

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS): una nuova ed intrigante sfida diagnostica

Giuseppe Lippi¹, Camilla Mattiuzzi²

¹Dipartimento di Scienze Morfologico e Biomediche, Sezione Istituto di Chimica Microscopia Clinica, Università degli Studi di Verona, Verona

²Istituto di Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Verona, Verona

ABSTRACT

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS): a new and intriguing diagnostic challenge

The recent rise of some emerging infective pathologies has focalized the attention of hygienists, microbiologists and laboratorists, struggling to carry out efficient preventive and diagnostic strategies to circumscribe or eradicate the new epidemics. Owing to the relative aspecificity of the clinical symptoms, to the high virulence of the novel pathogen and to the fast progression of the epidemic, the diagnosis of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) is actually a puzzling and intriguing diagnostic challenge. Despite the assiduous progress of the scientific knowledge on the nature of the pathogen has substantially slowed down the epidemic spread, the efficiency of the diagnostic protocols appears yet inadequate to ensure a fast and resolute solution to this novel and concerning infection.

RIASSUNTO

La recente comparsa di alcune patologie infettive emergenti ha focalizzato l'attenzione di igienisti, microbiologi e laboratoristi, allo scopo di attuare efficienti strategie preventive e diagnostiche che consentano di circoscrivere e possibilmente eradicare i nuovi focolai epidemici. A causa della relativa aspecificità del quadro clinico, della virulenza del nuovo patogeno e della rapida progressione del contagio, la diagnosi di Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), è oggi una delle sfide più intriganti e complesse. Malgrado il progresso delle conoscenze scientifiche sulla natura del patogeno abbia rallentato considerevolmente la progressione dell'epidemia, l'efficienza degli attuali protocolli diagnostici appare ancora inadeguata ad assicurare una rapida e drastica risoluzione di questa nuova ed allarmante infezione.

INTRODUZIONE

La Sindrome Respiratoria Acuta Severa (SARS), patologia infettiva acuta che interessa prevalentemente l'apparato respiratorio, è la prima grave malattia altamente contagiosa emersa dall'inizio del 21 secolo. Riconosciuta con certezza solo a partire dal febbraio del 2003, dopo la comparsa in forma di piccoli focolai epidemici in alcune aree del Sud Est Asiatico (Cina, Taiwan, Hong Kong, Singapore e Vietnam), l'epidemia s'è rapidamente estesa, assumendo gradualmente i connotati di una pandemia, fino a rappresentare oggi un serio problema per la salute pubblica dell'intero genere umano (1). Dall'identificazione dei primi casi, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ed il Centre for Disease Control (CDC), congiuntamente agli Enti nazionali responsabili della salute pubblica, hanno attivato politiche di prevenzione e contenimento del contagio, con connotati di rapidità e veemenza mai osservati in precedenza in situazioni simili. Il 12 marzo 2003, l'OMS ha sollevato il primo allarme mondiale sulla SARS; 12 giorni dopo, due gruppi di ricerca hanno identificato ed isolato indipendentemente l'agente infettivo, requisito essenziale per l'attuazione di efficienti politiche di contenimento ed eradicazione. Da quel momento, le strategie per la lotta alla SARS hanno subito un progresso

travolgente.

EPIDEMIOLOGIA

Malgrado non sia possibile definire con certezza il momento ed il luogo della comparsa della malattia, i primi casi di SARS sono stati ufficialmente riconosciuti nella provincia cinese di Guangdong, nel Novembre del 2002. I dati ufficiali fanno riferimento ad un'epidemia di polmonite atipica che avrebbe coinvolto 305 persone (circa 1/3 operatori sanitari), causando 5 decessi. Il 21 febbraio 2003, a seguito di un viaggio di lavoro, un medico cinese infetto diffonde l'epidemia in un albergo di Hong Kong e successivamente, grazie ai viaggi aerei degli ospiti, alle nazioni limitrofe (Singapore e Vietnam) e quindi al Canada (Toronto). Al 15 marzo del 2003, l'OMS aveva già ricevuto comunicazione di oltre 150 casi di pazienti affetti da una nuova patologia respiratoria infettiva, severa ed atipica, che fu appunto denominata Severe Acute Respiratory Syndrome. I riscontri epidemiologici apparvero subito inquietanti, poiché il numero di nuovi casi sospetti cresceva esponenzialmente, coinvolgendo aree geografiche anche molto lontane da quelle dei primi focolai epidemici. Stabilito il ruolo determinante dei viaggi aerei nella diffusione del patogeno, in breve l'OMS ha emanato raccomandazio-

ni e linee guida destinate agli Enti locali, nelle quali erano riportate strette misure preventive per limitare la diffusione del contagio. Secondo le più recenti statistiche dell'OMS disponibili all'atto della composizione di questo manoscritto, i casi probabili di SARS al 30 giugno 2003 sono oltre 8447, 811 mortali (2). Rispetto ai focolai iniziali, circoscritti ad aree del Sud Est asiatico (Cina, Hong Kong e Taiwan), sono stati identificati casi sospetti in tutti i Continenti. Al 30 giugno 2003, i casi probabili in Italia, diagnosticati secondo i criteri suggeriti dall'OMS, sono 5, tutti comparsi in persone che avevano contratto l'infezione a seguito di viaggi in zone epidemiche. Tutte le persone affette da SARS in Italia sono guarite e sono state dimesse dagli ospedali in cui erano state ricoverate.

