

Analisi sui metodi di campionamento per Antigene COVID-19

Dott. Piero Lazzari, Milano

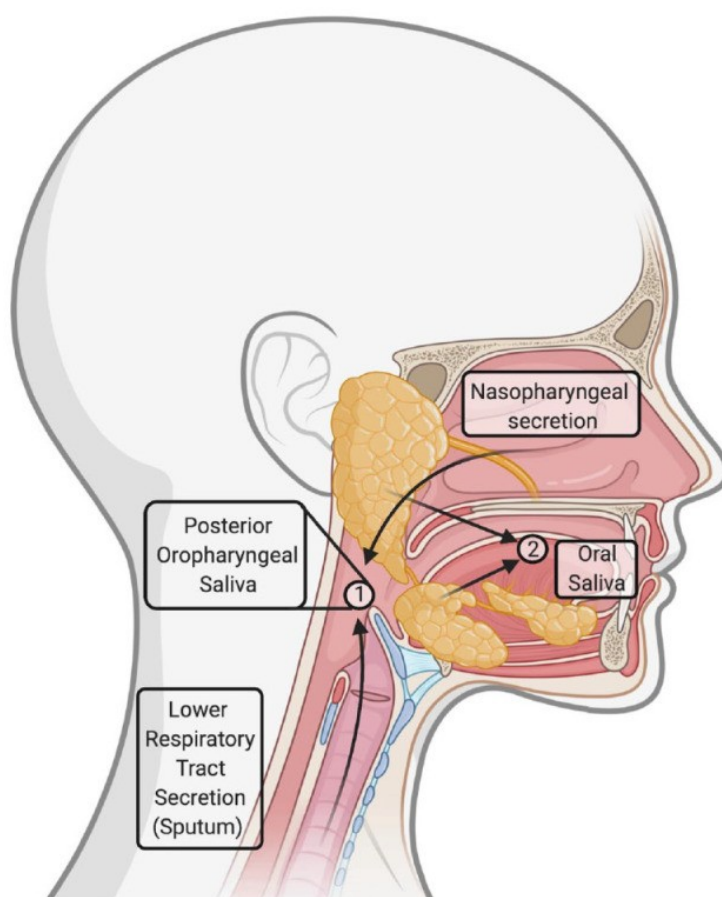
Alla fine di dicembre 2019, una nuova malattia causata da coronavirus (COVID-19) ha iniziato a diffondersi a livello globale, crescendo fino a sfociare in una pandemia. Al 22 settembre 2020, sono stati segnalati un totale di 30 milioni di casi confermati da oltre 200 paesi e quasi 1 milione di decessi in tutto il mondo. Per arginare questa situazione, sono necessari strumenti adeguati e in grado di monitorare lo sviluppo della malattia.

Al fine monitorare le infezioni virali, vengono misurate di routine, nella popolazione, le cariche virali del tratto respiratorio per indagare meglio la progressione clinica, la risposta al trattamento, la cura e la ricaduta. Per la diagnosi di COVID-19 vengono utilizzati diversi metodi di campionamento:

- il test **SIEROLOGICO**: viene eseguito analizzando un campione di sangue o plasma. Può essere eseguito attraverso il classico prelievo venoso o con uno strumento pungidito. Tramite il prelievo venoso è possibile fare un'analisi quantitativa degli anticorpi "anti Covid-19", mentre con il pungidito è possibile fare una diagnosi solo qualitativa (in pratica ci dice se ci sono o meno gli anticorpi, ma non ci dice in quale quantità). I test qualitativi, per essere attendibili richiedono un certo quantitativo di anticorpi, pertanto possono risultare negativi nei primi giorni successivi al contagio. Questo tipo di test ci consente di sapere se il soggetto sia entrato in contatto con il virus, ma non ci dice se ci sia ancora il virus all'interno dell'organismo, pertanto in caso di positività al sierologico dovrebbe essere eseguito un ulteriore test di approfondimento. Possono essere utili per screening di routine e a scopo statistico.
- Il test **ANTIGENICO** consente di rilevare le proteine antigeniche presenti sul virus, pertanto la positività del test indica che l'infezione virale è in corso. Affinché il test sia attendibile è necessario prelevare un quantitativo utile di antigene. La semplicità e la rapidità lo rendono il test migliore da eseguire presso i luoghi di lavoro, negli aeroporti, nei grandi ospedali come screening di primo livello. Il test, infatti, non richiede alcuna strumentazione da laboratorio. Il test antigenico può essere eseguito attraverso diverse modalità di prelievo: rinofaringeo, orofaringeo ed espettorato.
 - Il **tampone rinofaringeo** (o **tampone nasofaringeo** o **tampone faringeo**) è una procedura utilizzata per prelevare secrezioni e materiale biologico dalla rinofaringe e faringe. Il prelievo consiste nel passare leggermente un apposito tampone monouso (simile ad un bastoncino cotton-fioc) sulla mucosa della faringe posteriore e sulle tonsille, avendo cura di evitare il contatto con la mucosa orale e la lingua.
 - Il **test salivare**, meno invasivo e più rapido, prevede il prelievo di un campione di espettorato. L'utilizzo dell'espettorato come campione diagnostico presenta numerosi vantaggi: il campione è facilmente raccogliibile dal paziente con un minimo disagio, non necessita di personale sanitario specializzato per la sua gestione, riduce i rischi per l'operatore.
- Il test **MOLECOLARE** rileva l'RNA virale pertanto, come per l'antigenico, in caso di positività viene attestata l'infezione in corso. In questo caso l'RNA viene amplificato con metodiche PCR pertanto anche piccole quantità di genoma vengono rilevate. Poiché necessita di strumentazione

