

■ **Seminari online**

La diagnosi microbiologica di SARS-CoV-2: il punto sui test rapidi e altri aggiornamenti

The microbiological diagnosis of SARS-CoV-2: the spot on rapid tests and other updates

Il 23 ottobre 2020 si è tenuto il terzo Webinar sulla diagnostica di SARS-CoV-2, organizzato da SIMPIOS insieme ad **AMCLI** (Associazione Microbiologi Clinici Italiani), **SIM** (Società Italiana di Microbiologia) e comitato nazionale **EUCIC** (European Committee on Infection Control). L'evento, della durata di circa due ore, è stato moderato dal **dott. Annibale Raglio** (ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo) ed ha coinvolto come relatori i microbiologi **prof. Maurizio Sanguinetti** (Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, Roma), la **prof.ssa Maria Rosaria Capobianchi** (Istituto Nazionale per le Malattie Infettive L.Spallanzani, Roma), il **prof. Mauro Pistello** (Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa), **prof. Vittorio Sambri** (AUSL della Romagna, Cesena) e la **dott.ssa Silvana Gritti** (Casa di Cura S. Francesco, Bergamo); si è trattato di un confronto di esperienze diverse per approfondire la possibilità di utilizzo dei test rapidi nella pratica quotidiana e per portare alcuni aggiornamenti sui valori e i limiti delle diagnostiche molecolari in uso.

Giulia De Angelis

Il dott. Raglio ha introdotto il convegno sulla diagnosi microbiologica di SARS-CoV-2 evidenziando la situazione epidemiologica attuale, che rispecchia probabilmente quella già vissuta ai primi di Febbraio 2020, e le principali problematiche, quali il fatto che i laboratori si trovino sommersi da richieste non sempre motivate (ad esempio, test molecolare per paziente positivo dopo sole 72 ore dall'ultimo tampone), la richiesta di tempi di risposta sempre più rapidi, difficili da rispettare, la carenza di apparecchiature e dei relativi materiali di consumo e, non ultimo per importanza, la difficile interpretazione dei risultati.

Il prof. Sanguinetti, direttore dell'Unità Operativa Complessa di Microbiologia, ha condiviso con i partecipanti l'esperienza della Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli di Roma. Egli ha richiamato, anzitutto, i capisaldi della diagnostica di SARS-CoV-2:

- PCR convenzionale e similari: sistema accurato con tempi di processamento lunghi (anche se parliamo comunque di tre ore e mezzo!);
- test antigenici: meno accurati ma più rapidi e poco costosi. I test antigenici rilevano la proteina virale e sono pertanto più sensibili nelle fasi iniziali di malattia, quando il paziente è più infettivo. Il livello di antigene dopo 5-7 giorni dall'esordio di malattia può scendere sotto il limite di sensibilità del test e risultare falsamente negativo. D'altra parte, la specificità dei test antigenici è simile a quella dei test molecolari;

- test molecolari: il "tampone nasale" rappresenta l'esame principale e più affidabile per stabilire la presenza del virus. La presenza di frammenti di materiale genetico (RNA virale) indica la positività. Da evidenziare che i test molecolari possono rimanere positivi anche dopo che il paziente non è più contagioso;
- test sierologici: importanti per monitorare l'evoluzione della malattia, utili per conoscere la diffusione del virus nella popolazione ma poco rilevanti per la diagnosi.

Come novità sui test molecolari, il prof. Sanguinetti ha condiviso l'esperienza con test BioFire coronavirus disease 2019 (COVID-19) (BioFire Defense, Salt Lake City, UT, USA), test completamente automatizzato che utilizza la già ben nota piattaforma FilmArray, che fornisce i risultati di un tampone nasofaringeo in 45 minuti. Testato su un totale di 120 campioni, di cui 86 positivi e 34 negativi per SARS-CoV-2 secondo il sistema di riferimento Allplex 2019-nCoV assay (Arrow Diagnostics, Genova) e confermati con sistema quantitativo Quanta COVID-19 assay (Clonit, Milano), il test ha dimostrato una buona accuratezza, con sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e valore predittivo negativo (e relativi intervalli di confidenza al 95%) pari a 93.0% (85.4-97.4), 100.0% (89.7-100.0), 100.0% (95.5-100.0) e 85.0% (70.2-94.3), rispettivamente¹. La carica virale (espressa in copie di RNA/mL) dei sei campioni risultati falsamente negativi con test BioFire andava da $2,20 \times 10^1$ a $1,60 \times 10^2$, cioè valori inferiori al limite di rilevamento di $3,30 \times 10^2$ copie di RNA/mL stimato per BioFire COVID-19 test.¹