EZIOLOGIA

L'agente eziologico della SARS è stato identificato, isolato e completamente sequenziato; si tratta di un agente virale appartenente alla famiglia dei coronavirus, denominato SARS-associated coronavirus (SARS-CoV) (3-5). Il ruolo centrale di SARS-CoV nella patogenesi della SARS è confermata dall'assolvimento dei sei requisiti essenziali, originariamente stabiliti da Koch, per accertare la natura virale dell'infezione: isolamento del virus dall'ospite malato, crescita in coltura del virus nelle cellule dell'ospite, trasmissione del virus da cellula a cellula, comparsa di malattia conclamata in ospiti (altri primati) in cui sia inoculato materiale infetto, re-isolamento del virus ed identificazione di una risposta immunitaria specifica (6). La natura dell'agente eziologico della SARS rappresenta per molti aspetti una novità inquietante. I coronavirus, scoperti all'inizio degli anni '60 e responsabili di gravi ed estese epidemie respiratorie e gastrointestinali nel pollame, causano solitamente patologie lievi o banali nell'uomo (raffreddore), con raro coinvolgimento delle vie aeree inferiori (7). I coronavirus, suddivisi in tre gruppi sierologici maggiori, sono retrovirus; l'RNA genomico e la fosfoproteina del nucleocapside virale formano un caratteristico nucleocapside elicoidale, rivestito da una serie di glicoproteine di membrana che generano escrescenze puntiformi o spike (S), facilmente riconoscibili in microscopia elettronica, suggestive e caratterizzanti la struttura del virus (figura 1). Gli spike si legano ai recettori delle cellule ospiti, promuovendo la fusione del rivestimento virale con la membrana cellulare. I coronavirus di gruppo 2 presentano una glicoproteina emoagglutinina-acetilesterasi (HE) aggiuntiva, in grado di legarsi a residui carboidratici della membrana cellulare. Il gene che codifica per la glicoproteina HE sembra originare da un ancestrale e singolare evento di ricombinazione tra coronavirus e virus dell'influenza. I coronavirus possiedono una RNA polimerasi singola, in grado di cambiare frequentemente stampo durante la replicazione, il che sembra promuove eventi di ricombinazione in cellule infettate da più di una particella virale. L'azione della RNA polimerasi è abbastanza imprecisa e giustifica l'elevata frequenza di mutazioni puntiformi, larghe delezioni o inserzioni di RNA ospite nel genoma

virale (7).

Il genoma di SARS-CoV differisce considerevolmente da quello di altri coronavirus noti; l'impossibilità di identificare o isolare il virus da campioni biologici d'origine umana prelevati prima dell'esplosione dell'epidemia di SARS suggerisce che il virus rappresenti un ceppo relativamente nuovo per il genere umano, un quarto sierotipo autonomo nell'ambito dei coronavirus umani (7, 8). SARS-CoV è caratterizzato da un RNA poliadenilato di 29727 nucleotidi, composto per il 41% da residui di guanina o citosina. L'organizzazione del genoma è quella caratteristica dei coronavirus: a partire dall'estremità 5' sono presenti in sequenza geni che codificano per la RNA polimerasi (Rep), le glicoproteine S, dell'involucro esterno (E), della membrana (M) e del nucleocapside (N). Ad entrambi gli estremi sono presenti piccole sequenze non tradotte; non si riconoscono strutture geniche che codificano per la glicoproteina HE o altre proteine di natura virale o cellulare (tabella 1). In alcuni casi, la sequenza dei geni è singolarmente sovrapposta, in altri è interamente contenuta in quella di altri geni (ORF 4, 13 e 14). Il gene Rep ha un'estensione che copre quasi 2/3 dell'intero genoma di SARS-CoV e codifica per due distinte poliproteine, denominate ORF1a e ORF1b, che subiscono un processo di proteolisi cotraslazionale. Analogamente alla struttura degli altri coronavirus noti, tra i geni maggiori sono presenti regioni che codificano per proteine non strutturali coinvolte nei processi di replicazione virale (8). Dopo aver infettato la cellula, SARS-CoV attiva un efficiente ciclo di replicazione che esordisce con la trascrizione in 5' di un lungo polipeptide, dal quale derivano, per successivo clivaggio catalizzato da proteasi virali, le principali proteine non strutturali (tra le quali la Rep), essenziali per la replicazione del genoma virale. Dopo la trascrizione, mentre il neo-replicato RNA virale è associato alla proteina N, le altre proteine virali sono destinate al reticolo endoplasmatico ed al Golgi. Sempre all'interno del reticolo endoplasmatico, il complesso proteina N-RNA è associato alla proteina M e trasferito nel Golgi. Dopo il completamento dell'as-

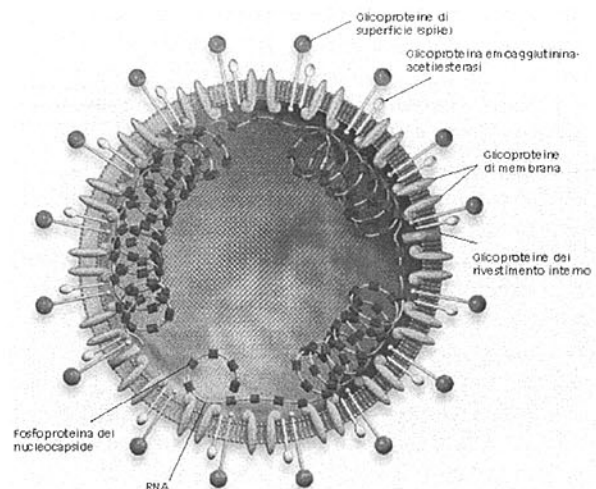


Figura 1
Struttura dei coronavirus

Tabella 1
Sequenza del coronavirus associato alla (SARS-Cov) (5)

Gene	Sequenza	Basi (n)	Aminoacidi (n)	Trascrizione
ORF 1a	265-13398	13149	4382	Dubbia
ORF 1b	13398-21485	7887	2628	Dubbia
Proteina S	21492-25259	3768	1255	Elevata
ORF 3	25268-26092	825	274	Elevata
ORF 4	25689-26153	465	154	Assente
Proteina E	26117-26347	231	76	Debole
Proteina M	26398-27063	666	221	Elevata
ORF 7	27074-27265	192	63	Debole
ORF 8	27273-27641	369	122	Elevata
ORF 9	27638-27772	135	44	Debole
ORF 10	27779-27898	120	39	Elevata
ORF 11	27864-28118	255	84	Debole
Proteina N	28120-29388	1269	422	Elevata
ORF 13	28130-28426	297	98	Assente
ORF 14	28583-28795	213	70	Assente
s2m	29590-29261	30	9	Dubbia

