

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche

Dipartimento di Scienze della Salute

**Dottorato di Ricerca in Scienze della Salute –
Curriculum Medicina Legale e Medicina del Lavoro**



TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**“Correlazione tra i risultati delle indagini sierologiche e la diagnosi di morte
nei decessi ospedalieri della prima ondata pandemica da SARS-COV 2”**

Relatore: Chiar.mo Prof. Francesco De Stefano

Tutor: Chiar.mo Prof. Alessandro Bonsignore

Candidata: Dott.ssa Camilla Tettamanti

Anno accademico 2018-2019

Sommario

1. ABSTRACT.....	3
2. INTRODUZIONE E SCOPO DELLO STUDIO	4
2. MATERIALI E METODI	13
2.1 La selezione dei casi.....	13
2.2 La scelta e la raccolta dei dati.....	14
3. RISULTATI.....	16
3.1 Analisi della popolazione oggetto di studio.....	16
3.2 I test sierologici.....	18
4. DISCUSSIONE.....	29
5. CONCLUSIONI.....	38
6. BIBLIOGRAFIA.....	42

1. ABSTRACT

Nelle fasi iniziali dell'emergenza sanitaria da Sars-CoV 2, uno degli obiettivi maggiori ha riguardato la ricerca di un test diagnostico rapido, affidabile ed applicabile su larga scala: le tre tipologie di test diagnostici su cui sin dall'inizio si sono concentrati gli sforzi sono state l'analisi molecolare, i test antigenici e le analisi sierologiche, ciascuna delle quali caratterizzata da vantaggi e limiti.

Alle metodiche di ricerca diretta o indiretta dell'esposizione al virus, si sono succedute quelle inerenti la radiodiagnostica, la clinica ed il profilo biochimico delle analisi di laboratorio.

Le modalità di diagnosi della COVID risultano fondamentali nella valutazione della causa del decesso dei pazienti morti durante la prima ondata pandemica e a giugno 2020 l'ISS ha approfondito il tema della certificazione delle cause del decesso relative alla COVID-19 in relazione ai risultati dei test diagnostici.

Questo lavoro si pone l'obiettivo di analizzare i risultati dei test sierologici effettuati ai pazienti ricoverati presso l'Ospedale Policlinico San Martino di Genova nell'emergenza COVID e successivamente deceduti in una data compresa tra il 01.03.2020 ed il 17.05.2020 con lo scopo di valutare la concordanza tra tali risultati e la successiva diagnosi di morte certificata.

I risultati ottenuti permettono di affermare come la positività ai test sierologici non sia statisticamente correlata alla certificazione di morte COVID-correlata,

mostrando come in oltre il 50% del campione la negatività anticorpale non abbia influito nella certificazione clinica della causa della morte, anche a fronte di una conferma negativa molecolare ottenuta sull'analisi dell'ultimo prelievo mediante tampone naso-faringeo (il 22,7% dei casi con sierologia negativa e diagnosi di morte COVID-correlata, era caratterizzata anche da un dato molecolare negativo cronologicamente vicino al decesso).

2. INTRODUZIONE E SCOPO DELLO STUDIO

Nelle fasi iniziali dell'emergenza sanitaria, uno degli obiettivi maggiori ha riguardato la ricerca di un test diagnostico rapido, affidabile ed applicabile su larga scala: le tre tipologie di test diagnostici su cui sin dall'inizio si sono concentrati gli sforzi sono state l'analisi molecolare, i test antigenici e le analisi sierologiche (Fig. 1).

L'analisi molecolare prevede l'utilizzo della tecnologia (rt)-Real Time PCR (reverse transcriptase- Real Time Polymerase Chain Reaction) al fine di rilevare la presenza del genoma virale nel campione analizzato (principalmente prelievo di cellule di sfaldamento della mucosa nasale, orale e faringea attraverso tampone). Questa metodica permette di identificare sequenze genomiche del virus (geni bersaglio) e di misurare in tempo reale la concentrazione iniziale della sequenza target, fornendo - così - anche un'informazione quantitativa rispetto alla presenza di

particelle infettanti (il numero di cicli di amplificazioni necessarie per ottenere un certo quantitativo di repliche di materiale genetico sarà, pertanto, inversamente proporzionale rispetto alla presenza delle dette sequenze virali presenti nel campione). Spesso questo tipo di analisi è stato indicato come il “gold standard”, ossia il miglior test disponibile, per la diagnosi di infezione da Sars-CoV-2, ma, come descritto in Letteratura [1], tale considerazione non può prescindere dallo scopo del test stesso e, di conseguenza, dal soggetto a cui il test è proposto.

Questa analisi è dotata della maggiore sensibilità e specificità, essendo in grado di rilevare il genoma patogeno anche in soggetti con bassa carica virale al momento del prelievo. L'esecuzione del test, tuttavia, richiede strumentazione e personale altamente specializzati, non ubiquitariamente presenti sul territorio nazionale. Per la complessità della metodica, la rilevazione di SARS-CoV-2 viene, dunque, eseguita esclusivamente in laboratori specializzati con operatori esperti.

La stessa risulta dipendente dal prelievo di campione da analizzare: soprattutto nelle prime fasi di emergenza sanitaria, infatti, è stato segnalato come il prelievo fosse operatore dipendente e come prelievi scorretti potessero tradursi in risultati falsi negativi [2].

Si tenga conto che i dati presenti in Letteratura indicano, in media, per il test sul campione sopra descritto, una sensibilità assai variabile, tra il 71% ed il 98% ed una specificità di circa il 95% [3].

Il test antigenico (detto anche test rapido) si basa, invece, sulla reazione antigene-anticorpo. L'analisi, sicuramente meno complessa della precedente e più veloce, in termini di mera reazione, rileva la presenza di proteine virali (nello specifico, di proteine di superficie quali la proteina S – Spike, o la proteina N - Nucleocapside) nel campione analizzato (che, oltre al campione naso/oro-faringeo, può essere un campione di saliva). In questo caso il risultato sarà esclusivamente in termini qualitativi (non essendo possibile una stima quantitativa delle particelle infettanti).

Il test, in virtù delle caratteristiche dell'analisi, risulta meno sensibile rispetto all'analisi molecolare, necessitando di un quantitativo maggiore di proteine virali per arrivare alla soglia di rilevamento. Questa caratteristica si traduce clinicamente nel fatto che persone infettate da poco o già in fase di guarigione ma ancora portatrici di virus potrebbero risultare falsamente negative.

Nella fase sintomatica della malattia, o comunque in quella centrale, la sensibilità del test antigenico rapido appare preliminarmente sovrapponibile a quella dell'analisi molecolare, anche se per via della rapida evoluzione tecnologica e del ridotto tempo di utilizzo, non vi sono ancora dati in Letteratura sufficientemente solidi per poter azzardare certezze di accuratezza della diagnosi (ad oggi, la sensibilità si stima tra il 70 e l'86% e la specificità tra il 95 ed il 97%, anche se si è avuta evidenza clinica di una discreta quantità di falsi positivi alla conferma molecolare) [4].

In ultimo, i test sierologici, che non rilevano direttamente la presenza di parti del virus, ma analizzano la risposta immunitaria dell'ospite all'infezione, senza la possibilità di confermare o meno una infezione in atto, ma indicando l'esposizione all'agente patogeno.

Esistono tre metodiche accreditate per la valutazione della risposta anticorpale ed entrambe sono eseguite su campioni di sangue: la prima si basa su di una reazione immunoenzimatica (Enzyme-Linked immuosorbent Assay - ELISA), la seconda su di una reazione di chemiluminescenza (CLIA) e la terza su immunodosaggi a flusso laterale (LFIA). Le metodiche identificano la presenza di Immunoglobuline di risposta primaria (IgM) e di Immunoglobuline di risposta secondaria (IgG) nell'ospite. In Letteratura è possibile reperire ampie forbici riguardo alla sensibilità e specificità di questi test con valori medi che si aggirano intorno all'85% per la prima ed al 98% per la seconda [5]. Trattandosi di test indiretti, inoltre, si sono provati risultati falsi positivi determinati dalla cross-reazione anticorpale con altri coronavirus, come dall'assenza di risposta immunitaria nell'ospite (i pazienti fortemente immunodepressi (a gravissimo rischio di complicanze e decesso se esposti al virus), infatti, possono non sviluppare immunoglobuline a seguito di infezione.

Ovviamente alle metodiche di ricerca diretta o indiretta dell'esposizione al virus, si sono succedute quelle inerenti alla radiodiagnostica, alla clinica ed al profilo biochimico delle analisi di laboratorio [7-15].

Test category	Primary clinical use	Specimen type	Performance characteristics	Comments
NAATs (including RT-PCR)	Diagnosis of current infection	Respiratory tract specimens*	<ul style="list-style-type: none"> High analytic sensitivity and specificity in ideal settings. Clinical performance depends on the type and quality of the specimen and the duration of illness at the time of testing. Reported false-negative rate ranges from <5 to 40%, depending on the test used.[¶] 	<ul style="list-style-type: none"> Time to perform the test ranges from 15 minutes to 8 hours.^Δ Turnaround time is influenced by the test used and laboratory workflow. Some assays allow home collection of specimens that are mailed in.
Serology (antibody detection)	Diagnosis of prior infection (or infection of at least 3 to 4 weeks' duration)	Blood	<ul style="list-style-type: none"> Sensitivity and specificity are highly variable. Detectable antibodies generally take several days to weeks to develop; IgG usually develops by 14 days after onset of symptoms. Cross-reactivity with other coronaviruses has been reported. Individual results should be interpreted with caution in settings of low seroprevalence; serologic tests that have high specificity still have a low positive predictive value. 	<ul style="list-style-type: none"> Time to perform the test ranges from 15 minutes to 2 hours. Turnaround time is influenced by the test used and laboratory workflow. It remains uncertain whether a positive antibody test indicates immunity against future infection.
Antigen tests	Diagnosis of current infection	Nasopharyngeal or nasal swabs	<ul style="list-style-type: none"> Antigen tests are generally less sensitive than nucleic acid tests. Sensitivity is highest in symptomatic individuals within 5 to 7 days of symptom onset. 	<ul style="list-style-type: none"> Time to perform the test is <1 hour.