Per quanto riguarda i test antigenici, in collaborazione con l'INMI L.Spallanzani si è valutata l'accuratezza del test immunologico fluorescente STANDARD F COVID-19 Ag (FIA) (SD Biosensor, Suwon, Corea del Sud), un test che rileva l'antigene nucleoproteico di SARS-CoV-2, su campioni di tampone nasofaringeo. Consiste in un dispositivo in cui un campione pre-estratto può reagire con un anticorpo monoclonale anti-SARS-CoV-2 e, dopo un'incubazione di 30

SIGLE ED ABBREVIAZIONI

COI: indice di lettura della fluorescenza	PCR: proteina C reattiva
CT: ciclo soglia	POC: punto di assistenza (point of care)
LOD: limite di rilevamento (limit of detection)	PPA: accordo percentuale positivo (positive percent agreement)
NPA: accordo percentuale negativo (negative percent agreement)	RNA: acido ribonucleico

minuti, un analizzatore Standard FX 2400 legge l'intensità della fluorescenza derivante dalla formazione del complesso anticorpo-antigene. Le prove di sensibilità hanno evidenziato un limite di rilevazione (*limit of detection*, LOD) pari a 2×10^6 copie di RNA/mL. A seguire, 359 campioni (104 positivi e 255 negativi), precedentemente caratterizzati con sistemi molecolari (Altona Diagnostics RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR, Seegene Allplex™ 2019-nCoV, Dia-Sorin Simplexa™ COVID-19 Direct o Roche Test diagnostico Cobas® SARS-CoV-2) sono stati testati con test antigenico STANDARD F COVID-19 Ag (FIA), ottenendo una percentuale di accordo positivo e negativo (*positive percent agreement*, PPA e *negative percent agreement*, NPA) di 47.1% e 98.4%. Riesaminando i risultati dopo stratificazione in base ai cicli soglia (CT) documentati al test molecolare, i valori di PPA aumentano con la diminuzione di CT, potendo concludere che il sistema è in grado di rilevare in maniera accurata l'infezione in presenza di cariche virali medio-alte.²

Il prof. Sanguinetti riporta inoltre un'altra esperienza più recente e ancora in corso, sempre in collaborazione con l'INMI L. Spallanzani, sul test immunoenzimatico a chemiluminescenza LUMIPULSE SARS-CoV-2 Ag (Fujirebio, Inc., Tokyo, Japan), già validato da Hirotsu e colleghi³ alcuni mesi fa, dimostrando un'ottima concordanza col sistema molecolare per cariche virali superiori a 10^2 copie di RNA/mL. Le prove di sensibilità hanno mostrato un LOD pari a 11.748 copie di RNA/mL, dimostrando quindi una sensibilità maggiore rispetto al precedente test. Finora il sistema è stato testato su 273 tamponi nasofaringei in parallelo con i sistemi molecolari (123 positivi e 150 negativi), mostrando una sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e valore predittivo negativo pari a 80.5%, 99.3%, 99.0% e 86.1%, rispettivamente. Stratificando i risultati per CT, il sistema mantiene una buona concordanza (>96%) per valori di CT fino a 30 che corrisponde spesso a cariche medio-alte.