semblaggio, le particelle virali invadono il citoplasma della cellula ospite e sono secrete con prevalente meccanismo di esocitosi. Le caratteristiche di tropismo tessutale e virulenza dei coronavirus risiedono caratteristicamente in polimorfismi del gene che codifica per la proteina S. Analogamente ad altri coronavirus noti, la proteina S di SARS-CoV è caratterizzata da due domini idrofobici maggiori ed una coda citoplasmatica ricca in residui di cisteina altamente conservati. Il primo dominio è localizzato all'estremità aminoterminali della molecola e contiene una piccola sequenza segnale, il secondo comprende l'estremità carbossiterminale e rappresenta la regione transmembrana. L'associazione di tre monomeri di proteina S genera un aggregato che fuoriesce estesamente dall'involucro esterno, a formare le peculiari escrescenze caratterizzanti questa famiglia di virus. L'aminopeptidasi, anche nota come CD13, è stata recentemente identificata quale putativo sito di legame della proteina S; l'interazione tra le due proteine potrebbe pertanto rappresentare un evento chiave nel processo d'infezione cellulare (9). La sequenza del gene che codifica per la proteina del nucleocapside è abbastanza conservata, nonostante la presenza di una piccola regione, unica e distintiva, particolarmente ricca in residui lisinici (KTFPPTEPKDKKKKTDEAQ). Quest'area, simile a quella d'altre proteine virali, appare in grado di modulare importanti funzioni nucleari, occupando un ruolo determinante nei processi d'infezione e replicazione virale. Rimane tuttora da stabilire se il virus espliciti l'azione patogena autonomamente, o se piuttosto agisca in combinazione con altri patogeni quali metapneumovirus (appartenente alla famiglia dei Paramyxovirus) o Clamidia.

ORIGINE DEL VIRUS

A corollario delle considerazioni eziologiche, rimane tuttora irrisolto l'importante quesito relativo alla possibile

origine biologica del virus. L'esigenza di dare una risposta convincente a quest'affascinante interrogativo, trova valido fondamento nella necessità di comprendere a fondo i complessi meccanismi biologici che promuovono la comparsa di nuove ed insolite malattie infettive nell'uomo, requisito essenziale per l'attuazione di politiche di prevenzione e contenimento, presenti e future, che si rivelino realmente rapide ed efficaci. Le ipotesi sull'origine biologica di SARS-CoV sono molteplici e spaziano dalla possibilità che il virus sia una forma ricombinante di un coronavirus umano o animale che ha acquisito nuovi fattori di virulenza, una zoonosi causata da un virus animale successivamente propagata all'uomo, fino ad abbracciare ipotesi al confine della "science fiction" cinematografica, con richiami a bioterrorismo o ipotetici agenti infettivi, generati in ambienti militari ed incautamente sfuggiti al controllo degli scienziati (7, 10-11). Considerando la rapidità con la quale s'è giunti all'identificazione dell'agente patogeno ed al completo sequenziamento del genoma virale, è ipotizzabile che in breve tempo sia possibile avere informazioni complete e definitive sulla natura e quindi anche sull'origine del virus. La sostanziale originalità del genoma rispetto a quello di altri coronavirus umani noti depone maggiormente per una possibile origine animale (7). Se quest'ipotesi fosse confermata, diviene essenziale l'identificazione dell'ospite non umano, sia per comprendere i meccanismi che ne potrebbero aver promosso la diffusione all'uomo, sia per eradicare l'infezione nell'animale, bacino di contagio potenzialmente illimitato. La ricerca di genoma virale o anticorpi anti-SARS-CoV in numerose specie animali, soprattutto domestiche, ha dato finora esito negativo. Ciò può essere conseguenza del fatto che non è ancora stato analizzato l'animale giusto o che, durante il trasferimento al genere umano, il virus può aver subito eventi di mutazione o ricombinazione che ne possono aver considerevolmente modificato sequenza,

struttura e caratteristiche antigeniche (7).

Un aspetto tutt'altro che secondario, emerso dall'analisi della pandemia di SARS, è l'origine geografica; analogamente ad altre importanti pandemie antecedenti sostenute da virus respiratori, i primi focolai epidemici sono comparsi in aree ben definite del Sud Est asiatico. Il riferimento alle drammatiche epidemie influenzali del 1957 (la famosa "asiatica", oltre 5 milioni di morti) e 1968 (2 milioni di morti) è ovvio ed inevitabile (12). Alla luce di queste indiscutibili osservazioni epidemiologiche, è evidente che i virus respiratori, virus influenzali e coronavirus in particolare, sembrano trovare in determinate aree geografiche terreno particolarmente fertile per mutare frequentemente il potenziale patogeno. Considerando l'ipotesi della probabile origine animale del virus della SARS, l'area del Sud Est asiatico racchiude numerosi fattori che potrebbero promuovere l'estensione di zoonosi all'uomo: promiscuità, sovraffollamento, carenze igieniche ed alimentari, contatto domestico con ospiti abituali di coronavirus (polli, tacchini, maiali), orografia, condizioni climatiche.

QUADRO ANATOMO-PATOLOGICO

La recente identificazione della patologia, congiuntamente all'eterogeneità della progressione ed al numero limitato di casi mortali e relativi riscontri autoptici, non consentono di dedurre un quadro anatomico-patologico univoco e specifico. Nella maggior parte dei casi esaminati *postmortem*, s'evidenzia un consistente consolidamento del parenchima polmonare. La fase iniziale della SARS sembra caratterizzata da estesa organizzazione e danneggiamento multifocale del parenchima alveolare; frequente è il riscontro d'edema polmonare, associato a formazione di membrane ialine, a comporre un aspetto microscopico sommariamente confrontabile con quello osservabile in pazienti con Sindrome da Distress Respiratorio dell'Adulto (ARDS). La progressione della malattia si caratterizza per la comparsa d'essudati cellulari a prevalente organizzazione fibromixoida degli spazi respiratori, con segni di modesta infiltrazione infiammatoria interstiziale, a prevalente natura linfocellulare. In questa fase si riconoscono frequentemente grossolane alterazioni degli pneumociti, comparsa d'estese vacuolizzazioni citoplasmatiche e multinucleazioni. Dall'esordio al termine della patologia non c'è evidenza d'inclusioni virali né del sostanziale coinvolgimento di organi o tessuti extra-polmonari (13).