professionale questo tipo di test viene processato nei laboratori di analisi, non è adatto per un uso ambulatoriale o per lo screening di flussi importanti di soggetti da analizzare. Anche per i test molecolari esiste la variante con prelievo di campione tramite tampone o tramite espettorato.

Alla luce di quanto esposto, per il monitoraggio del personale all'interno dei luoghi di lavoro, nonché per tutte le situazioni dove sia necessario un responso immediato il test antigenico sembra essere quello più adatto.



Tuttavia, una questione poco chiara e molto dibattuta, è quale sia il test più appropriato in termini di efficacia fra il test antigenico dell'espettorato e il test antigenico tramite tampone orofaringeo o rinofaringeo.

Presso il Renmin Hospital dell'Università di Wuhan è stato condotto uno studio di coorte osservazionale che ha coinvolto 31 pazienti con COVID-19. Sono stati ottenuti campioni da ogni paziente e la carica virale seriale è stata misurata mediante reazione quantitativa a catena della polimerasi in tempo reale. È stato notato come la carica virale nell'espettorato fosse incline ad essere maggiore rispetto ai campioni ottenuti dal tampone nasofaringeo alla presentazione della malattia. Inoltre, la carica virale nell'espettorato è diminuita più lentamente nel tempo rispetto al gruppo rinofaringeo con il progredire della malattia. È interessante notare che, anche quando i campioni nel tampone rinofaringeo sono diventati negativi, è stato comunemente osservato che i pazienti con malattie concomitanti, in particolare ipertensione e diabete, sono rimasti positivi al COVID-19 e hanno richiesto un periodo più lungo perché i campioni di espettorato diventassero

negativi. Questi risultati sottolineano l'importanza di monitorare i campioni di espettorato anche nei pazienti con test negativi da tamponi nasofaringei, specialmente per quelli con comorbidità esistenti.

Un altro studio condotto da ricercatori del Brigham and Women's Hospital mostra che il test sull'espettorato ha rilevato l'RNA del virus che causa COVID-19 a tassi significativamente più alti, mentre il test con tampone orofaringeo aveva tassi inferiori.

I ricercatori hanno condotto una revisione sistematica e una meta-analisi, analizzando i dati di oltre 3.000 campioni per confrontare i tre approcci. I risultati sono stati pubblicati su EBioMedicine. Il team di lavoro ha esaminato la frequenza con cui ciascun metodo di raccolta ha prodotto un risultato positivo. Per i tamponi nasofaringei la percentuale era del 54%; per tamponi orofaringei del 43%; per l'espettorato del 71%. Il tasso di rilevamento virale era significativamente più alto nell'espettorato rispetto ai tamponi orofaringei o ai tamponi nasofaringei. In linea generale i tassi di rilevamento erano più alti entro una settimana dall'insorgenza dei sintomi per tutti e tre i test.

Bisogna sottolineare, per completezza di informazione, come la meta-analisi includesse solo studi condotti su individui ospedalizzati. Saranno, pertanto, necessari ulteriori studi su pazienti asintomatici o con sintomi lievi per confermare i dati ottenuti.