Figura 1: test diagnostici per infezione da Sars-CoV-2 e caratteristiche principali (Immagine tratta da UpToDate. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Diagnosis. Diagnostic tests for COVID-19) [6].

Nel contesto attuale [16] i test diagnostici devono soddisfare non solo esigenze di sensibilità e specificità elevate, ma criteri di rapidità e sostenibilità economica su larga scala. Nel corso del tempo le indicazioni dettate dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) [17], basate sia sulle indicazioni dettate dalla World Health Organization (WHO – in italiano OMS) [18,19] e dal CDC (Centres for Disease Control and Prevention) [20] che sulla Letteratura Scientifica più aggiornata [21],

hanno permesso di stratificare l'appropriatezza di una analisi diagnostica rispetto all'altra sulla base della tipologia del soggetto che necessita del test: per i pazienti sintomatici la prima scelta resta il test molecolare su tampone oro/naso faringeo con possibilità alternative (di seconda scelta) di effettuare un test antigenico rapido (sempre su campione oro/naso-faringeo), che comunque necessita di una conferma qualora il risultato fosse positivo.

Nei soggetti paucisintomatici o nei soggetti asintomatici che abbiano avuto un contatto stretto con un paziente positivo o, ancora, nei soggetti - sempre asintomatici - che provengono da un Paese considerato a rischio, la prima scelta è, invece, proprio il test antigenico rapido, sufficiente a porre diagnosi senza necessità di conferma molecolare. Qualora questa seconda popolazione descritta sia convivente con un caso confermato o frequenti persone definibili fragili, ad elevato rischio di complicazioni, nuovamente la prima scelta ricade sul test molecolare.

Quando gli orizzonti si allargano, ed il test diagnostico non trova indicazione per la salvaguardia della salute del singolo, ma per la tutela della salute di una intera Comunità, è proprio la Comunità da tutelare che determina la scelta dell'analisi: luoghi di cura, luoghi ove sia estremamente difficile mantenere il distanziamento sociale o pretendere il rispetto delle regole sanitarie basilari per il contenimento dell'infezione (quali Residenze Sanitarie Assistenziali, Residenze Protette, carceri, Ospedali) impongono test molecolari per gli operatori e per gli utenti/ospiti,

mentre lo screening generico per la ricerca di positivi asintomatici su larga scala (ove la comunità da tutelare si estende all'intera popolazione) si basano sull'esecuzione di test antigenici e, per la prima volta, di test sierologici (entrambi, ad ogni modo, con previsione di conferma attraverso test molecolare).

La diagnosi attraverso test sierologici [22] ha indubbi vantaggi inerenti alla velocità di esecuzione, ai costi bassi ed alla possibilità di essere effettuata da personale tecnico di laboratorio non specializzato (come, invece, accade per l'esecuzione di test molecolare).

Tutti i principali Enti Regolatori europei ed interazionali, hanno messo appunto linee di indirizzo per determinare le caratteristiche di base delle apparecchiature tecnologiche utilizzate a scopo diagnostico ed il mercato privato si è reso in poco tempo disponibile a proporre diverse tecnologie concorrenti [23, 24].

Una volta esaurita la panoramica sui test diagnostici validati per la diagnosi di infezione da Sars-CoV-2, è opportuno valutare come la Comunità Scientifica [25-31] abbia ritenuto di correlare i risultati ottenuti con la definizione della causa del decesso (oltre ad aver fermamente e costantemente espresso l'esigenza di effettuare autopsie per prevenire il rischio di certificazioni di morte scorrette – ad esempio viziate dalla comprensibile condizione psicologica del medico certificatore), qualora un paziente sia andato incontro ad *exitus* durante il periodo pandemico, e come gli stessi siano state statisticamente valutate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità [32].

Sulla base dei dati ISTAT pubblicati il 16 luglio 2020 [33] COVID-19 è la causa direttamente responsabile della morte nell'89% dei decessi di persone positive al test SARS-CoV-2, mentre per il restante 11% le cause di decesso sono le malattie cardiovascolari (4,6%), i tumori (2,4%), le malattie del sistema respiratorio (1%), il diabete (0,6%), le demenze e le malattie dell'apparato digerente (rispettivamente 0,6% e 0,5%). Da questa analisi, inoltre, emerge come nel 28,8% la patologia COVID-19 sia l'unica indicata come direttamente responsabile del decesso, mentre il 71,8% dei decessi di persone positive al test SARS-CoV-2 presenterebbe almeno una concausa (il 31,3% ne ha una, il 26,8% due e il 13,7% ha tre o più concause).

L'8 giugno 2020 l'ISS ha approfondito il tema della certificazione delle cause del decesso relative alla COVID-19 [34], indicandone i criteri.

Sulla base di tale rapporto, la definizione di decesso dovuto a COVID-19 deve prevedere la presenza, contemporanea, delle seguenti caratteristiche: il decesso deve occorrere in un caso confermato di infezione (conferma di laboratorio), in presenza di un quadro clinico e strumentale suggestivo per patologia, in assenza di una chiara causa di morte differente ed in assenza di un periodo di recupero clinico completo tra la malattia ed il decesso (da intendersi quale remissione clinica e strumentale, in assenza di indicazioni riguardo ai test di laboratorio).

In alternativa sono previsti i casi di morte probabilmente o possibilmente dovuti a COVID-19 qualora non si sia a disposizione della conferma laboratoristica, ma gli altri tre criteri precedentemente esposti siano comunque soddisfatti.

Proprio nel contesto dell'importanza decisiva dei test di laboratorio rispetto alla diagnosi di morte COVID-correlata, si introduce l'analisi proposta.

Questo studio, infatti, si pone l'obiettivo di analizzare i risultati dei test sierologici effettuati sui pazienti che si sono recati presso l'Ospedale Policlinico San Martino di Genova e sono successivamente deceduti in una data compresa tra il 01.03.2020 ed il 17.05.2020 con lo scopo di valutare la concordanza tra tali risultati e la successiva diagnosi di morte certificata, con riferimento all'andamento di tali risultati nel corso del ricovero ed all'esito dell'eventuale tampone molecolare, al fine di meglio comprendere le potenzialità ed i limiti diagnostici di tali dati, in correlazione con l'andamento della patologia [35] e la successiva determinazione della causa di morte.

2. MATERIALI E METODI

2.1 La selezione dei casi

Nel marzo 2020, a Genova, solo l’Ospedale Policlinico San Martino, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) convenzionato con la Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche dell’Università degli Studi di Genova era in grado di effettuare test sierologici per diagnosi di COVID-19 su larga scala: la Struttura ospedaliera, infatti, è il centro di riferimento regionale per la diagnosi e la cura della patologia. Si è ritenuto, pertanto, di limitare la coorte di studio ai pazienti deceduti nel corso della prima ondata pandemica. I limiti temporali sono stati fissati tra l’1 marzo 2020 – ossia 8 giorni prima rispetto alla scelta politica di imporre un *lockdown* su tutto il territorio nazionale ed il 17 maggio 2020, ultimo giorno di limitazioni serrate.

Riguardo alla definizione dei criteri d’inclusione della coorte si è scelto di includere tutti i decessi avvenuti nel periodo d’interesse, a prescindere dalla causa di morte certificata.

Per quanto attiene l’accesso a dati di persone decedute si è ritenuto di trovarsi nelle condizioni di autorizzazione all’accesso previste dal Regolamento europeo sulla protezione dei dati personali (GDPR – entrato in vigore in Italia con il Decreto Legislativo 101/2018), non adottandosi tale regolamento ai dati di soggetti deceduti e, ad ogni modo ritenendo lecito accedere agli stessi e trattarli, in virtù

della finalità di ricerca medica e di tutela della salute pubblica in occasione di una pandemia [36]. Non essendo attualmente abrogato il Decreto legislativo 196/2016, si è comunque ritenuto di ricercare provvedimenti del Garante per la protezione dei dati personali che potessero applicarsi alla situazione: l'autorizzazione n. 9/2016 del 15 dicembre 2016 riguarda, oltre ad altre specifiche, tale circostanza e nel provvedimento è espresso che le Università rientrano tra le categorie autorizzate a trattare i dati a scopo di studio scientifico in caso di pazienti deceduti [37].

Solo il personale addetto alla raccolta delle informazioni è stato dotato di credenziali dedicate - a scadenza - per l'accesso ai dati, ponendo particolare attenzione alla anonimizzazione degli stessi una volta riportati nel foglio di lavoro. Tutti gli accessi sono stati tracciati informaticamente.

Nessuna informazione (in particolare personale, identificativa o sensibile) riguardante i pazienti deceduti è stata ceduta a terzi.

2.2 La scelta e la raccolta dei dati

Sono stati selezionati 794 casi.

Preliminarmente si è fatta una ricerca del numero di decessi avvenuti presso lo stesso nosocomio nel medesimo periodo dell'anno precedente (2019) ed il numero è risultato essere di 490.