CRITERI CLINICI

Il contagio si attua prevalentemente per via aerea, giustificando la velocità di propagazione dell'infezione; l'isolamento del virus da sangue e feci depone per una potenziale trasmissione dell'infezione anche per via ematica ed oro-fecale. Non esistono prove che il virus possa essere trasmesso da alimenti o da animali. A causa dello stretto contatto con i pazienti, la categoria degli operatori

sanitari è particolarmente esposta al contagio; ad oggi, quasi il 50% dei casi ha coinvolto personale medico o infermieristico. Malgrado il contagio si realizzi mediante contatto diretto con materiale infetto, s'osserva una spiccata eterogeneità nella trasmissione del patogeno, il che fa supporre la presenza di forme di predisposizione o resistenza in grado di modulare la virulenza. Anche se il grado d'immunocompetenza dell'ospite influenza probabilmente la trasmissione e la progressione della malattia, come testimoniato dalla maggiore severità dell'infezione in neonati e pazienti immunodepressi, sono state osservate gravi forme di SARS anche in individui giovani ed apparentemente in ottima salute (14).

Gran parte dei problemi legati alla difficoltà di circoscrivere ed eradicare l'epidemia di SARS risiede nell'aspecificità e nella genericità del quadro clinico, sinteticamente riassumibile in termini di "polmonite atipica" e sommariamente sovrapponibile a quello di polmoniti da micoplasma, clamidia, legionella e haemophilus influenzae (13). Il ritardo che ha caratterizzato la diagnosi dei primi casi, l'identificazione del nuovo agente patogeno ed il suo isolamento, ha favorito l'iniziale diffusione dell'infezione ad aree lontane da quelle dei primi focolai epidemici. Il periodo d'incubazione della malattia è variabile; l'esordio clinico, in media compreso tra 3 e 5 giorni (range 2-7 giorni) dal contagio iniziale, in rari casi può estendersi fino a 10 giorni. I sintomi osservati nella fase d'esordio sono incostanti ed aspecifici, sovrapponibili sommariamente a quelli di un quadro simil-influenzale. La febbre, presente dal 70 al 90% dei pazienti, in 1/3 dei casi compare da sola, nel 30% dei casi s'associa a prodromi, nel 30% dei casi è accompagnata da prodromi, tosse e dispnea (15). La febbre è caratteristicamente elevata (>38° C*). All'esordio della malattia i sintomi respiratori sono assenti o sfumati, così come mancano rash cutanei, sintomi neurologici e gastrintestinali. Altri sintomi variabilmente osservati nella fase iniziale della SARS sono: brividi (54%), mialgia (80-50%), mal di gola (35%), malessere generale (60-34%), cefalea (50-26%), rinorrea (26%), diarrea (7%), astenia (6%). Dopo 3-7 giorni dall'esordio, compaiono i primi sintomi riferibili all'interessamento delle vie respiratorie inferiori: dispnea ingravescente, tosse secca, ipossiemia di grado moderato o severo; nel 10-20% la compromissione del quadro respiratorio richiede intubazione e ventilazione assistita (14-17). I criteri clinici stabiliti dal CDC per la diagnosi di SARS sono (15):

Patologia Respiratoria Moderata:

- Febbre >38° C*, e
- Presenza di uno o più sintomi di patologia respiratoria (in particolare tosse, dispnea, ipossia)

Patologia Respiratoria Severa:

- Febbre >38° C*, e
- Presenza di uno o più sintomi di patologia respiratoria (in particolare tosse, dispnea, ipossia) e
- Evidenze radiografiche di polmonite, o
- Sindrome da distress respiratorio, o
- Reperto autoptico di polmonite o sindrome da distress respiratorio senza una precisa causa identificabile

La severità del quadro clinico è molto variabile e diffi-

cilmente prevedibile; in alcuni pazienti il decorso della malattia è quasi completamente asintomatico, in altri possono comparire solamente prodromi e febbre, senza progressione verso la fase respiratoria. In questo caso, il quadro può essere caratterizzato da sintomi lievi o moderati; in una minoranza di pazienti la patologia evolve fino alla comparsa di grave compromissione respiratoria. L'esito spazia dalla completa guarigione al decesso e dipende sostanzialmente dal grado di compromissione delle vie aeree inferiori. Non esistono finora dati definitivi sul tasso di mortalità, significativamente variabile in rapporto alla popolazione in esame. Secondo i casi esaminati dall'OMS, il tasso di mortalità medio in soggetti sani è prossimo all'8%, ma riflette una spiccata eterogeneità legata all'area geografica (dal 5.5% della Cina al 16.4% del Canada) ed alla categoria di soggetti in esame (sale fino al 15 in neonati ed immunodepressi) (18). A causa del breve tempo trascorso dalla comparsa dei primi casi, non sono disponibili informazioni certe su tipo e grado d'immunità conferiti dal superamento dell'infezione da SARS o da altri patogeni appartenenti alla famiglia dei coronavirus (19).

Analogamente a quello clinico, anche il quadro radiologico è eterogeneo. All'esordio della sintomatologia febbrile, il radiogramma standard del torace è solitamente negativo e comunque privo di riscontri suggestivi. A seguito dell'interessamento delle vie respiratorie inferiori s'osservano opacità a vetro smerigliato mono e bilaterali, compaiono infiltrati interstiziali precoci e focali, che tendono progressivamente ad estendersi in associazione al peggioramento del quadro clinico. Nelle fasi più avanzate della malattia, in alcuni pazienti s'osservano aree nette di consolidamento (20). Il numero e l'estensione delle opacità polmonari è strettamente correlato al grado di compromissione della funzione respiratoria (13, 20). In tutte le situazioni in cui il radiogramma standard del torace non manifestava caratteri sufficientemente specifici, la tomografia assiale computerizzata (TAC) s'è rivelata un essenziale ausilio diagnostico, evidenziando estesi segni di organizzazione e consolidamento a vetro smerigliato degli spazi respiratori, caratteristicamente bilaterali e multifocali, molto simili al quadro di organizzazione del parenchima polmonare osservabile in pazienti con bronchiolite obliterante (13).

