Zbulimi i papritur i antitrupave SARS-CoV-2 në periudhën parapandemike në Itali

**Abstrakt**

Nuk ka të dhëna të forta mbi fillimin real të infeksionit të rëndë të sindromës akute të frymëmarrjes koronavirus 2 (SARS-CoV-2) dhe përhapjes në periudhën parapandemike në të gjithë botën. Ne kemi hetuar praninë e domenit lidhës të receptorëve SARS-CoV-2 (RBD) - antitrupa specifikë në mostrat e gjakut të 959 individëve asimptomatikë të regjistruar në një provë të mundshme të shqyrtimit të kancerit të mushkërive midis shtatorit 2019 dhe marsit 2020 për të gjetur datën e fillimit, frekuencën, dhe variacionet kohore dhe gjeografike në të gjithë rajonet italiane. Antitrupat specifikë SARS-CoV-2 RBD u zbuluan në 111 nga 959 individë (11.6%), duke filluar nga shtatori 2019 (14%), me një grup rastesh pozitive (> 30%) në javën e dytë të shkurtit 2020 dhe numri më i lartë (53.2%) në Lombardi. Ky studim tregon një qarkullim të papritur shumë të hershëm të SARS-CoV-2 midis individëve asimptomatikë në Itali disa muaj para identifikimit të pacientit zero dhe sqaron fillimin dhe përhapjen e pandemisë së sëmundjes koronavirus 2019 (COVID-19). Gjetja e antitrupave SARS-CoV-2 tek njerëzit asimptomatikë para shpërthimit të COVID-19 në Itali mund të riformojë historinë e pandemisë.

**Fjalët kyçe: Screening, antitrupa COVID-19, SARS-CoV-2**

Në fund të dhjetorit 2019, sindroma e rëndë akute e frymëmarrjes koronavirus 2 (SARS-CoV-2) që shkakton pneumoni serioze u identifikua në Wuhan, Provinca Hubei, Kinë. Sëmundja virale e sëmundjes koronavirus 2019 (COVID-19) u përhap me shpejtësi në të gjithë botën dhe Organizata Botërore e Shëndetësisë deklaroi statusin e pandemisë në mars 2020 (www.who.int).

Dy rastet e para në Itali të sëmundjes COVID-19 u regjistruan më 30 janar 2020, kur dy turistë nga Kina dolën pozitivë për SARS-CoV-2 në Romë. Rasti i parë laboratorik i konfirmuar italian COVID-19 u identifikua në Lombardi në 20 Shkurt 2020, te një 38-vjeçar i cili nuk kishte histori të kontakteve të mundshme me raste pozitive në Itali apo jashtë saj. Brenda disa ditësh, raste shtesë të COVID-19 dhe pacientëve me sëmundje kritike u regjistruan në zonën përreth. Së shpejti disa raste u identifikuan në rajone të tjera italiane, kryesisht në zonën veriore. Bllokimet u aplikuan për herë të parë në 2 zona kritike të Lombardisë dhe Venetos dhe u zbatuan me shpejtësi në rajon dhe në mbarë vendin duke filluar nga 8 marsi.

Mbi bazën e identifikimit të rastit të parë, u hipotezua se virusi kishte qarkulluar në Itali që nga janari 2020. Sidoqoftë, përhapja e shpejtë, numri i madh i pacientëve që kërkojnë pranim dhe trajtim në spital në njësitë e kujdesit intensiv, si dhe kohëzgjatja e pandemisë sugjerojnë që ardhja e virusit dhe qarkullimi i tij në Itali në një formë më pak simptomatike mund të parashikohet me disa muaj më herët.

Analizat serologjike mund të përdoren për të hetuar përgjigjet e antitrupave kundër infeksionit SARS-CoV-2 dhe për të vlerësuar prevalencën e tij reale. Analizat e përgjigjes së antitrupave Anti-SARS-CoV-2 në pacientët me COVID-19 treguan se brenda 13 ditëve pas shfaqjes së simptomës, serokonvertimi i imunoglobulina antivirale G (IgG) ose imunoglobulina M (IgM) ishte e pranishme në pothuajse 100% të pacientëve.