Per i casi d'interesse si è provveduto a selezionare e raccogliere una serie di dati: grazie all'utilizzo della cartella clinica elettronica presso l'IRCCS e con l'aiuto dell'Ingegneria informatica ospedaliera, è stato possibile creare una stringa di ricerca che selezionasse alcuni *items* solo su pazienti deceduti.

Purtroppo, la ricerca informatizzata non ha permesso di reperire tutti i dati necessari per i seguenti motivi: il reparto Hospice non era ancora inserito nel sistema di ricerca rapida digitale su supporto informatico e, analogamente, solo alcuni dati erano rilevati riguardo ai casi deceduti presso il Pronto Soccorso (non trasferiti presso reparti di degenza).

Si è provveduto, pertanto, ad analizzare ogni singola cartella clinica elettronica alla ricerca dei dati d'interesse.

Per quanto attiene lo studio che qui si presenta, i dati raccolti comprendevano: la certificazione della causa di morte da parte di personale medico ospedaliero (sono stati esclusi due casi, in quanto giunti cadavere presso il Pronto Soccorso e, pertanto, privi di una causa di morte certa ospedaliera), data di ingresso in ospedale, data di esecuzione dei test diagnostici per COVID-19 (test molecolare su tampone naso-faringeo e ricerca di Immunoglobuline tipo M e tipo G) e rispettivi risultati.

Sono stati esclusi i casi con risultato inconclusivo o incerto (quali ad esempio: campione inadeguato), ivi compresi i test per cui risulta eseguito il prelievo ma non è stato possibile reperire il risultato. Sono, invece, stati inclusi nello studio i test il

cui esito è stato refertato debolmente positivo. Tali risultati, nell'analisi dei casi, sono stati conteggiati come positivi.

2.3 L'analisi statistica

I dati sono stati raccolti in forma anonima ed aggregata attraverso una cartella di lavoro informatica. A ciascun caso è stato assegnato un codice alfa-numeric. Le variabili discrete sono state presentate in numero assoluto ed in percentuale, mentre per le variabili continue sono state calcolate media, con deviazione standard, e mediana con intervallo tra Q1 e Q3 (IQR) ad indicare i valori minimo e massimo contenenti il 50% delle informazioni. Per la determinazione di comparazione dei dati è stato utilizzato il test del Chi-quadro.

3. RISULTATI

3.1 Analisi della popolazione oggetto di studio

La coorte di studio era composta da 437 maschi e 355 femmine (792 casi). L'età media rilevata al momento del decesso era di 80 anni (DS 11,4).

I decessi per cui la certificazione della causa del decesso era ascrivibile a patologia COVID-19 erano 304.

Correlando il sesso con il decesso per causa di morte certificata COVID-correlata emerge come il 61% dei decessi COVID sia di sesso maschile, a fronte del 52% di maschi deceduti per cause non attinenti alle infezioni COVID ($p= 0,009$).

Andando a considerare i medesimi parametri nel sottogruppo dei soggetti che in corso di ricovero hanno effettuato almeno un test sierologico (trattasi di 364 casi) (Fig. 2), l'età media è risultata essere di 80 anni mentre la mediana è risultata 82 anni (IQR 75-88). Il 42% è risultato essere di sesso femminile ed il 58% maschile (Tab. 1) ed anche in questo caso è possibile evidenziare una prevalenza dei decessi COVID nei maschi statisticamente rilevante ($p=0,022$).

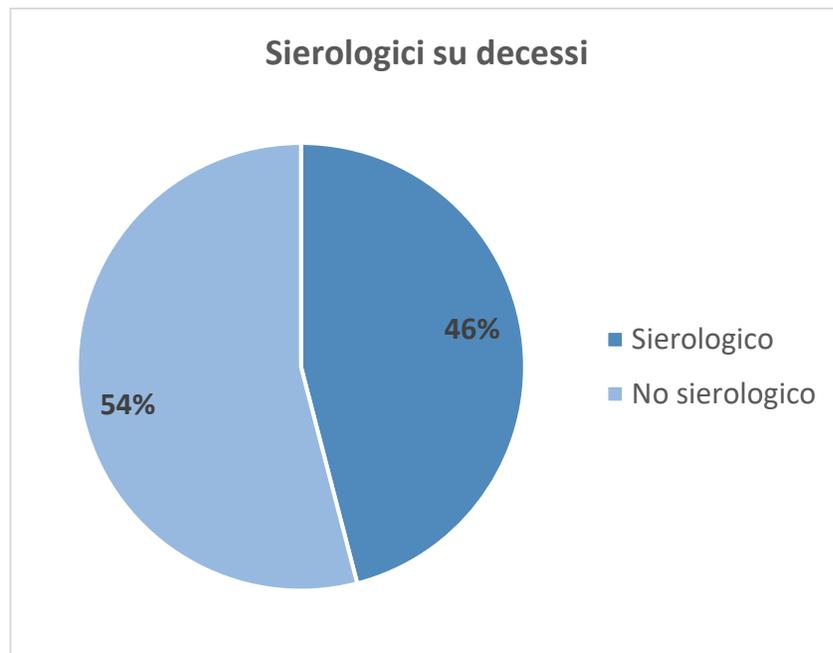


Figura 2: percentuale di pazienti sottoposti a test sierologici tra i deceduti.

SESSO	COVID		Total
	0	1	
F	84 48.55	70 36.65	154 42.31
M	89 51.45	121 63.35	210 57.69
Total	173 100.00	191 100.00	364 100.00

Pearson chi2(1) = 5.2717 Pr = 0.022

Tabella 1: sulle ascisse è indicata la presenza (1) o assenza (0) di certificazione di morte attestante il COVID-19 come causa del decesso.

Tra i 364 casi di quest'ultimo sottogruppo, 179 risultavano avere una causa di morte COVID-19 correlata.

3.2 I test sierologici

Per ogni caso il numero massimo di test sierologici rilevati in cartella è stato pari a 7, contando anche referti precedenti al ricovero, e di 4 nel corso della degenza.

Solo in due casi le indagini hanno previsto la valutazione di una sola tipologia di anticorpo (rispettivamente in uno IgM e nel secondo IgG).

In soli tre casi ai pazienti sono stati effettuati 4 test sierologici ed in tutti l'esito finale è stato di positività sia per IgM che per IgG: tutti i casi riguardavano pazienti con sintomatologia respiratoria e negatività al test molecolare all'ingresso in Ospedale ed una degenza precedente al decesso di almeno 15 giorni.

La maggior parte dei pazienti effettuava un unico prelievo per la determinazione della sierologia da Sars-CoV-2 il giorno dell'ingresso in ospedale.

Si riporta, di seguito, una tabella relativa al numero di casi rispetto all'esecuzione di test sierologici con relativi intervalli di tempo intercorsi tra le diverse analisi (Tab. 2).

	Sier_prec1	Sier_prec2	Sier_prec3	Sier 1	Sier 2	Sier 3	Sier 4
N test	25	5	2	349	71	17	3
N test con entrambi gli esiti	24	5	2	341	67	17	3
IgM- IgG-	19	5	2	252	42	11	-
IgM+IgG-	1	-	-	5	2	0	-
IgM-IgG+	2	-	-	31	5	1	-
IgM+IgG+	2	-	-	53	18	5	3
Tempo rispetto al ricovero, mean(SD); median(IQR)	-14(15); -7(-21; -1)	-15(4); -15(-17; -13)	-7(4) -7(-9; -4)	4 (11); 0(0-1)	12(10) 10(4; 17)	18(8) 18(13; 22)	24(8) 23(17; 33)

Tabella 2: test, risultati e tempo intercorso rispetto al ricovero, nel campione in esame.

In relazione ai risultati ottenuti, nella totalità dei test eseguiti, il 22,1 % dei casi risultava positivo ad almeno un'analisi qualitativa per IgM, mentre il 29,5% per IgG.

Una positività ad una delle due Immunoglobuline era rilevata, analizzando tutti i test, nel 31,9% dei pazienti.

Gli esiti del primo test sierologico sono rappresentati nella Figura sotto (Fig. 3)

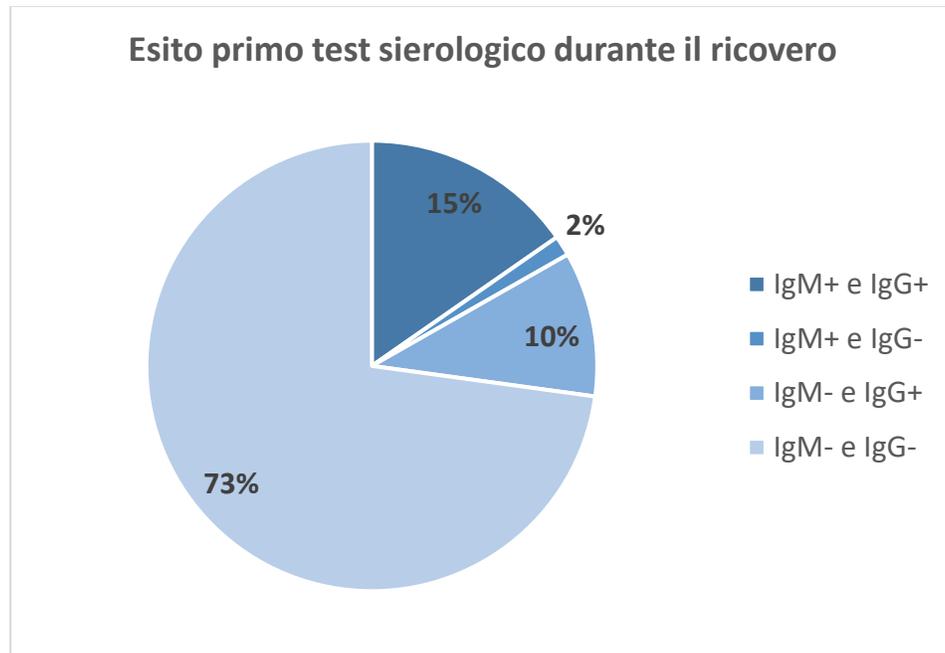


Figura 3: frequenze di risultati del profilo immunologico dei pazienti al primo test sierologico durante il ricovero.