CRITERI EPIDEMIOLOGICI

Malgrado i criteri clinici, strumentali e diagnostici per la diagnosi di SARS assumano contorni sempre più certi e definiti, i criteri epidemiologici sono in costante evoluzione, a causa della progressiva espansione dei focolai epidemici. L'incertezza diagnostica che tuttora caratterizza la SARS e la conseguente difficoltà di circoscrivere i primitivi focolai d'infezione, hanno favorito la propagazione della patologia al di fuori del Sud Est asiatico, area da cui ha verosimilmente tratto origine, coinvolgendo dapprima Nord America ed Europa. E' ipotizzabile che se le attuali incertezze sui protocolli diagnostici e terapeutici persistessero, non sarà possibile circoscrivere a lungo i casi alle

aree interessate, promuovendo un'ulteriore diffusione della patologia. Ad oggi, i criteri epidemiologici stabiliti dal CDC sono i seguenti:

- Viaggio (incluso transito aeroportuale) nei 10 giorni dalla comparsa dei sintomi in aree geografiche nelle quali sia comprovabile un focolaio epidemico recente o passato di SARS (Cina, da 1 Novembre 2002 ad oggi; Hong Kong, da 1 Febbraio ad oggi; Hanoi, Vietnam, da 1 Febbraio 2003 a 25 Maggio 2003; Singapore, da 1 Febbraio 2003 a 14 Giugno 2003; Toronto, Canada, da 23 Aprile 2003 ad oggi; Taiwan, da 1 Maggio 2003 ad oggi)
- Contatto nei 10 giorni precedenti la comparsa dei sintomi con casi sospetti o accertati di SARS. Sono considerati fonte di potenziale contagio la convivenza o i rapporti diretti con sospetti casi di SARS ed il contatto con secrezioni respiratorie o fluidi organici di sospetti casi di SARS. Tale criterio non è applicabile a soggetti che abbiano mantenuto più di tre piedi di distanza da casi sospetti di SARS.

Sulla base dei suddetti criteri clinici ed epidemiologici è quindi possibile classificare i pazienti in termini di:

Caso probabile: incontra i criteri clinici di patologia respiratoria severa ad eziologia ignota ed i criteri epidemiologici per il potenziale contagio;

Caso sospetto: incontra i criteri clinici di patologia respiratoria modesta ad eziologia ignota ed i criteri epidemiologici per il potenziale contagio

Criteri d'esclusione: pazienti in cui una diagnosi alternativa giustifichi appieno i sintomi o nei quali il sospetto era stato formulato a seguito di contatto con altri casi sospetti, per i quali è stato successivamente possibile escludere la diagnosi di SARS.

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Analogamente ad altre infezioni virali, esiste un intervallo temporale di lunghezza variabile tra contagio e diagnosi, suddivisibile sinteticamente in tre fasi: (a) latenza d'incubazione del patogeno, (b) periodo compreso tra comparsa dei primi sintomi (aspecifici e di complesso inquadramento) e formulazione del sospetto diagnostico e (c) esecuzione ed interpretazione dei test diagnostici (figura 2). Nell'intervallo temporale tra contagio e diagnosi, il paziente è temporaneamente considerato "caso sospetto". A causa dell'elevata virulenza del patogeno, il concetto di sospetto in ambito SARS deve essere rigorosamente limitato nel tempo e, per quanto concerne l'attività specifica del laboratorio, esige l'applicazione di protocolli diagnostici rapidi ed efficienti. Il ruolo del laboratorio nell'infezione da SARS è triplice; esso spazia dall'attuazione d'analisi tradizionali di biochimica clinica e microbiologia alla comparsa dei sintomi, al fine di limitare le ipotesi nell'ambito della diagnostica differenziale, coinvolge successivamente l'identificazione e l'isolamento del patogeno per la diagnosi di certezza e si conclude con l'esecuzione di test per il monitoraggio dell'evoluzione della patologia e della relativa terapia.

	Contagio	Esordio clinico	Malattia conclamata	Esito
Sede		Vie aeree superiori	Vie aeree inferiori	
Quadro clinico	Assente	Lieve Aspecifico	Moderato Severo	Guarigione Decesso Portatore?
Quadro radiologico	Negativo	Negativo	Polmonite interstiziale	Guarigione Consolidamento
Test di laboratorio	Negativi	Linfopenia	Citolisi	Normalizzazione Peggioramento
Identificazione diretta	Non applicabile	RT-PCR	RT-PCR ELISA IFA	RT-PCR ELISA IFA
Cronologia	-	2-7 giorni	7-21 giorni	> 21 giorni

Figura 2

Sintesi della progressione della malattia in pazienti affetti da SARS

Alterazioni dei parametri di laboratorio in corso di SARS

Analogamente al quadro clinico, lo spettro delle possibili alterazioni laboratoristiche in corso di SARS è eterogeneo ed aspecifico (15). All'esordio, la patologia s'associa fino all'80% dei casi a leucopenia e linfopenia relativa ed assoluta (<1500/ μ L); non raro è il riscontro di piastrinopenia moderata e transitoria (50000-150000/ μ L). Da un'analisi retrospettiva dei casi di SARS accertati fino ad ora a Hong Kong, i parametri ematochimici di riscontro più comune sono: linfopenia (98% dei casi), neutrofilia (82%, comunemente associata ad infezioni batteriche o sepsi), trombocitopenia (55%) o trombocitosi (49%), allungamento isolato e transitorio dell'APTT (63%), non imputabile alla presenza d'eventi tromboembolici maggiori o anticorpi anti-fosfolipidi (21). L'analisi dello striscio periferico evidenziava in alcuni casi la presenza di neutrofilii ipersegmentati, policromasia ed anomalie eritrocitarie aspecifiche (15). Nel 61% dei casi l'evoluzione della malattia s'associa a progressiva anemizzazione (perdita superiore a 2 g/dL d'emoglobina rispetto ai valori d'esordio); nel 2.5%, il quadro clinico è aggravato dalla comparsa di coagulazione intravascolare disseminata (DIC) (21). Esclusa la natura autoimmune, l'anemia emolitica (caratterizzata da iperbilirubinemia indiretta e diminuzione dell'aptoglobina), di verosimile natura tossica (ribavirina), sembra rappresentare la causa principale di anemizzazione dal 50 al 75% dei pazienti (16). Alla comparsa dei primi sintomi respiratori, s'osserva generalmente un aumento d'alcuni enzimi di citolisi, primariamente lattico deidrogenasi (LDH) (fino al 90% dei casi), creatina kinasi totale (CK) (fino a valori superiori a 3000 UI/L), aspartato aminotransferasi (AST) ed alanina aminotransferasi (ALT) (da due a sei volte la norma). Di frequente riscontro è un'ipocalcemia transitoria, che compare in oltre il 60% dei casi entro 5 giorni dalla comparsa dei primi sintomi (15). Il peggioramento del quadro clinico si riflette costantemente in quello del profilo biochimico ed ematologico; il riscontro di linfopenia s'e-

