazione di studi correlati (immunoprotezione, inflammosoma etc)

### **Raccolta dei dati**

I dati di laboratorio ed i correlati dati clinici verranno raccolti dai laboratori/direzioni sanitarie degli ospedali interessati. Essi riguarderanno in particolare:

- valori dei test sierologici
- altri parametri biochimico-clinici se disponibili (emocromo, proteine reattive...)
- positività/negatività al test del tampone
- età
- sesso

- recente storia di vaccinazioni
- livelli di esposizione al rischio infettivo quali contatto ravvicinato e prolungato (<1mt, >15 min), esposizione a procedure con rischio di aerosol, uso di presidi per proteggersi dall'infezione, tipo di reparto e periodo di tempo trascorso al lavoro

### **Trattamento dei dati e analisi**

I dati saranno proprietà della Regione Veneto e verranno elaborati da parte degli esperti statistici-epidemiologi dell'Azienda Zero per quanto riguarda:

- Analisi descrittiva delle variabili
- Regressione logistica multivariata per le variabili indipendenti (sesso, età, vaccinazioni recenti, esposizione )
- Correlazione tra positività al tampone e risposta sierologica IgG/IgM

Necessità immediata è la richiesta alla Ditta Medical Systems, da parte di Azienda Zero, di assicurare la fornitura dei kit necessari per processare tutti i campioni previsti anche in una seconda fase dello studio che coinvolga la popolazione generale, e quindi nell'ordine di circa 100.000 test.

### **Bibliografia essenziale**

- 1) Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med.* 2020 Mar 16. pii:/j/cclm.ahead-of-print/cclm-2020-0285/cclm-2020-0285.xml. doi 10.1515/cclm-2020-0285. [Epub ahead of print]
- 2) Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang XL, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):386-9. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1729071> PMID: 32065057
- 3) Bai SL, Wang JY, Zhou YQ, Yu DS, Gao XM, Li LL, Yang F. Analysis of the first cluster of cases in a family of novel coronavirus pneumonia in Gansu Province. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2020 Feb 17;54(0)
- 4) Haveri A, Smura T, Kuivanen S et al. Serological and molecular findings during SARS-CoV-2 infection: the first case study in Finland, January to February 2020. *Euro Surveill.* 2020 Mar;25(11). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.11.2000266.
- 5) Haveri A, Smura T, Kuivanen S, et al. Serological and molecular findings during SARS-CoV-2 infection: the first case study in Finland, January to February 2020. *Euro Surveill.* 2020 Mar;25(11). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.11.2000266.
- 6) Guan WJ1, Ni ZY1, Hu Y1, Liang WH1, et al., Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal Med.* 2020 Feb 28. doi: 10.1056/NEJMoa2002032
- 7) Lancet, Editorial, COVID-19: protecting health-care workers 395, March 21,2020 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30644-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30644-9)
- 8) [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)
- 9) Mohamad Amin Pourhoseingholi, Mohsen Vahedi, Mitra Rahimzadeh, Sample size calculation in medical studies, *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2013;6(1):14-17

10) WHO Interim guidance 17/1/2020

Prof. Mario Plebani  
Dipartimento di Medicina di Laboratorio  
AOP Padova

Handwritten signature of Mario Plebani in black ink, featuring a large, stylized initial 'M' followed by the name 'Plebani'.

Prof. Giuseppe Lippi  
UOC Laboratorio Analisi  
AOUI Verona

Handwritten signature of Giuseppe Lippi in black ink, featuring a stylized initial 'G' followed by the name 'Lippi'.