Për të testuar hipotezën e qarkullimit të hershëm të virusit në Itali, ne kemi hetuar frekuencën, kohën dhe shpërndarjen gjeografike të ekspozimit të SARS-CoV-2 në një seri prej 959 individësh asimptomatikë, duke përdorur antitrupa të detyrueshëm dhe neutralizues të SARS-CoV-2 në depot e mostrave plazmatike. Popullsia u regjistrua nga shtatori 2019 deri në mars 2020 përmes provës SMILE (Shfaqja dhe ndërhyrja e shumëfishtë mbi epidemitë e mushkërive; Identifikuesi i ClinicalTrials.gov: NCT03654105), një studim i mundshëm i shqyrtimit të kancerit të mushkërive duke përdorur tomografi të llogaritur me dozë të ulët dhe biomarkera të gjakut, me miratimin të bordit tonë të rishikimit institucional dhe komitetit të etikës. Të gjithë pjesëmarrësit e kualifikuar kanë dhënë pëlqimin me shkrim të informuar.

Një test i imunosorbentit të lidhur me enzimat specifike të fushës lidhëse të receptorëve (RBD) u krye dhe u kualifikua siç raportohet nga Mazzini dhe kolegët e tyre. Një provë cilësore e mikroneutralizimit u krye siç u raportua më parë. Detaje mund të gjenden në materialin shtesë.

Karakteristikat e grupit SMILE janë treguar në Tabelën Suplementare S1. Si përmbledhje, 397 pacientë (41.4%) ishin gra, 63.2% ishin 55-65 vjeç, 76.8% ishin duhanpirës aktualë, dhe 92.9% kishin pirë duhan ⩾30 paketa në vit. Në përgjithësi, 111 nga 959 (11.6%) mostra të plazmës treguan antitrupa specifikë SARS-CoV-2 RBD (IgM, IgG, ose të dyja). Në veçanti, antitrupat IgM u zbuluan në 97 (10.1%) pacientë; Antitrupat IgG u gjetën në 16 (1.7%). Të gjithë pacientët ishin asimptomatikë në kohën e mbledhjes së mostrës së gjakut.

Tabela 1 raporton zbulimin e antitrupave anti-SARS-CoV-2 RBD sipas kohës së mbledhjes së mostrave në Itali. Në 2 muajt e parë, Shtator – Tetor 2019, 23/162 (14.2%) pacientë në Shtator dhe 27/166 (16.3%) në Tetor shfaqën antitrupa IgG ose IgM, ose të dyja. Mostra e parë pozitive (IgM-pozitive) u regjistrua më 3 shtator në rajonin e Venetos, e ndjekur nga një rast në Emilia Romagna (4 shtator), një rast në Liguria (5 shtator), dy raste në Lombardi (Provinca Milano; 9 shtator), dhe një në Lazio (Roma; 11 shtator). Deri në fund të shtatorit, 13 nga 23 (56.5%) mostra pozitive u regjistruan në Lombardi, tre në Veneto, dy në Piemonte dhe një secili në Emilia Romagna, Liguria, Lazio, Campania dhe Friuli. Një shpërndarje e ngjashme e kohës është vërejtur kur merret parasysh vetëm Lombardia (Tabela Suplementare S2).

**Tabela 1. Zbulimi i antitrupave të domenit që lidh receptorin me sindromën e rëndë akute të frymëmarrjes koronavirus 2 (SARS-CoV-2) sipas kohës së mbledhjes së mostrave në të gjitha rajonet**

Diagrami në Figurën 1 ilustron ndryshimin kohor në mostrat pozitive nga shtatori 2019 deri në shkurt të vitit 2020. Veçanërisht, dy kulmet e pozitivitetit për antitrupat anti-SARS-CoV-2 RBD ishin të dukshme: e para filloi në fund të shtatorit, duke arritur 18% dhe 17% të rasteve pozitive IgM në javët e dytë dhe të tretë të tetorit, respektivisht. Një i dytë ndodhi në Shkurt 2020, me një kulm prej mbi 30% të rasteve IgM-pozitive në javën e dytë. Nga ky grup me 16 mostra pozitive, 11 (68.7%) e kanë origjinën në Lombardi.