stende alla quasi totalità dei pazienti, gli indici di citolisi aumentano ulteriormente, compaiono ipocalcemia ed ipomagnesemia (13, 16). Dall'analisi multivariata dei dati, età avanzata ed elevata attività di LDH nel plasma appaiono i parametri maggiormente predittivi di esito sfavorevole (21).

Nell'ambito delle alterazioni ematochimiche osservate nei pazienti con SARS, la linfopenia, con valori sovente <500/ μ L e sostenuta in prevalenza dalla perdita di cellule T CD4 e CD8 positive, appare la più indicativa. Caratterizzante la pressoché totalità dei pazienti attraverso le differenti fasi della malattia, la conta linfocitaria decade precocemente (entro cinque giorni dall'esordio del quadro clinico), diminuisce ulteriormente fino a raggiungere il minimo in corrispondenza della seconda settimana, per poi risalire in terza settimana, riportandosi a valori prossimi alla norma al termine della quinta settimana. In una minoranza di pazienti (30%), essa persiste oltre la quinta settimana, associandosi a prognosi meno favorevole e rappresentando pertanto un valido marcatore d'attività della patologia (21). Nei pazienti studiati fino ad oggi, non si osservano sostanziali alterazioni del rapporto tra cellule CD4/CD8. Non è stato ancora possibile identificare una chiara causa della linfopenia; escludendo insufficienza midollare e sindrome emofagocitica, le ipotesi più accreditate sono l'azione citotossica del virus, diretta o citochino-mediata, o alterazioni dell'asse ipotalamo ipofisario (21).

Identificazione diretta ed isolamento del patogeno

L'identificazione del SARS-CoV quale agente eziologico (3, 4) ha promosso il rapido sviluppo di test virologici e sierologici diagnostici, consentendo l'integrazione di precisi riscontri laboratoristici ai già noti criteri clinici e la successiva formulazione ed approvazione da parte del CDC, massima Autorità in tema di prevenzione e trattamento delle epidemie infettive, di un algoritmo (figura 3) che dovrebbe facilitare l'inquadramento diagnostico dei casi sospetti.

La **diagnosi sierologica** si basa principalmente su tecniche d'immunofluorescenza indiretta (IFA) e tecniche immunoenzimatiche (ELISA), entrambe finalizzate ad identificare la presenza in circolo di anticorpi (IgG o IgM) anti-SARS-CoV, sfruttando determinanti antigenici ricombinanti o materiale virale isolato. Poiché il classico periodo finestra che intercorre tra contagio e sieroconversione è ampio ed eterogeneo e molti pazienti permangono sieronegativi anche nella fase acuta di malattia, la diagnosi sierologica certa non può essere formulata prima che siano trascorsi 21 giorni dalla comparsa dei primi sintomi. Pertanto, malgrado la sieroconversione rappresenti un valido ausilio all'iter diagnostico, l'assenza in circolo di anticorpi anti-SARS-CoV non consente di escludere l'infezione fino ad almeno tre settimane dalla comparsa dei sintomi (22). Problematiche aggiuntive sono rappresentate dalla carente standardizzazione delle varie tecniche immunometriche proposte e dalla necessità di confermare

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)			
Sintomi respiratori		Conclusioni diagnostiche	
Lievi* Asintomatico			
Lievi			Caso Sospetto
Severi			Caso Probabile
Diagnosi di laboratorio	Confermata	Indeterminata	Negativa
			* Sospetto epidemiologico

Figura 3
Sintesi dei criteri stabiliti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) per la diagnosi di Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) (22)

(per la diagnosi certa) la presenza di anticorpi anti-SARS-CoV mediante Westernblot.

L'**identificazione diretta** del virus o del suo genoma nei campioni biologici dei pazienti potenzialmente infetti rappresenta un sostanziale progresso rispetto alla diagnosi sierologica. Ad oggi, SARS-CoV è stato identificato in siero, plasma, secrezioni nasali e feci, ricorrendo a tecniche di isolamento e coltura virale, microscopia elettronica, e biologia molecolare mediante Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (22, 23). A causa della virulenza e della rapida propagazione del contagio, le tecniche d'isolamento e coltura virale, caratteristicamente lente, costose ed indagine, non rappresentano un valido ausilio diagnostico in quest'iniziale fase dell'epidemia. Disponibili dal marzo del 2003, le tecniche di biologia molecolare, la PCR *in primis*, appaiono oggi il sussidio diagnostico elettivo per lo screening dei potenziali casi infetti. L'iniziale incertezza sulla natura del patogeno non ha agevolato la messa a punto dei primi test; escluso il ruolo di paramixovirus atipici, alla fine del marzo del 2003 sono stati ottenuti i primi amplificati con sequenza analoga a quelle della famiglia dei coronavirus da campioni biologici di pazienti infetti. Dopo pochi giorni dall'identificazione del patogeno, un ricercatore dell'Istituto di Medicina Tropicale di Amburgo ha prodotto una prima coppia di primer specifici, sviluppando di fatto la prima PCR diagnostica per la SARS (23). Nonostante presuppongano l'impiego di materiale sofisticato e personale esperto, le varie PCR successivamente approntate per l'amplificazione di regioni specifiche del genoma di SARS-CoV si sono dimostrate finora sufficientemente sensibili e specifiche, realisticamente applicabili a laboratori diagnostici di media specializzazione e competenza. Malgrado i test PCR specifici appaiano positivi nella maggior parte dei pazienti nella fase acuta della SARS, le insufficienti nozioni oggi disponibili sul ciclo vitale del patogeno nell'uomo (comparsa, picco e durata della viremia, virus shedding, ecc.), non consentono in presenza di un risultato di PCR negativo di

escludere l'infezione con certezza (22). L'algoritmo approvato dal CDC è d'ausilio nella gestione dei casi incerti o sospetti, ma non contribuisce a chiarire definitivamente tutte le incertezze diagnostiche (figura 3). Sulla base dei risultati dei test di laboratorio, è comunque possibile classificare i pazienti con sospetto clinico di SARS in tre categorie:

1. Conferma diagnostica di infezione: appartengono a questa categoria pazienti nei quali:

- sia stato possibile identificare anticorpi anti-SARS-CoV in campioni biologici ottenuti durante la fase acuta di malattia o dopo 21 giorni dalla comparsa dei sintomi
- ad una preliminare identificazione di SARS-CoV RNA mediante RT-PCR, sia seguita una conferma ricorrendo ad una seconda PCR specifica, eseguita utilizzando una differente aliquota di campione biologico ed un diverso set di sonde (primer)

- sia stato possibile isolare direttamente il virus (SARS-CoV);

2. Conferma diagnostica di non infezione: appartengono a questa categoria pazienti nei quali non sia stato possibile identificare anticorpi anti-SARS-CoV in campioni biologici ottenuti ad oltre 21 giorni dalla comparsa dei primi sintomi;

3. Risultati indeterminati: appartengono a questa categoria pazienti nei quali non sia stato possibile eseguire test diagnostici di laboratorio o i risultati dei medesimi siano incompleti o contraddittori (22).

Di ulteriore complesso inquadramento appaiono i soggetti nei quali sia documentabile la presenza di genoma virale in assenza di un quadro clinico chiaro o suggestivo, e pazienti in cui persista l'eliminazione del virus anche dopo la risoluzione completa della sintomatologia.

Attualmente è disponibile un kit commerciale di PCR per l'identificazione del genoma di SARS-CoV; primer e procedure sono standardizzate e pubblicate e possono essere utilizzate abbastanza agevolmente dai laboratori (24). Il materiale di controllo è disponibile in alcuni Centri di ricerca, tra i quali l'Istituto Bernhard-Nocht ad Amburgo. La sensibilità del metodo commerciale dipende in larga misura dalla qualità e dal tempo di raccolta del campione, e può essere considerevolmente innalzata analizzando un maggior numero di campioni, possibilmente di diversa natura. La specificità del test è eccellente; potenziali falsi positivi possono emergere solo per contaminazione o problemi di natura tecnica. I laboratori che vogliano cimentarsi in analisi molecolari per la ricerca del genoma virale mediante PCR sono obbligati ad adottare stretti criteri per la conferma dei risultati positivi, soprattutto in aree a bassa prevalenza, ove il valore predittivo positivo del test è particolarmente basso.

PROSPETTIVE E CONCLUSIONI

A causa dell'aumento del numero di casi di SARS in tutto il mondo, la pianificazione e l'applicazione di strategie in grado di promuovere l'arresto dell'epidemia e la completa eradicazione del virus divengono oggi di primaria

importanza per tutti gli Enti locali, nazionali ed internazionali preposti al controllo della salute pubblica. La relativa impotenza dinanzi all'esponenziale incremento dei casi che ha caratterizzato soprattutto la fase iniziale del contagio, pone epidemiologi ed igienisti dinanzi ad imbarazzanti quesiti, primo fra tutti quello relativo a velocità ed estensione dell'epidemia. La comparsa dell'epidemia è ancora troppo recente perché sia possibile predirne diffusione e gravità. I modelli matematici dimostrano che la progressione del contagio è lungi dall'essere rallentata o arrestata; secondo il parere d'alcuni epidemiologi, s'osserva purtroppo una tendenza prevalente verso l'aumento, piuttosto che verso il contenimento dei casi sospetti (1). Ulteriore fonte di pessimismo è la natura del patogeno; ipotizzando che l'epidemia di questo nuovo coronavirus segua il tipico andamento ciclico dei tre gruppi già noti, si potrebbe assistere a veri e propri cicli stagionali, con diminuzione del numero dei casi nelle stagioni più calde, alternati a successive riprese epidemiche nei mesi invernali (25).

Alla luce di queste oscure previsioni, malgrado gli imponenti spiegamenti di forze messi in atto dal suo esordio, è improbabile che l'epidemia di SARS possa essere arrestata ed eradicata dal pianeta in tempo breve (1). Precedenti esperienze con agenti infettanti con virulenza simile a SARS-CoV (ad esempio il virus della poliomielite) suggeriscono che la completa eradicazione può essere ottenuta solo soddisfacendo tre essenziali requisiti: la disponibilità di strumenti terapeutici idonei, in grado di circoscrivere il contagio (idealmente, la disponibilità di un vaccino efficace), l'applicazione di protocolli diagnostici rapidi ed efficienti (dotati soprattutto d'elevata sensibilità analitica e diagnostica) e la completa eradicazione del virus dall'eventuale ospite non umano, qualora sia dimostrabile la presenza d'infezione o malattia in altre specie animali.