Per quanto attiene il tempo intercorso tra il primo ed il secondo test sierologico (tralasciando il terzo ed il quarto, in quanto scarsamente rappresentati dal punto di vista numerico) effettuati nel corso del ricovero il tempo medio è di 8 giorni con mediana di 6 giorni (IQR 3-12) (Fig. 4).

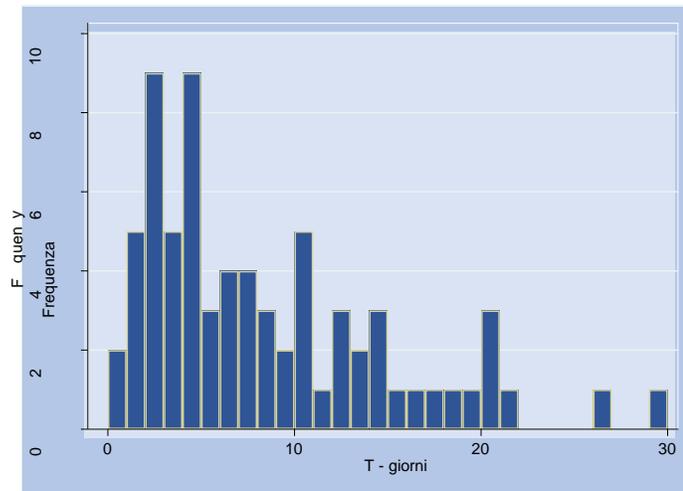


Figura 4: distribuzione del periodo intercorso tra il primo ed il secondo test sierologico.

Si è ritenuto di valutare le differenze di risultato ottenute tra il primo test ed il secondo, ed in basso è riportata la tabella riassuntiva (si consideri che le variabili a quattro categorie sono così nominate: 0=IgM- IgG-; 1=IgM+ IgG-; 2=IgM- IgG+; 3=IgM+ IgG+). Sull'asse delle ordinate non compare la categoria 1 in quanto non sono state ripetute indagini a pazienti risultati IgM positivi ed IgG negativi al primo test (Tab. 3).

sier1_4cat	sier2_4cat				Total
	0	1	2	3	
0	39 73.58	2 3.77	4 7.55	8 15.09	53 100.00
2	0 0.00	0 0.00	0 0.00	3 100.00	3 100.00
3	2 33.33	0 0.00	1 16.67	3 50.00	6 100.00
Total	41 66.13	2 3.23	5 8.06	14 22.58	62 100.00

Tabella 3: confronto tra risultati di primo e secondo test sierologico effettuato durante la degenza.

Come è possibile notare in 3 casi il primo risultato dimostra IgM negative ed IgG positive ed il secondo attesta positività per entrambi i marcatori rilevati. I rispettivi tempi intercorsi tra i due test, nei casi specifici risulta essere rispettivamente di 2 giorni, 16 giorni e 20 giorni.

Andando a correlare gli esiti del primo test molecolare da tampone naso-faringeo effettuato in ospedale e quelli del primo test sierologico, si sono ottenuti i risultati di seguito riportati.

Valorizzando la cronologia intercorsa tra i due esami diagnostici, si sono distinte tre possibilità:

A) il prelievo tramite tampone è stato effettuato prima del prelievo di sangue per test sierologici;

B) il prelievo tramite tampone è stato effettuato il medesimo giorno del prelievo di sangue per test sierologici;

C) il prelievo tramite tampone è stato effettuato successivamente al prelievo di sangue per test sierologici.

La condizione A si è verificata per 73 pazienti ed i risultati sono riportati in tabella (Tab. 4).

TAM1	sieri_4cat				Total
	0	1	2	3	
NEGATIVO	46 90.20	0 0.00	1 1.96	4 7.84	51 100.00
POSITIVO	12 57.14	1 4.76	2 9.52	6 28.57	21 100.00
Total	58 80.56	1 1.39	3 4.17	10 13.89	72 100.00

Tabella 4: confronto tra i risultati di test molecolare precedente e sierologici successivi.

Come si può notare, in 12 casi, a fronte di un test molecolare positivo effettuato precedentemente le immunoglobuline sono risultate entrambe negative, mentre in 5 casi un tampone negativo precedente è stato seguito da una positività (in un caso solo per le IgG, mentre in 3 sia per IgM che per IgG).

La media di tempo intercorsa tra i due test è stata di 8 giorni (DS 7) e la mediana di 4 (IQR 2-13) (Fig. 5).

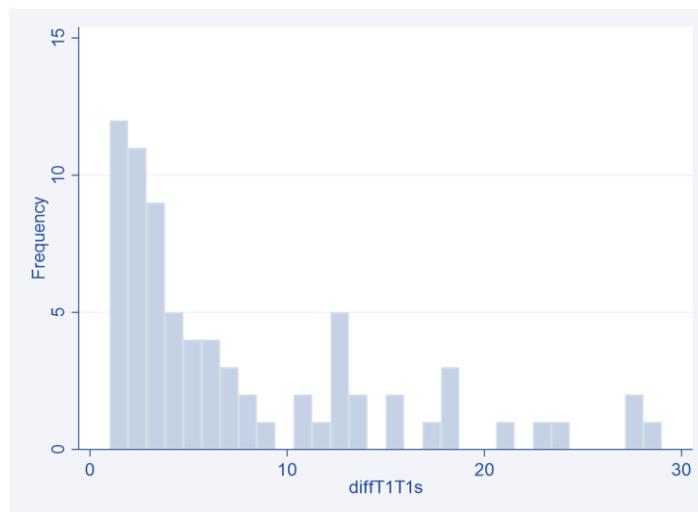


Figura 5: tempo intercorso tra l'esecuzione del tampone ed il prelievo per il test sierologico.

La condizione B si è verificata, invece, per 246 pazienti ed i risultati sono riportati in tabella (Tab. 5).

TAM1	sier1_4cat				Total
	0	1	2	3	
NEGATIVO	117 87.97	0 0.00	5 3.76	11 8.27	133 100.00
POSITIVO	56 54.90	3 2.94	20 19.61	23 22.55	102 100.00
Total	173 73.62	3 1.28	25 10.64	34 14.47	235 100.00

Tabella 5: risultati delle due analisi effettuate il medesimo giorno.

Analizzando i prelievi effettuati lo stesso giorno emerge come in 11 pazienti, a fronte di un test molecolare negativo, si sia avuta positività sia per IgM che per IgG e come ad un risultato positivo dell'analisi del tampone, in 56 casi le immunoglobuline siano entrambe negative ed in 20 casi dimostrino la positività per le sole IgG.

La terza condizione, definita C, si è verificata per 21 pazienti ed i risultati sono riportati in tabella (Tab. 6).

sier1_4cat	NEGATIVO	POSITIVO	Total
0	7 46.67	8 53.33	15 100.00
1	0 0.00	1 100.00	1 100.00
3	2 40.00	3 60.00	5 100.00
Total	9 42.86	12 57.14	21 100.00

Tabella 6: esiti di primi esami sierologici effettuati all'ingresso confrontati con risultati di test molecolari effettuati successivamente.

In questo caso, nessun paziente che presentasse profilo sierologico di negatività alle IgM e positività alle IgG è stato sottoposto successivamente a tampone per la ricerca molecolare del virus. Due pazienti con IgM ed IgG positive hanno ottenuto un test molecolare negativo ed 8 casi con sierologia negativa hanno successivamente presentato positività alla ricerca molecolare.

Molto interessante appare la distribuzione cronologica rispettiva delle due analisi: la media di tempo intercorsa tra i due test è stata di 2 giorni (DS 2) e la mediana di 1 giorno (IQR 1-2) (Fig. 6).

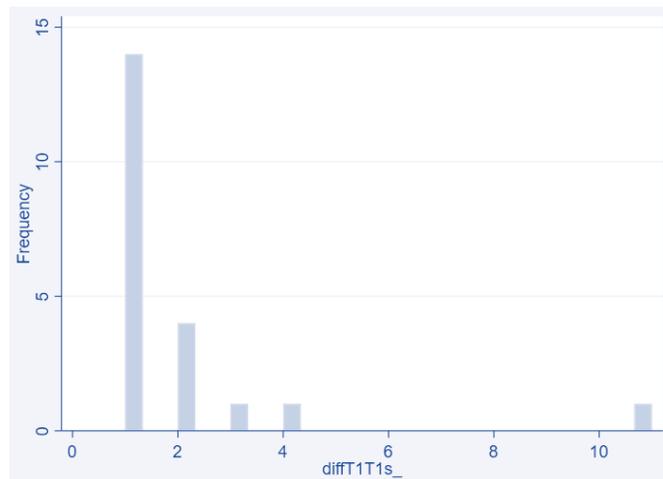


Figura 6: tempo intercorso tra l'esecuzione dei test sierologici ed il prelievo per il test molecolare.

Infine, si è analizzato il risultato dell'ultimo test sierologico effettuato prima del decesso (Tab. 7) rispetto alla causa di morte certificata (con COVID 0 si è denominata l'assenza di infezione da Sars-Cov-2 sia come causa che come concausa nel determinismo del decesso, intesa come assenza di riferimenti ad infezione o a patologia nella consecutio temporale patogenetica certificata, mentre con COVID 1 si è denominata la presenza della stessa nelle cause di morte certificate).

tab last

last	Freq.	Percent	Cum.
0	238	68.79	68.79
1	6	1.73	70.52
2	34	9.83	80.35
3	68	19.65	100.00
Total	346	100.00	

Tabella 7: esiti dell'ultima valutazione sierologica effettuata durante il ricovero, prima del decesso.