**Figura 1. Frekuenca e imunoglobulinës M (kolonat e kuqe) dhe imunoglobulinës G (kolonat blu) fusha lidhëse e receptorit (RBD) – raste pozitive në lidhje me numrin e përgjithshëm të pjesëmarrësve në kontrolle (kolona të gjelbërta) përgjatë 24 javëve nga shtatori 2019 deri në shkurt 2020**

Shpërndarja kombëtare e 959 pacientëve të rekrutuar dhe 111, të cilët rezultuan pozitivë për antitrupa RBD-SARS-CoV-2 në krahasim me alokimin e pacientëve me COVID-19 të identifikuar në Itali deri më 10 Mars (data e fundit e rekrutimit të studimit SMILE) tregohet në Figurën 2 (A) dhe Tabelën Suplementare S3.

959 pacientë të rekrutuar vinin nga të gjitha rajonet italiane dhe të paktën një pacient SARS-CoV-2-pozitiv u zbulua në 13 rajone. Sipas të dhënave të mbledhura nga faqja e internetit e Ministrisë Italiane të Shëndetësisë (ëëë.salute.gov.it), Lombardia ishte rajoni më i prekur nga pandemia, me 5791 / 10,141 (57.1%) pacientë me COVID-19, dhe tregoi numrin më të lartë të pacientëve të rekrutuar në 491/959 (51.2%). Duke marrë parasysh 111 raste pozitive, 59 (53.2%) ishin mes banorëve të Lombardisë, të ndjekur nga Piemonte dhe Lazio (10 raste secila, 9%); Emilia Romagna (7 raste, 6.3%); Toskana dhe Veneto (6 raste secila, 5.4%); Liguria (4 raste, 3.6%); Campania, Friuli dhe Puglia (2 raste secila, 1.8%); dhe Siçilia, Valle d ’Aosta dhe Sardenja (nga 1 rast secili, 0.9%).

**Figura 2. Krahasimi i shpërndarjes së pacientëve me sëmundje koronavirus 2019 (COVID-19) të identifikuar deri më 10 mars 2020, sipas të dhënave të Ministrisë Italiane të Shëndetësisë (**[**www.salute**](http://www.salute)**.gov.it), me shpërndarjen e të rekrutuarve, subjekte të shqyrtimit (pikat blu) dhe fusha e lidhjes së receptorëve SARS-CoV-2 (RBD) – subjektet e shqyrtimit pozitiv (pikat e kuqe) të gjykimit SMILE (Shfaqja dhe ndërhyrja e shumëfishtë në epidemitë e mushkërive). Shpërndarja kombëtare përfshin 10,149 pacientë me COVID-19, 959 subjekte të rekrutimit të kontrollit screening dhe 111 SARS-CoV-2 subjekte të shqyrtimit pozitiv në RBD në të gjitha 20 rajonet italiane (A). Shpërndarja rajonale përfshin 5791 pacientë me COVID-19, 491 subjektet e rekrutimit të kontrollit screening dhe 59 SARS-CoV-2 subjekte të shqyrtimit pozitiv në RBD në të 12 provincat e Lombardisë (B).**

Figura 2B dhe Tabela Plotësuese S4 tregojnë shpërndarjen në 12 provincat e Lombardisë të 491 pacientëve të rekrutuar dhe të 59 pacientëve që testojnë pozitivisht për antitrupa anti-SARS-CoV-2 RBD në krahasim me alokimin e 5791 pacientëve me COVID-19 të identifikuar deri deri më 10 mars në të njëjtin rajon (ëëë.salute.gov.it). Në përgjithësi, 30 pacientë pozitivë u zbuluan në Provincën e Milanos dhe 29 në provincat e tjera të analizuara (Monza: 6, Como: 5, Bergamo: 4, Brescia: 3, Varese: 3, Leço: 2, Pavia: 2, Mantova: 1, Lodi: 1, Kremona: 1 dhe Sondrio: 1). Prandaj shpërndarja gjeografike dhe koha e individëve SARS-CoV-2-pozitivë të identifikuar në studimin tonë pasqyrojnë nga afër incidencën e COVID-19 të regjistruar zyrtarisht në Itali.