Al di là delle specifiche caratteristiche dei vari test in commercio, si ricorda l'importanza di utilizzarli seguendo le giuste indicazioni, come quelle condivise nel documento del Ministero della Salute e Istituto Superiore di Sanità.⁴ (https://www.iss.it/documents/20126/0/COVID+19_+test+v4_k_l_a_s_t.p_d_f/g_a_b_i_f_2_1_1_7_d_8_8_-b_c_b_1_-d_4_5_4_-c_f_e_d_o_4_aa8b05?t=1604483686312)

Per concludere, il prof. Sanguinetti condivide i risultati di un lavoro in cui è stata valutata l'attività replicativa virale (tramite RNA subgenomico) in tamponi di 176 pazienti, ottenuti tempo dopo la guarigione da COVID-19, di cui 32 nuovamente positivi. In solo uno (3.1%) di questi 32 campioni positivi si è rilevata la presenza di RNA subgenomico. Questo paziente era effettivamente l'unico ancora sintomatico. Nei 31 pazienti rimanenti (tutti asintomatici), il risultato positivo probabilmente rappresentava un'infezione ricorrente o risolutiva, ma in entrambi i casi è improbabile che fossero infezioni trasmissibili.⁵

Il messaggio introduttivo della relazione successiva svolta dalla prof.ssa Capobianchi, direttore dell'Unità Operativa Complessa Laboratorio di Virologia dell'INMI L. Spallanzani, trae spunto da un lavoro pubblicato sulla rivista *New England Journal of Medicine*⁶ e sottolinea l'importanza di non giudicare il valore di un test sulla base della sola

sensibilità, ma di considerarlo in un contesto più ampio. Infatti, un test a bassa sensibilità analitica ma che può essere eseguito più spesso, perché più economico o rapido, può risultare nella pratica equivalente ad un test a più alta sensibilità analitica.

La relazione, riprendendo il lavoro di collaborazione già presentato dal prof. Sanguinetti,² sottolinea che la performance clinica di un test va considerata in base alla prevalenza di malattia. A seconda che questa sia, ad esempio, 0.5%, 1%, 2% o 10% l'accuratezza del test può variare anche in maniera significativa, il valore predittivo positivo aumenterà mentre il valore predittivo negativo tenderà a diminuire. Dalle simulazioni fatte il test STANDARD F COVID-19 Ag (FIA) lavora bene sulla bassa prevalenza (quindi ottimo come test di screening), in cui l'alto valore predittivo negativo predice molto bene la negatività. Al contrario, il valore predittivo positivo è molto basso, quindi un risultato positivo non sarà attendibile, e, pertanto, la strategia adottata inizialmente imponeva la conferma di tutti i risultati positivi con test molecolare. Ne consegue che solo una minoranza di questi test di conferma molecolari saranno realmente positivi. Ad esempio, questo test è stato implementato in aeroporto: su circa 20.000 campioni analizzati, 336 (1.7%) sono risultati positivi al test STANDARD F COVID-19 Ag (FIA), e di questi solo il 40% sono stati confermati con test molecolare. L'esperienza acquisita ha portato ad evidenziare che la distribuzione delle conferme al test molecolare era in diretta correlazione con il cosiddetto indice COI (indice di lettura della fluorescenza), con un tasso di conferma che si avvicinava al 100% nei casi con indice COI alto. Si è quindi proposta una nuova strategia, al fine di contenere il numero dei test molecolari da effettuare, che consiste nel richiedere la conferma tramite test molecolare solo nei casi con COI > 10, in cui è dimostrato che la percentuale di conferma è superiore al 98,5% e il valore predittivo positivo è estremamente elevato. Si eviterebbero, pertanto, circa il 25% dei test di conferma.

La prof.ssa Capobianchi ha affrontato anche il capitolo dei test molecolari e antigenici su campioni di saliva, argomento di grande interesse in cui la facilità del campionamento si scontra con la complessità della fase analitica. Infatti la saliva non è un campione semplice da analizzare e al momento non ci sono test automatizzati validati su saliva. In un lavoro pubblicato di recente,⁷ il gruppo della prof.ssa Capobianchi ha validato il test molecolare Simplexa™ COVID-19 Direct su saliva, ottenendo una elevata concordanza con test effettuato su tampone nasofaringeo e lavaggio broncoalveolare.