Incrociando le due variabili risulta come in 97 casi, a fronte di una sierologia negativa, la causa di morte sia stata attribuita, almeno in forma concausale alla COVID-19 e come in 26 casi l'infezione da Sars-CoV-2 non sia stata menzionata nelle cause del decesso pur a fronte di una qualche positività sierologica: in quest'ultimo caso si noti come 9 casi dimostrino positività per le sole IgG, mentre i restanti 17 siano caratterizzati dalla presenza di IgM nel siero dei pazienti (Tab. 8 e Fig. 6).

COVID	last				Total
	0	1	2	3	
0	141 84.43 59.24	1 0.60 16.67	9 5.39 26.47	16 9.58 23.53	167 100.00 48.27
1	97 54.19 40.76	5 2.79 83.33	25 13.97 73.53	52 29.05 76.47	179 100.00 51.73
Total	238 68.79 100.00	6 1.73 100.00	34 9.83 100.00	68 19.65 100.00	346 100.00 100.00

Tabella 8: risultato degli ultimi sierologici disponibili e causa del decesso.

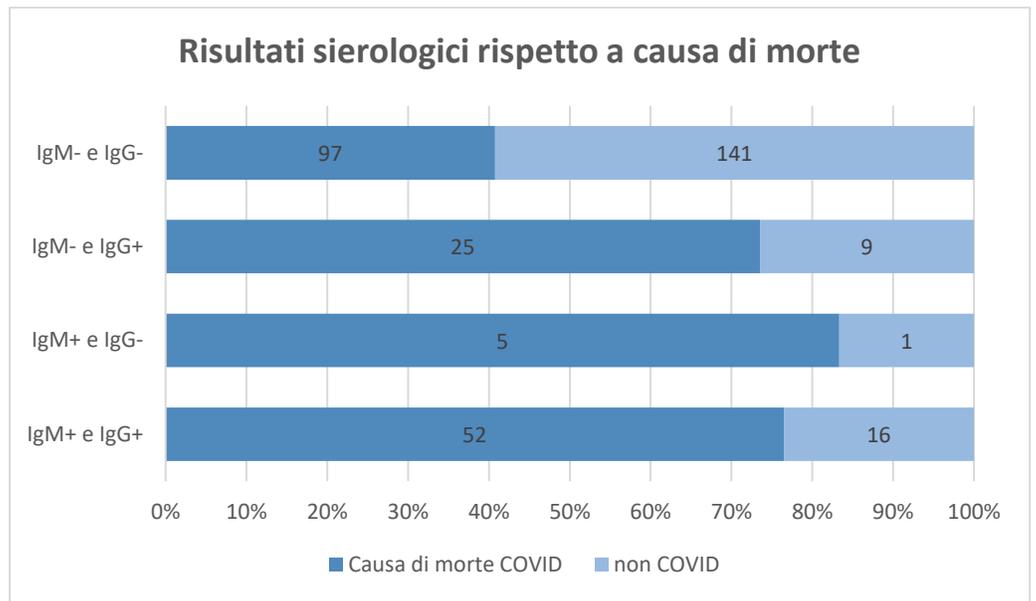


Figura 6: rappresentazione grafica della tabella precedente.

In ultimo si rappresentano i casi deceduti con diagnosi di morte COVID-19 correlata ai risultati delle ultime indagini sierologiche ed all'esito degli ultimi test molecolari effettuati prima dell'*exitus*: tra 179 decessi certificati COVID-19 correlati, dei 97 con sierologia negativa, 22 risultavano negativi al test molecolare; tutti i casi con le sole IgM positive avevano un tampone positivo per Sars-CoV-2; 3 casi avevano l'ultimo test molecolare negativo tra quelli con le sole IgG positive e tra i 52 con entrambi gli anticorpi positivi, 11 risultavano negativi al tampone molecolare (Fig. 7).

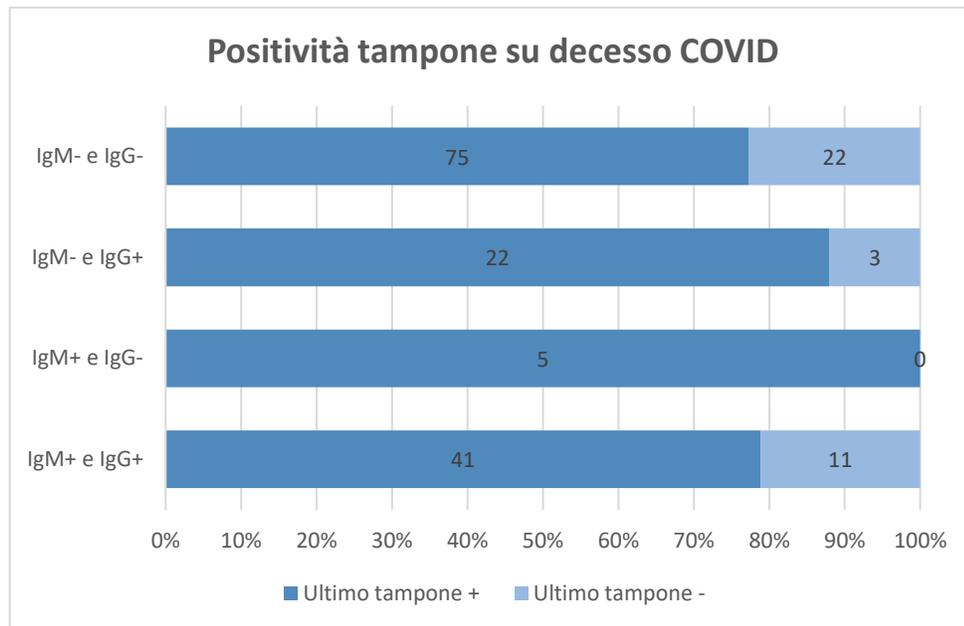


Figura 7: correlazione tra risultati degli ultimi test diagnostici nei pazienti con diagnosi di morte COVID-19 correlata.

4. DISCUSSIONE

I dati raccolti e successivamente analizzati hanno permesso di confermare la preponderanza del sesso maschile rispetto a quello femminile nella popolazione dei deceduti a causa di COVID-19 rispetto ai deceduti per cause non attinenti l'infezione da Sars-CoV-2 [38].

Nella coorte presa in esame, poco meno del 50% dei deceduti è stata sottoposta alla ricerca di anticorpi specifici per la patologia pandemica: partendo dal presupposto che il test anticorpale necessita di una minor specializzazione e di un

minor tempo per il raggiungimento del risultato, tale risultato dimostra come - nel periodo preso in considerazione - l'esecuzione di test sierologico non fosse la prima scelta diagnostica; essendo i clinici maggiormente orientati, con ogni probabilità, all'esecuzione del test molecolare, percepito come più affidabile e come maggiormente indicativo della condizione clinica, e soprattutto, epidemiologica in atto (paziente positivo al tampone considerato infettivo e, pertanto, inserito nel cosiddetto percorso sporco, al fine di ridurre la possibilità di diffusione intraospedaliera).

Tali risultati non possono prescindere dall'essere considerati rispetto al momento di produzione: oggi, quasi tutti i pazienti che accedono in ospedale sono sottoposti a diagnostica per Sars-CoV-2, ma a marzo 2020 i laboratori accreditati non erano assolutamente in grado di gestire la mole di richieste dei pazienti gravi e non era pertanto possibile richiedere anche test a scopo di screening o prevenzione in ambito ospedaliero, essendo la diagnosi su pazienti gravi prioritaria.

Analizzando la distribuzione dei test effettuati durante il ricovero ospedaliero, emerge come gli stessi siano stati ripetuti (fino ad un massimo di 4 volte, ma in soli 3 casi) con maggior frequenza a fronte di un risultato precedente negativo per le Immunoglobuline M. Appare meritevole di segnalazione, infatti, come nei casi in cui al primo rilievo siano state riscontrati solo anticorpi IgM positivi, non si sia più provveduto a richiedere test successivi, mentre nel 16,7% dei casi di negatività, si è provveduto ad effettuare nuove analisi sierologiche. Tale rilievo potrebbe essere

dettato dal fatto che la positività al test per IgM richiesto dal personale fosse, quantomeno in alcuni casi, un risultato atteso (integrandosi in armonia con le condizioni cliniche del paziente) e pertanto non meritevole di ulteriore conferma.

Per quanto attiene la distribuzione cronologica dei test nel corso del ricovero, la maggior parte dei pazienti ha effettuato il prelievo all'ingresso in ospedale (o nei primissimi giorni di degenza) ed ha ripetuto il test dopo circa una settimana.

Tale risultato grossolanamente rilevato, appare assolutamente appropriato ed idoneo al fine di valutare l'evoluzione temporale della risposta immunologica nel soggetto positivo [5, 39] (Fig. 8).