Vlerësimi i antitrupave funksionalë anti-SARS-CoV-2 (NAbs) u krye për të gjithë 111 mostra SARS-CoV-2 RBD pozitive duke përdorur një efekt citopatik (CPE) me bazë mikro-neutralizimin e virusit të gjallë në një nivel të lartë të biosigurisë së nivelit 2 laboratorike. Gjashtë nga 111 pacientë SARS-CoV-2 RBD pozitivë ishin pozitivë në testin cilësor të mikroneutralizimit të bazuar në CPE. Nga këto, katër mostra u mblodhën në tetor (dy në 7, një në 8 dhe 21), një në nëntor dhe një në shkurt. Tre nga mostrat pozitive të NAb ishin nga Lombardia, një nga Lazio, një nga Toskana dhe një nga Valle d’Aosta. Prania e NAbs funksionale anti-SARS-CoV-2 në fillim të tetorit 2019 mbështet më tej qarkullimin e hershëm të pavënë re të virusit në Itali, veçanërisht në Lombardi.

Në fund të Dhjetorit 2019, COVID-19 u shfaq në Qytetin Wuhan, Kinë. Nga 12 shtatori i vitit 2020, 37,584,742 raste COVID-19 u konfirmuan në të gjithë botën, me më shumë se 1 milion vdekje (https://coronavirus.jhu.edu/map.html). Në Itali, rasti i parë u identifikua në Lombardi më 20 Shkurt, dhe vdekja e parë që i atribuohet COVID-19 ndodhi te një pensionist 77-vjeçar që jetonte në një qytet të vogël në rajonin e Venetos. Në mes të shtatorit 2020, numri i rasteve zyrtare në Itali arriti afërsisht 300,000, me mbi 35,000 vdekje (www.salute.gov.it), por ka të ngjarë që këta numra të mos pasqyrojnë fillimin aktual dhe epidemiologjinë e SARS-CoV-2 në Itali.

Dy dukuri duhet të theksohen dhe diskutohen. E para ka të bëjë me nënvlerësimin e prevalencës së rasteve. Autoritetet shëndetësore rajonale dhe kombëtare, pas një përpjekje për të identifikuar herët rastet dhe të dyshuarit dhe gjurmuar të gjitha kontaktet e mundshme, shpejt e braktisën këtë strategji si të paqëndrueshme dhe u përqendruan në strategjinë e identifikimit, me tamponë dhe serologji, vetëm në raste simptomatike. Si pasojë, u krijua një nënvlerësim i përgjithshëm i rasteve të COVID-19 dhe u prezantua një paragjykim i përzgjedhjes, me një mbivlerësim të shkallës së vdekshmërisë.

Vëzhgimet e projektuara mirë në nën-popullatat e zgjedhura me grupe specifike të rrezikut, kanë ofruar informacion të vlefshëm epidemiologjik. Prevalenca e infeksionit SARS-CoV-2 u testua në 8285 punonjës të kujdesit shëndetësor të spitaleve kryesore të Rajonit Veneto midis 22 shkurtit dhe 29 majit 2020. Duke matur antitrupat specifikë, u vërejt një prevalencë e përgjithshme prej 4.6%. Megjithëse antitrupat e zbulueshëm u gjetën në të gjithë punëtorët që zhvilluan infeksion të rëndë COVID-19 (100%), seropozitiviteti më i ulët u gjet te ata me sëmundje të lehtë (83%), dhe prevalenca më e ulët (58%) u vu re tek individët asimptomatik.

Midis 25 majit dhe 15 korrikut, Ministria Italiane e Shëndetësisë realizoi një studim të madh mbi mbizotërimin e SARS-CoV-2 në një mostër përfaqësuese prej 64,660 individësh. Është raportuar një shkallë e përhapjes globale prej 2.5%, me një kulm në rajonin e Lombardisë (7.5%) dhe në veçanti në Provincën Bergamo (24%) (ëëë.salute.gov.it). Si pasojë, numri i vërtetë i italianëve që kishin qenë në kontakt me virusin do të ishte afërsisht 1.5 milion, shumë prej të cilëve ishin asimptomatikë, një vlerësim gati 5 herë më i lartë se sa shifrat zyrtare të raportuara.