Un team investigativo COVID-19 negli Stati Uniti confrontando 117 coppie di campioni rinofaringei e orofaringei di 12 pazienti contemporaneamente, ha scoperto che 32 coppie erano discordanti con un test positivo e l'altro negativo: il campione rinofaringeo è risultato positivo nel 66% di quelle coppie, rispetto al 34% per il campione orofaringeo. Al contrario, un altro studio (Wolfel 2020), non ha mostrato livelli di RNA virale più elevati nei campioni rinofaringei rispetto ai campioni orofaringei.

Un altro studio (Willye 2020) ha mostrato che l'espettorato era il campione più appropriato per la diagnosi di SARS-CoV-2. L'espettorato offre un campione non invasivo che può essere considerato anche per l'autocampionamento. Secondo l'autore, in una situazione in cui un campione rinofaringeo o altro sopra menzionato non sia accettabile, l'espettorato potrebbe essere considerata un campione alternativo.

Lo studio di Willye e coll. Sottolinea come l'espettorato sia un'alternativa praticabile e preferibile ai tamponi nasofaringei per il rilevamento della SARS-CoV-2. Sulla base dei dati raccolti dall'autore la sensibilità del rilevamento SARS-CoV-2 attraverso espettorato è paragonabile, se non superiore, ai tamponi rinofaringei nei primi ricoveri ospedalieri ed è più consistente durante il ricovero prolungato e il recupero. Inoltre, il rilevamento di SARS-CoV-2 dall'espettorato di due operatori sanitari asintomatici con tamponi nasofaringei risultati negativi, suggerisce che la l'espettorato può anche essere un'alternativa vitale per l'identificazione di infezioni lievi o subcliniche.

Sebbene altri studi siano necessari per approfondire e confermare il ruolo dei test salivari nella diagnosi di infezione da Covid-19, secondo gli studi condotti da vari autori riportati in questa discussione, si può affermare come i suddetti test salivari, grazie alla semplice modalità di utilizzo e alla rapidità di azione, possano rappresentare un ottimo mezzo di screening di massa per individuare soggetti positivi al SARS-CoV-2, specialmente in quei luoghi ove sia richiesto l'utilizzo di strumenti rapidi e di semplice utilizzo (es. luoghi di lavoro, aeroporti, cliniche mediche private, grandi strutture ospedaliere, ecc...).

BIBLIOGRAFIA

WHO

Coronavirus disease (COVID-19) situation reports. 2020 [cited 2020 Sept 23]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports> [Google Scholar]

R. Liu,¹* S. Yi,²* J. Zhang,²* Z. Lv,¹* C. Zhu,^{1,3} and Y. Zhang²
J Dent Res. 2020 Oct; 99(11): 1239–1244.

Viral Load Dynamics in Sputum and Nasopharyngeal Swab in Patients with COVID-19

Abbas Mohammadia, Elmira Esmaeilzadeha, Yijia Lia, Ronald J Boschb, Jonathan Z Lia
A new gold standard? Sputum testing provides higher rate of COVID-19 detection
JULY 29TH, 2020 A FOCUS, CORONAVIRUS

Anne Louise Wyllie, John Fournier, Arnau Casanovas-Massana, Melissa Campbell, Maria Tokuyama, Pavithra Vijayakumar, Bertie Geng, M. Catherine Muenker, Adam J. Moore, Chantal B. F. Vogels, Mary E. Petrone, Isabel M. Ott, Peiwen Lu, Alice Lu-Culligan, Jonathan Klein, Arvind Venkataraman, Rebecca Earnest, Michael Simonov, Rupak Datta, Ryan Handoko, Nida Naushad, Lorenzo R. Sewanan, Jordan Valdez, Elizabeth B. White, Sarah Lapidus, Chaney C. Kalinich, Xiaodong Jiang, Daniel J. Kim, Eriko Kudo, Melissa Linehan, Tianyang Mao, Miyu Moriyama, Ji Eun Oh, Annsea Park, Julio Silva, Eric Song, Takehiro Takahashi, Manabu Taura, Orr-El Weizman, Patrick Wong, Yexin Yang, Santos Bermejo, Camila Odio, Saad B. Omer, Charles S. Dela Cruz, Shelli Farhadian, Richard A. Martinello, Akiko Iwasaki, Nathan D. Grubaugh, Albert I. Ko
Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs

Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al.
Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 1 April, 2020.

Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States.
Nat Med. 2020 Apr 23.

Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al.
Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. medRxiv. 2020:2020.04.16.20067835.