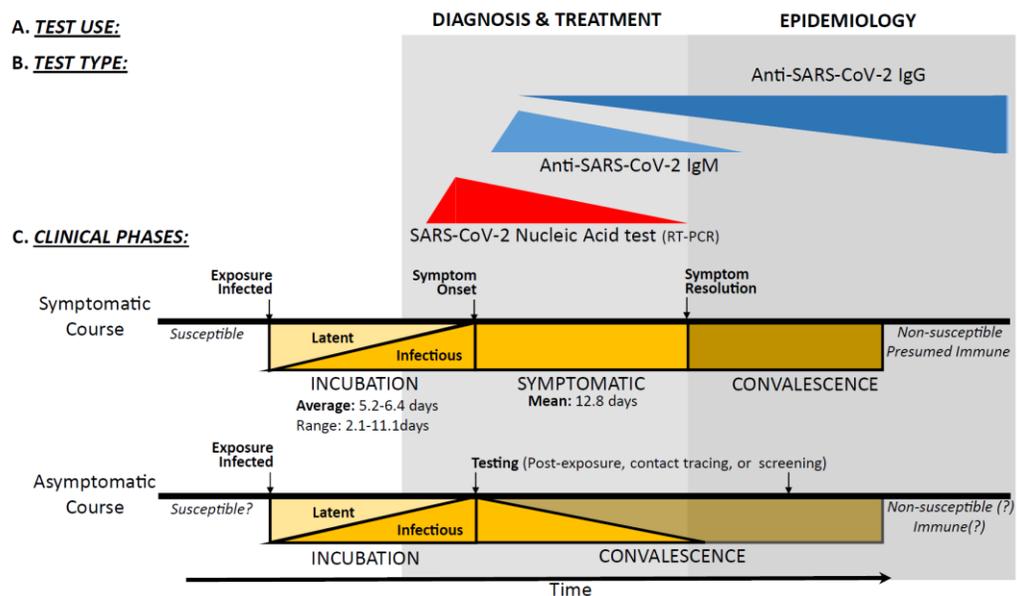


Figura 8: fasi della malattia ed andamento nel tempo con indicazione dell'utilità dei test diagnostici. Da Ward et al. [5] integra la progressione patogenetica della COVID-19 con i test diagnostici

Benchè la letteratura scientifica sia ancora fervente e non vi siano nozioni certe sull'andamento della risposta immunitaria, ciò che appare emergere, anche se con una discreta variabilità, è che vi sia una ridotta finestra temporale tra la comparsa di Immunoglobuline M ed Immunoglobuline G; con inizio di rilevazione di positività per un esiguo numero di soggetti almeno a tre giorni dalla comparsa dei sintomi e il picco è raggiunto dopo circa 20 giorni, sia per IgM che per IgG (Fig. 9).

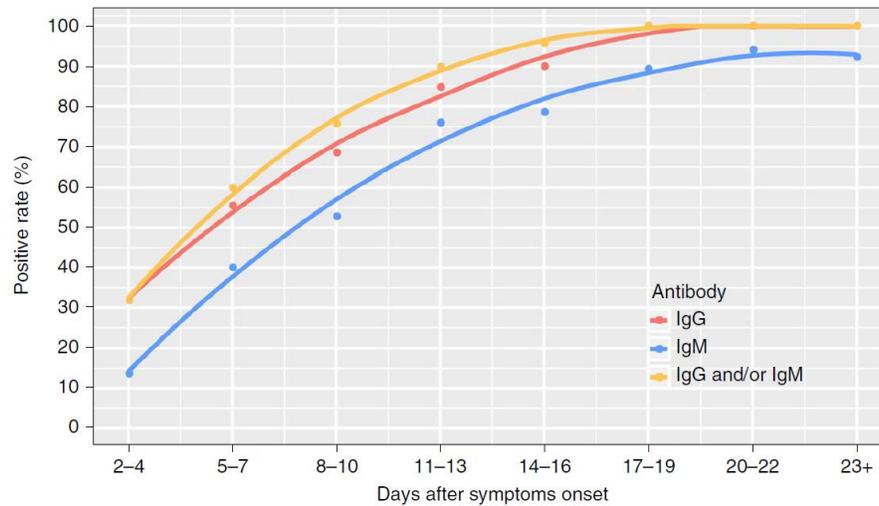


Figura 9 – comparsa di test sierologici positivi nel tempo. Tratta da Quan-Xin Long et al. [39].

In virtù del ritardo di comparsa degli anticorpi, una recente metanalisi non ha solo messo in dubbio l'utilità dei test sierologici nella diagnosi di infezione da Sars-CoV-2, ma ne ha sottolineato la scarsa sensibilità e specificità (Fig. 10).

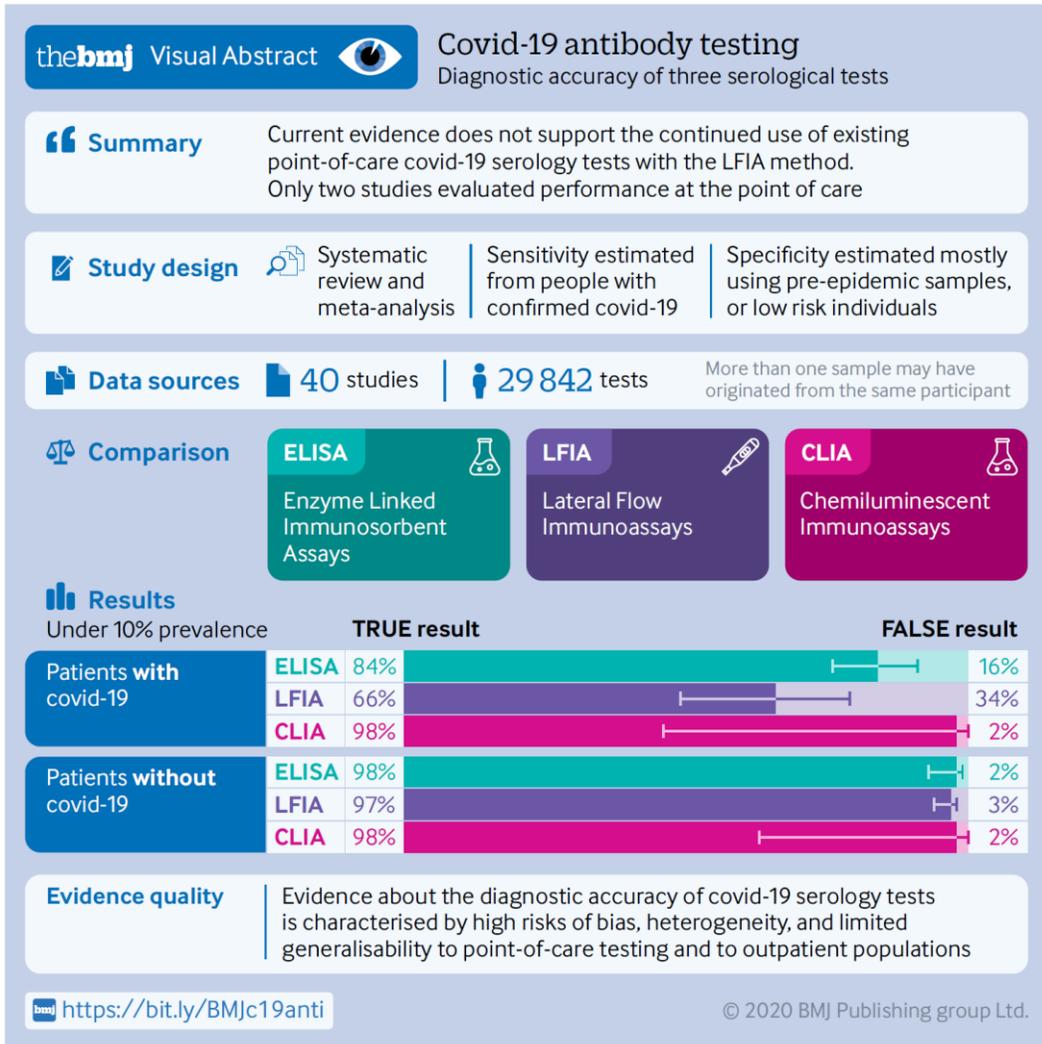


Figura 10 – sintesi dei risultati della metanalisi. Tratta da Bastos ML et al [40].

Nella tabella riassuntiva di tutte le tipologie di test indicate nella metanalisi, emerge come per alcuni sia stata rilevata una sensibilità non superiore al 70% e come dalla metanalisi emergano specificità di alcune tipologie di test anche inferiori all'80%.

La grande perplessità ed i limiti descritti in Letteratura giustificano ampiamente lo scetticismo dei clinici (evidenziato dai risultati qui discussi) nel basare la diagnosi di infezione su di un solo test sierologico.

Nel campione preso in esame, non si è ritenuto di formulare giudizi in termini di sensibilità e specificità dei test utilizzati, in virtù dell'impossibilità di formulazione di diagnosi certa di malattia per ciascun caso (con i soli dati analizzati in questo studio).

Sarà necessaria una capillare e attenta valutazione di tutti i dati clinici dei casi selezionati nella coorte, oltre a una valutazione critica ragionata della *consecutio* causale del decesso, per poter azzardare valutazioni di sensibilità e specificità dei test diagnostici. Ciò consentirà di ridurre il bias determinato dalla forte dipendenza tra diagnosi di COVID-19, diagnosi di morte di COVID-19 ed esito del test diagnostico: in altre parole, risulta difficile valutare l'accuratezza di un test diagnostico basandosi su di una diagnosi prima ed una causa di morte che, per essere formulata, avrebbe bisogno proprio di quel risultato.

Alcune discordanze, ad ogni modo, saltano agli occhi analizzando i risultati dei test molecolari in associazione con i risultati della comparsa anticorpale: in tre pazienti, infatti il primo risultato sierologico dimostra IgM negative ed IgG positive ed il secondo attesta positività per entrambi i marcatori rilevati. I rispettivi tempi intercorsi tra i due test risultano essere rispettivamente di 2 giorni, 16 giorni e 20

giorni; sebbene vi sia una certa sovrapposizione tra comparsa di IgM e di IgG, non risulta che le IgG compaiano come prima difesa anticorpale rispetto alle IgM; è improbabile, peraltro, che possa trattarsi di una seconda infezione in virtù del breve lasso di tempo tra i due prelievi.