Shqetësimi i dytë ka të bëjë me fillimin e epidemisë, e cila ka të ngjarë të ketë paraprirë identifikimin e rastit të parë, ndoshta në pjesën e fundit të vitit 2019. Që nga nëntori-dhjetor 2019, shumë mjekë të përgjithshëm filluan të raportonin shfaqjen e simptomave të rënda të frymëmarrjes tek të moshuarit dhe njerëz të dobët me bronkit atipik bilateral, i cili iu atribua, në mungesë të lajmeve për virusin e ri, formave agresive të gripit sezonal. Një hetim mbi seroprevalencën e SARS-CoV-2 në dhuruesit e shëndetshëm të gjakut është kryer në një nga dy zonat fillestare të bllokimit në Italinë veriore.

Në një grup prej 300 mostrash të plazmës të ruajtura, 5 mostra të mbledhura midis 12 dhe 17 shkurtit ekspozuan prova të NAB-ve anti-SARS-CoV-2. Për më tepër, një analizë filogjenetike e gjenomeve SARS-CoV-2 të izoluara nga 3 pacientë të Lombardisë të përfshirë në shpërthimin e parë të COVID-19 sugjeron që origjina e përbashkët e llojeve daton disa javë para rasteve të para të pneumonisë COVID-19 të raportuara në Kinë. Bazuar në këto gjetje, një qarkullim i mëparshëm i pavënë re i virusit në mesin e popullatës italiane mund të hipotezohet.

Duke pasur parasysh rritjen e shpejtë të rasteve simptomatike në të gjithë botën, një kuptim më i mirë i historisë fillestare dhe epidemiologjisë së COVID-19 mund të përmirësojë strategjinë e shqyrtimit dhe të përmbajë efektet e një vale të dytë të mundshme. Dëshmitë nga monitorimi mjedisor treguan se SARS-CoV-2 po qarkullonte tashmë në Italinë veriore në fund të vitit 2019. Analiza molekulare me analiza të reaksionit zinxhir polimerazë të transkriptimit të kundërt të 40 mostrave të ujërave të ndotura me ndikim të përbërë të mbledhura midis tetorit 2019 dhe shkurtit 2020 në tre qytete dhe rajone në Italinë veriore (Milano / Lombardia, Torino / Piemonte dhe Bolonja / Emilia Romagna) tregoi praninë e ARN-së virale që shfaqet për herë të parë në mostrat e ujërave të zeza të mbledhura më 18 dhjetor në Milano dhe Torino. Ky studim gjithashtu tregon se SARS-CoV-2 po qarkullonte në rajone të ndryshme gjeografike njëkohësisht, gjë që pajtohet me gjetjet tona serologjike.

Në nivelin ndërkombëtar, provat e përputhshme vijnë nga dy studime shtesë. Një artikull i parë raportoi një rast të një pacienti të shtruar në spital për hemoptizë pa diagnozë etiologjike në një njësi të kujdesit intensiv në Paris, Francë, në Dhjetor 2019. Analiza molekulare retrospektive në tamponin e ruajtur nazofaringeale konfirmoi diagnozën e infeksionit SARS-CoV-2. Një studim i dytë nga Universiteti i Harvardit tregoi një rritje të rëndësishme të trafikut spitalor në rajonin e Wuhan, vlerësuar nga imazhet satelitore dhe pyetje të lidhura me simptomat COVID-19 në motorët e kërkimit, që nga vjeshta 2019.

Këto zbulime sugjerojnë se virusi mund të ketë qarkulluar tashmë në kohën e shpërthimit në disa vende. Për njohuritë tona, nuk ka të dhëna të botuara mbi përgjigjet e antitrupave ndaj SARS-CoV-2 në periudhën parapandemike në asnjë vend në botë. Studimi ynë u krye në një mostër individësh asimptomatikë me origjinë nga të gjitha rajonet italiane. Të paktën një individ SARS-CoV-2-pozitiv u zbulua në 13 rajone, dhe Lombardia kishte numrin më të lartë, duke pasqyruar të dhënat nga sondazhi kombëtar.