La diagnosi iniziale di SARS, tuttora basata prevalentemente su criteri clinici, riflette la concreta possibilità d'incorrere in errori diagnostici, esponendo pazienti sani al rischio di ricevere pesanti ed inopportuni presidi terapeutici (falsi positivi) o misconoscendo casi che potrebbero favorire l'ulteriore diffusione o l'amplificazione dei focolai epidemici (falsi negativi) (26). Le recenti linee guida emanate dall'OMS e dal CDC hanno in parte favorito la razionalizzazione dei vari protocolli diagnostici, integrando il quadro clinico con imaging e test di laboratorio. Nondimeno, l'efficienza diagnostica degli algoritmi proposti appare ancora limitata, soprattutto in relazione alla suddivisione dei casi tra "probabili" o "sospetti" (figura 3). Malgrado molte caratteristiche dell'agente eziologico siano note, il che ha reso disponibili strumenti diagnostici rapidi ed efficaci, la subdola evoluzione del contagio e l'aspecificità del quadro clinico complicano il riconoscimento ed il conseguente isolamento dei casi sospetti. La criticità maggiore interessa ancora una volta la fase d'esordio della malattia, nella quale la sensibilità diagnostica dei test biochimici oggi disponibili (sia quelli generici, sia quelli rivolti specificatamente all'identificazione del patogeno) appare limitata. Le alterazioni del profilo ematochimico sono vaghe, aspecifiche ed incostanti; il progressivo peggiora-

mento caratterizza solo le fasi più avanzate di malattia, quando la diagnosi è palese e la compromissione del quadro respiratorio è ormai avanzata (16). I test di biologia molecolare consentono d'identificare con certezza la presenza di genoma virale nei campioni dei pazienti infetti, anche durante la prima fase del contagio; sfortunatamente si tratta di tecniche indaginose e costose, non adatte ad uno screening di massa. Le tecniche immunometriche, al contrario, sono più adatte allo screening di popolazione, ma sono caratterizzate da sensibilità diagnostica complessivamente inferiore e sono quindi probabilmente insufficienti a circoscrivere rapidamente il problema (24). Inoltre, i vari test messi a punto nei singoli laboratori di ricerca hanno limitato valore diagnostico, mancando d'approfondite ma indispensabili valutazioni d'efficienza. In fine, devono ancora essere formulate linee guida definitive relative alla tipologia, cronologia, raccolta e conservazione dei campioni biologici da prelevare ai casi sospetti.

Per ridurre l'incertezza nella classificazione dei potenziali casi di SARS, alcuni autori hanno suggerito una profonda revisione dei criteri classificativi, a partire dalla denominazione stessa della patologia (da SARS a Polmonite Virale Epidemica o EVP) (26). Integrando più tangibilmente i criteri clinico-epidemiologici al risultato dei test diretti di laboratorio, sarebbe possibile identificare quattro classi d'appartenenza che riflettono una probabilità di malattia progressivamente crescente, offrendo una classificazione pragmaticamente più accessibile e gestibile nel trattamento dei pazienti (tabella 2).

Tabella 2

Nuovo criterio proposto per la classificazione dei casi sospetti o probabili di SARS (modificato da Hon et al.) (26). EVP: Polmonite Virale Epidemica

Storia di contagio	Identificazione del virus	Probabilità
Negativa	Negativa	EVP +
Negativa	Positiva	EVP ++
Positiva	Negativa	EVP +++
Positiva	Positiva	EVP ++++

BIBLIOGRAFIA

1. Vogel G. SARS outbreak. Modelers struggle to grasp epidemic's potential scope. *Science* 2003;300:558-9.
2. World Health Organization. Cumulative Number of Reported Probable Cases of SARS. http://www.who.int/csr/sars/country/2003_06_30/en/
3. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, et al. SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-66
4. Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348:1967-76.
5. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003;

- 300:1394-9.
6. Fouchier RA, Kuiken T, Schutten M, van Amerongen G, van Doornum GJ et al. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 2003;423:240.
 7. Holmes KV. SARS-associated coronavirus. *N Engl J Med* 2003;348:1948-51.
 8. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A et al. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*. 2003;300:1399-404.
 9. Yu XJ, Luo C, Lin JC, Hao P, He YY et al. Putative hAPN receptor binding sites in SARS-CoV spike protein. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:481-8.
 10. There are two sides to biodefence. *Nature* 2003;422:545.
 11. Shaila MS. Severe acute respiratory syndrome (SARS): an old virus jumping into a new host or a new creation? *J Biosci* 2003;28:359-60.
 12. Oxford JS, Bossuyt S, Lambkin R. A new infectious disease challenge: Urbani severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus. *Immunology* 2003;109:326-8.
 13. Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003;348:1986-94.
 14. Avendano M, Derkach P, Swan S. Clinical course and management of SARS in health care workers in Toronto: a case series. *CMAJ* 2003;168:1649-60.
 15. Nie QH, Luo XD, Hui WL. Advances in clinical diagnosis and treatment of severe acute respiratory syndrome. *World J Gastroenterol* 2003;9:1139-43.
 16. Booth CM, Matukas LM, Tomlinson GA, Rachlis AR, Rose DB et al. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA* 2003;289:2801-9.
 17. Rainer TH, Cameron PA, Smit D, Ong KL, Hung AN et al. Evaluation of WHO criteria for identifying patients with severe acute respiratory syndrome out of hospital: prospective observational study. *BMJ* 2003;326:1354-8.
 18. Chotani RA, LaPorte RE, Linkov F, Dodani S, Ahmed D, Ibrahim KM. Just-in-time lectures: SARS. *Lancet* 2003;361:1996.
 19. Baker SJ. SARS: screening, disease associations, and response. *Lancet* 2003;361:1905.
 20. Muller NL, Ooi GC, Khong PL, Nicolaou S. Severe Acute Respiratory Syndrome: Radiographic and CT Findings. *AJR Am J Roentgenol* 2003;181:3-8.
 21. Wong RS, Wu A, To KF, Lee N, Lam CW et al. Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome: retrospective analysis. *BMJ* 2003; 326: 1358-62.
 22. Hoey J. Updated SARS case definition using laboratory criteria. *CMAJ* 2003;168:1566-7.
 23. Abbott A. SARS testing: First past the post. *Nature* 2003;423:114.
 24. Poon LL, Wong OK, Luk W, Yuen KY, Peiris JS et al. Rapid Diagnosis of a Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). *Clin Chem* 2003;49:953-5.
 25. Lange JH, LaPorte RE. Severe acute respiratory syndrome: capture-recapture method should be used to count how many cases of SARS really exist. *BMJ* 2003;326:1396.
 26. Hon KL, Li AM, Cheng FW, Leung TF, Ng PC. Personal view of SARS: confusing definition, confusing diagnoses. *Lancet* 2003;361:1984-5.