La spiegazione più probabile è che si tratti di casi di falso negativo IgM alla prima analisi o di falso positivo IgM alla seconda.

Emblematici risultano anche i risultati ottenuti incrociando i risultati dei test molecolari ed i test sierologici effettuati lo stesso giorno: in 11 pazienti a fronte di un test molecolare negativo, si è avuta positività sia per IgM che per IgG (risultato che può indicare o falsi positivi/negativi oppure la presenza di memoria immunologica in infezione pregressa recente) e come ad un risultato positivo dell'analisi del tampone, in 56 casi le immunoglobuline siano entrambe negative (risultato che troverebbe conferma nella diagnosi di infezione precoce, prima della comparsa anticorpale) ed in 20 casi dimostrino la positività per le sole IgG (questo dato difficilmente può trovare una spiegazione che escluda l'errore di un test diagnostico).

Per quanto attiene la concordanza tra valutazione della presenza di anticorpi e diagnosi di morte COVID-19 correlata (valutata rispetto all'ultima analisi disponibile), nel 54,2% di casi deceduti a causa del Sars-CoV-2, entrambe le

Immunoglobuline erano negative ed il 23,5% dei pazienti deceduti per altre cause dimostravano la positività ad entrambi gli anticorpi.

Da notare tuttavia che l'83,3% dei pazienti con sole IgM positive (ed IgG negative) è deceduto con causa di morte COVID-19 correlata.

Analizzando il dato in negativo (ossia non la diagnosi ma l'assenza di diagnosi), l'84,4% dei pazienti deceduti per causa non attinente a COVID-19 avevano test sierologici negativi per entrambi gli anticorpi.

Incrociando i dati sopra descritti con i risultati degli ultimi test molecolari effettuati per i soli casi in cui il decesso è stato attribuito a COVID-19, ancora una volta si rilevano alcune incongruenze: in 22 casi non vi è alcuna conferma di infezione Sars-CoV-2. In alcuni tra questi casi, precedenti test molecolari erano risultati positivi e le raccomandazioni dell'OMS riguardo la certificazione delle cause di morte COVID-19 correlate non specificano se la conferma molecolare dell'infezione debba essere aggiornata al decesso o se ne basti una nella storia clinica di un individuo, a fine di certificazione, tuttavia l'assenza di infezione in corso e di memoria immunologica con precedenti tamponi positivi nel corso del medesimo ricovero suggerirebbe un periodo di malattia molto breve con altrettanto breve comparsa e scomparsa di anticorpi oppure, in alternativa falsi negativi ai test diagnostici.

Sempre analizzando gli stessi dati, si evidenzia come in tre pazienti vi fosse evidenza delle sole IgG e negatività del tampone: anche in questo caso, se si trattasse di altra

patologia meglio nota e con test diagnostici qualtomeno percepiti come più accurati, la conoscenza clinica di base ci porterebbe ad ipotizzare che questi pazienti si trovassero nella fase quantomeno di convalescenza della patologia, in assenza di infezione acuta in atto. Tale assunto non implica necessariamente un errore nella diagnosi di morte (sempre di più si prende coscienza di complicazioni tardive ricollegabili all'infezione, anche mortali [41-46]) ma quantomeno impone una accuratissima valutazione di tutti gli elementi clinici a disposizione.

Infine si evidenzia come 11 pazienti mostrassero entrambi gli anticorpi positivi e la negatività al test molecolare.

Di fatto su 179 decessi certificati COVID-19 correlati, 36 non possono trovare il razionale fisiopatologico negli esiti dei test sierologici e del test molecolare.

I risultati ottenuti mostrano come i test sierologici, anche supportati da conferma molecolare, non siano sufficienti per determinare l'implicazione o meno dell'infezione da Sars-CoV-2 nel determinismo del decesso: la scarsa (in termini di certezze) letteratura scientifica ha dimostrato che la comparsa e scomparsa delle Immunoglobuline M ed Immunoglobuline G nella risposta immunitaria verso il virus Sars-CoV-2 [47] non è sovrapponibile a quanto tipicamente accade per altri virus, con andamento abbastanza prevedibile nel tempo e comparsa di IgM precoci, breve periodo di sovrapposizione e successivamente IgG tardive.

La risposta parrebbe in generale più tardiva con presenza anticorpale sovrapposta di IgM ed IgG a comparsa molto ravvicinata e molti casi di successiva scomparsa totale del titolo anche solo ad alcuni mesi di distanza dall'infezione.

Tale incertezza rende la valutazione dei risultati dei test sierologici al momento inadeguata al fine dell'accertamento della causa di morte.

5. CONCLUSIONI

I risultati qui riportati, che è bene specificare ancora una volta, riguardano una coorte specifica e particolare di casi, ossia quelli deceduti per qualsivoglia causa nota nel corso della prima ondata pandemica da Sars-CoV-2, confermano che i soggetti di sesso maschile sono più colpiti da complicanze mortali legate alla COVID-19 [38].

I dati non appaiono mostrare una significatività statistica tra positività ai test sierologici e morte a causa di COVID-19, evidenziando come in oltre il 50% la negatività anticorpale non abbia influito nella certificazione clinica della causa della morte, anche a fronte di una conferma negativa molecolare ottenuta sull'analisi dell'ultimo prelievo mediante tampone naso-faringeo (il 22,7% dei casi con sierologia negativa e diagnosi di morte COVID-19 correlata, infatti dimostrava negatività molecolare).

Una scorretta o incompleta determinazione della causa di morte può fornire elementi distorsivi e fuorvianti, non solo favorendo il proliferare di denunce verso i professionisti sanitari e richieste di risarcimento del danno, ma anche, in un contesto più ampio, alimentando la percezione statistica di un fenomeno morboso rispetto ad un altro, implicando provvedimenti e prese di posizione di portata nazionale o sovranazionale, basate proprio sulla raccolta di questi dati [48].

Purtroppo l'indiscusso gold standard Medico-Legale per la diagnosi di morte, ossia l'indagine autoptica, risulta ancora molto limitata a causa della necessità di rispettare le buone pratiche nazionali [49] che ne impongono l'esecuzione solo in sale settorie certificate per Livello di BioSicurezza 3, a pressione negativa, con un minimo di 6-12 ricambi di aria per ora ed espulsione della stessa all'esterno attraverso filtro HEPA, nient'affatto ubiquitariamente rappresentate sul territorio nazionale (la Regione Liguria, ad esempio, non è dotata di nessuna sala certificata). Nonostante siano passati molti mesi, solo poche strutture sul territorio nazionale hanno potuto adeguarsi ed ottenere la certificazione, rendendo di fatto le autopsie su cadaveri deceduti, risultati positivi per Sars-CoV-2, numericamente esigue e non distribuite in modo costante sul territorio.

La situazione emergenziale non ha ridotto ma, al contrario, ha aumentato le richieste da parte sia dei Magistrati, ma anche dei privati cittadini al Medico Legale di definire la correlazione tra un decesso e la COVID-19 (che sia per ipotesi di

responsabilità professionale sia in ambito penalistico che civilistico, oppure in ambito INAIL, ed anche in ambito di polizza privata).

Definire la causa di morte e il meccanismo patogenetico che l'ha determinata è di fondamentale importanza, e non solo da un punto di vista forense. Infatti, innanzitutto, lo studio post-mortem delle modificazioni organiche indotte dalla malattia consentirebbe di fornire ai clinici importanti strumenti nella pianificazione di un corretto iter diagnostico-terapeutico. Inoltre, l'analisi di campioni selezionati di tessuti e liquidi organici potrebbe meglio chiarire i meccanismi di trasmissione e prosecuzione della malattia, garantendo un migliore controllo della diffusione della stessa e permettendo di prevenire nuove emergenze. Non da ultimo, le autopsie contribuirebbero alle conoscenze epidemiologiche: il modo migliore per definire se un paziente è effettivamente deceduto a causa della COVID-19 resta l'autopsia (la sola diagnosi clinica si è infatti rivelata inadeguata, con errori in circa il 30% dei casi [50, 51]).

L'impossibilità per i medici legali di eseguire autopsie in numero adeguato è stata, senza ombra di dubbio, un'occasione persa e un enorme danno dal punto di vista scientifico [52].

Questo impone di percorrere due vie: implementare la presenza di sale autoptiche adeguate per poter procedere in sicurezza e secondo buone pratiche accreditate agli accertamenti autoptici, oppure identificare (se esistenti) criteri clinico-

strumentali efficaci ed univoci che permettano di fornire le medesime garanzie dell'autopsia in termini di certezza della *causa mortis* in virtù delle ovvie implicazioni delle stesse in ambito Medico-Legale.

Benchè le preposizioni semplici nella lingua italiana abbiano una loro fondamentale importanza, la disciplina medico legale non deve lasciarsi trascinare da derive colloquiali che non hanno nulla a che spartire con il metodo trasmesso dai Maestri della Disciplina: non è possibile, infatti, formulare alcuna speculazione scientifica sulla distinzione tra deceduti PER COVID-19 e deceduti CON COVID-19, ma ciò che andrà valutato, questa volta *ex post*, per determinare con accuratezza scientifica la portata (comunque drammatica per quanto attiene ciò che è stata l'esperienza quotidiana) sarà il determinismo dell'infezione da Sars-CoV-2 nel decesso di ogni singolo paziente in termini di CAUSA o CONCAUSA dello stesso, senza temere di non inserire una positività ad un test diagnostico, magari occasionale, tra la concatenazione degli eventi che hanno portato alla morte di un individuo, se la stessa NON HA inciso nel determinarlo o nel favorirlo.