Rritja e parë e rasteve pozitive u identifikua në shtator-tetor 2019. Vlerësimi i NAbs funksionale anti- SARS-CoV-2 identifikoi mostra pozitive në testet e mikroneutralizimit të bazuara në CPE të mbledhura tashmë në tetor 2019. Duke pasur parasysh vonesën kohore midis infeksionit dhe sintezës së antitrupave, këto rezultate tregojnë se virusi qarkulloi në Itali shumë përpara zbulimit të pacientit të të deklaruar në shkurt 2020. Për më tepër, shumica e individëve të parë pozitivë ndaj antitrupave jetonin në rajone ku filloi pandemia.

Analiza serologjike e përdorur në këtë studim është një ELISA e bazuar në RBD, domethënë, VM-IgG-RBD dhe VM-IgM-RBD, dhe është një analizë e zhvilluar duke përdorur glikoproteinën spike (S-proteina), e cila ndërmjetëson lidhja për qelizat e synuara përmes bashkëveprimit midis RBD dhe receptorit 2 të enzimës njerëzore konvertuese të angiotenzinës (ACE2). Proteina S është gjetur të jetë shumë imunogjene dhe RBD konsiderohet si synimi kryesor specifik SARS-CoV-2 në përpjekjen për të nxjerrë NAbs të fuqishëm.

Në studimin tonë paraprak, një korrelacion i shkëlqyeshëm midis titrit të neutralizimit IgG, IgM dhe imunoglobulinë u vërejt një përgjigje ELISA kundër RBD të proteinave S, që konfirmon se ELISA e bazuar në RBD mund të përdoret si një zëvendësues i vlefshëm për neutralizim. Prandaj, specifika e analizave të përdorura në studimin e tanishëm mbështet fuqimisht gjetjet tona të seroprevalencës në një numër të rëndësishëm të individëve asimptomatikë shumë përpara periudhës së hapur pandemike, me pacientë pozitivë në shtator-tetor 2019.

Rezultatet tona tregojnë se SARS-CoV-2 qarkulloi në Itali më herët sesa rastet e para zyrtare COVID-19 u diagnostikuan në Lombardi, madje shumë më përpara se raportet e para zyrtare nga autoritetet kineze, duke hedhur dritë të re mbi fillimin dhe përhapjen e COVID- 19 pandemi.

Kontributet e autorëve

Modeli i studimit: G. Apolone, E. Montomoli, G. Sozzi dhe U. Pastorino.

Mbledhja e të dhënave: E. Montomoli, A. Manenti, I. Hyseni, L. Mazzini, D. Martinuzzi, L. Cantone, G. Milanese, S. Sestini, P. Suatoni, A. Marchianò dhe V. Bollati.

Analiza e të dhënave: M. Boeri, F. Sabia, G. Sozzi dhe U. Pastorino.

Interpretimi i të dhënave: G. Apolone, E. Montomoli, A. Manenti, M. Boeri, F. Sabia, G. Sozzi dhe U. Pastorino.

Shifrat dhe tabelat: M. Boeri dhe F. Sabia. G. Apolone, E. Montomoli, G. Sozzi dhe U. Pastorino kanë verifikuar të dhënat themelore.

Të gjithë autorët morën pjesë në hartimin e veprës ose rishikimin kritik të saj për përmbajtje të rëndësishme intelektuale dhe miratuan versionin përfundimtar të dorëshkrimit.

Deklarata për konflikt interesi

Autorët nuk deklaruan konflikte të mundshme interesi në lidhje me kërkimin, autorësinë dhe / ose botimin e këtij artikulli.

Financimi

Autorët shpalosën marrjen e mbështetjes financiare të mëposhtme për kërkimin, autorësinë dhe / ose botimin e këtij artikulli: Drejtimi Shkencor Fondazione IRÇS Istituto Nazionale Tumori, Shoqata Italiane për Kërkimin e Kancerit (AIRC 5x1000 kod.12162, shtrirje 2017-2020), Ricerca Corrente i Ministrisë Italiane të Shëndetësisë.