I dati raccolti ci stimolano ad una accurata valutazione della storia clinica completa dei pazienti: i dati anamnestici (con le relative comorbidità), la sintomatologia presentata, i referti radiografici e tomografici ed i valori biochimici (quali emocromo, proteina C reattiva, procalcitonina, D-dimero, fibrinogeno e altri) potranno certamente implementare quanto evidenziato con i soli test diagnostici (che restano fondamentali) relativamente alla rivalutazione critica della causa del

decesso che, in alcuni casi, potrebbe non trovare esaustive le indicazioni dell'OMS recepite dall'ISS [53].

D'altro canto, l'implementazione di metodiche ancillari (quali la biochimica, la biologia molecolare e la genetica) post-mortali o di tecniche mini-invasive autoptiche potrebbe permettere di gestire adeguatamente l'attuale rischio biologico dettato dalla pratica forense, in attesa dell'auspicabile adeguamento diffuso delle sale autoptiche.

6. BIBLIOGRAFIA

[1] Dramé M, Tabue Teguo M, Proye E et al. Should RT-PCR be considered a gold standard in the diagnosis of COVID-19? *J Med Virol.* 2020;92(11):2312-2313.

[2] Woloshin S, Patel N, Kesselheim AS. False negative tests for SARS-CoV-2 infection—challenges and implications. *N Engl J Med.* 2020;383(6):e38.

[3] Watson J., Whiting P.F., Brush J.E. Interpreting a COVID-19 result test. *BMJ* 2020; 369:m 1808.

[4] Russo A, Minichini C, Starace M, et al. Current status of laboratory Diagnosis for COVID-19: a narrative review. *Infect Drug Resist.* 2020;13:2657-2665.

[5] Ward S, Lindsley A, Courter J et al. Clinical testing for COVID-19. *Allergy Clin Immunol.* 2020;146(1):23-34.

- [6] Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A Narrative Review. *Ann Intern Med* 2020; 172:726.
- [7] Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosens Bioelectron*. 2021;172:112752.
- [8] Hani C, Trieu NH, Saab I et al. COVID-19 pneumonia: A review of typical CT findings and differential diagnosis. *Diagn Interv Imaging*. 2020;101(5):263-268.
- [9] Adams HJA, Kwee TC, Yakar D et al. Systematic Review and Meta-Analysis on the Value of Chest CT in the Diagnosis of Coronavirus Disease (COVID-19): *Sol Scientiae, Illustra Nos. Am J Roentgenol*. 2020;215(6):1342-1350.
- [10] Venter M, Richter K. Towards effective diagnostic assays for COVID-19: a review. *J Clin Pathol*. 2020;73(7):370-377.
- [11] Bohn MK, Lippi G, Horvath A et al. Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19: IFCC taskforce evaluation of the latest evidence. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(7):1037-1052.
- [12] Younes N, Al-Sadeq DW, Al-Jighefee H et al. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*. 2020;12(6):582.

- [13] Whitcroft KL, Hummel T. Olfactory Dysfunction in COVID-19: Diagnosis and Management. *JAMA*. 2020;323(24):2512-2514.
- [14] Lippi G, Mattiuzzi C, Bovo C et al. Current laboratory diagnostics of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Acta Biomed*. 2020;91(2):137-145.
- [15] Russo A, Minichini C, Starace M, et al. Current status of laboratory Diagnosis for COVID-19: a narrative review. *Infect Drug Resist*. 2020;13:2657-2665.
- [16] Weissleder R, Lee H, Ko J et al. COVID-19 Diagnostics in Context. *Sci Transl Med* 2020; 12:eabc1931.
- [17] Ministero della Salute – Istituto Superiore di Sanità. Nota tecnica ad interim. Test di laboratorio per SARS-CoV-2 e loro uso in sanità pubblica. Aggiornato al 23 ottobre 2020.
- [18] World Health Organization. Target product profiles for priority diagnostics to support response to the COVID-19 pandemic v.1.0. Geneva: WHO; 2020.
- [19] World Health Organization. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. Interim guidance. Geneva: WHO; 2020.
- [20] Centers for Disease Control and Prevention. Overview of Testing for SARS-CoV-2.

- [21] Sanduzzi A, Sanduzzi Zamparelli S. Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swabs, And/Or Serology for SARS COVID-19: What Are We Looking For? *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(9): 3289.
- [22] Xiang F, Wang X, He X, et al. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020; 71(8):1930-1934.
- [23] European Commission. Current performance of COVID-19 test methods and devices and proposed performance criteria (16 April 2020). Brussels: EC; 2020.
- [24] FDA. EUA Authorized Serology Test Performance. COVID-19. Emergency Use Authorizations for Medical Devices.
- [25] Veeranna CH, Rani S. Cause of Death Certification in COVID-19 Deaths. *Indian J Crit Care Med*. 2020; 24(9):863-867.
- [26] Zhang B, Zhou X, Qui Y et al. Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19. *PLoS One*. 2020; 15(7):e0235458.
- [27] Gill JR, DeJoseph ME. The importance of proper death certification during COVID-19 pandemic. *JAMA*. 2020; 324(1):27-28.
- [28] Vena A, Giacobbe DR, Di Biagio A et al. Clinical characteristics, management and in-hospital mortality of patients with coronavirus disease 2019 in Genoa, Italy. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26(11):1537-1544.

- [29] Pomara C, Li Volti G, Cappello F. COVID-19 Deaths: are we sure it is pneumonia? Please autopsy, autopsy, autopsy! J Clin Med. 2020; 9(5): 1259.
- [30] Melo de Souza PM, Gerson G, Silva Dias J et al. Validation of verbal autopsy and nasopharyngeal swab collection for the investigation of deaths at home during the COVID-19 pandemics in Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(11):e0008830.
- [31] Barth RF, Xu X, Buja LM. A call to action: the need for autopsies to determine the full extent of organ involvement associated with COVID-19. J.chest. 2020; 158(1):43-44.
- [32] WHO. International guidelines for certification and classification (coding) of covid-19 as cause of death. 16 april 2020.
- [33] Istat. Impatto dell'epidemia covid-19 sulla mortalità: cause di morte nei deceduti positivi a sars-cov-2.
- [34] Rapporto ISS COVID-19 n 49/2020.
- [35] Dhama K, Khan S, Tiwari R, et al. Coronavirus Disease 2019 – COVID-19. Clin Microbiol Rev 2020; 33(4):e00028-20.
- [36] Deceto Legislativo n. 101 del 10 agosto 2018 – recepimento del regolamento UE 2016/679, noto come GDPR.

- [37] Garante per la protezione dei dati personali. Autorizzazione n. 9/2016 - Autorizzazione generale al trattamento dei dati personali effettuato per scopi di ricerca scientifica.
- [38] ISTAT-ISS. Impatto dell'epidemia COVID-19 sulla mortalità totale della popolazione residente. Periodo gennaio-novembre 2020. 30 dicembre 2020.
- [39] Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. NATURE MEDICINE 2020; 26:845–848.
- [40] Bastos ML, Tavaziva G, Abidi SK et al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. BMJ 2020; 370:m2516.
- [41] Kochi AN, Tagliari AP, Forleo GB et al. Cardiac and athythmic complications in patients with COVID-19. J Cordiovasc Electrophysiol. 2020; 31(5):1003-1008.
- [42] Long B, Brady WJ, Koyfman A et al. Cardiovascular complications in COVID-19. Am J Emerg Med. 2020; 38(7): 1504-1507.
- [43] Abo Taleb HA. Neurological complications in COVID-19 patients and its implications for associated mortality. Curr Neurovasc Res. 2020; 17(4): 522-530.
- [44] Mongioì LM, Barbagallo F, ondorelli RA et al. Possible long-term endocrine-metabolic complications in COVID-19: lesson from the SARS model. Endocrine. 2020; 68(3):467-470.

- [45] Jamwal S, Gautam A, Elsworth J et al. An updated insight into the molecular pathogenesis, secondary complications and potential therapeutics of COVID-19 pandemic. *Life Sci.* 2020; 257:118105.
- [46] Wu J, Song S, Cao H-C et al. Liver diseases in COVID-19: etiology, treatment and prognosis. 2020; 26(19):2286-2293.
- [47] Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y et al. Antibody tests for identification of current and past infection with Sars-CoV-2. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2020.
- [48] Lin TPH, Wan KH, Huang SS et al. Death tolls of COVID-19: Where come the fallacies and ways to make them more accurate. *Glob Public Health.* 2020; 15(10):1582-1587.
- [49] COMLAS E SIAPEC-IAP. Infezione respiratoria da COVID-19 - documento su autopsia e riscontro diagnostico. 22 marzo 2020.
- [50] Tejerina EE, Padilla R, Abril E, et al. Autopsy-detected diagnostic errors over time in the intensive care unit. *Hum Pathol.* 2018; 76:85-90.
- [51] Roosen J, Frans E, Wilmer A et al. Comparison of premortem clinical diagnoses in critically ill patients and subsequent autopsy findings. *Mayo Clin Proc.* 2000; 75(6):562-567.

[52] Salerno M, Sessa F, Piscopo A et al. No Autopsies on COVID-19 Deaths: A Missed Opportunity and the Lockdown of Science. *J Clin Med*. 2020; 9(5):1472.

[53] Solarino B, Ferorelli D, Dell'Erba A. Post-mortem routine practice in the era of the COVID-19 pandemic. *J Forensic Leg Med*. 2020; 74:102010.