Inoltre, si è appena concluso uno studio che ha valutato il test LUMIPULSE SARS-CoV-2 Ag FIA su saliva. Le prove di sensibilità hanno mostrato una sensibilità analitica pari a 1 pg/mL di antigene corrispondente a circa 20.000 copie di RNA/ml, quindi di poco inferiore al test eseguito su tampone nasofaringeo. Successivamente, 127 campioni di saliva sono stati analizzati con i test LUMIPULSE e Simplexa, con un moderato accordo tra i due (indice di concordanza $k = 0.51$). La sensibilità e la specificità del test antigenico rispetto al molecolare è risultata essere 52.4% e 94.1%, rispettivamente. Stratificando la sensibilità per valori CT, anche que-

sto test ha dimostrato di lavorare bene su cariche virali alte. Infine, modulando i risultati in base alla prevalenza, anche questo test si propone bene come test di screening (bassa prevalenza), grazie all'elevato valore predittivo negativo per bassi valori di prevalenza. La prof.ssa Capobianchi ha concluso sottolineando che, in generale, i test antigenici sono buoni test di screening e possono essere utili per ottimizzare e risparmiare l'uso dei test molecolari.

Il dott. Pistello ha condiviso i risultati di un'indagine di mercato sui test antigenici rapidi richiesta dalla Regione Toscana al fine di utilizzarli come screening nelle scuole. Tra 16 tests, sia immunocromatografici POC (point of care) che strumentali, valutati inizialmente su lisato virale inattivato a titolo noto e successivamente su campioni clinici positivi o negativi per SARS-CoV-2 con test molecolare, il test LUMIPULSE SARS-CoV-2 Ag FIA è risultato quello a migliore prestazione.

Il sistema è stato messo in campo per screening nelle scuole il 21 ottobre e, al 23 ottobre, erano stati eseguiti 672 test, di cui 42 positivi (6.25%). Questi ultimi sono stati verificati con sistema molecolare e, ad eccezione di due, sono risultati positivi.

Il prof. Sambri ha presentato l'esperienza e i progressi della rete dei laboratori in Emilia Romagna. Nella regione hanno osservato un aumento significativo dei nuovi casi positivi, dal 3% al 6% in poche settimane. Per tentare di dare risposta all'applicabilità dei test antigenici, è appena iniziato uno studio multicentrico prospettico che coinvolge il pronto soccorso di tre ospedali della Regione. È stato pianificato di arruolare circa 2.500 pazienti adulti che afferiscono a tali strutture con basso rischio di COVID-19. Ciascun paziente sarà sottoposto a tampone nasofaringeo e questo sarà analizzato in parallelo con test molecolare e sei test antigenici, strumentali e non. Uno studio simile è in programma nell'ambito del pronto soccorso pediatrico. L'obiettivo è trarre il maggior numero di informazioni possibile su questi test e il loro utilizzo in un contesto a bassa prevalenza.

Chiude l'incontro la dott.ssa Gritti, che riporta la propria esperienza sull'introduzione di un test molecolare point of care e successivo test antigenico, che si è svolta in una casa di cura con 168 posti letto. Questo lavoro è nato con l'obiettivo di rendersi autonomi nell'esecuzione e nell'analisi dei tamponi nasofaringei per situazioni di emergenza/urgenza. Il test molecolare è stato testato su 15 campioni (5 positivi e 10 negativi) ottenendo una bassa concordanza (56%) con

i test di riferimento eseguiti presso l'Istituto di Virologia di Milano. In seguito a questi risultati, si è pertanto deciso di implementare il test antigenico in chemiluminescenza LUMIPULSE, già descritto nelle precedenti relazioni. Si sono quindi ripetute delle prove di concordanza su 75 campioni ottenendo una sensibilità del 48% (con 18 falsi negativi) e una specificità del 100% (0 falsi positivi). Rielaborando i risultati in base al CT, la sensibilità saliva al 75% per CT inferiori o uguali a 35 mentre era del 22% per CT > 36.

Bibliografia di riferimento

1. Liotti FM, Menchinelli G, Marchetti S, Morandotti GA, Sanguinetti M, Posteraro B, Cattani P. Evaluating the newly developed BioFire COVID-19 test for SARS-CoV-2 molecular detection. *Clin Microbiol Infect* 2020;Jul 28:S1198-743X(20)30433-X.
2. Liotti FM, Menchinelli G, Lalle E, Palucci I, Marchetti S, Colavita F, La Sorda M, Sberna G, Bordini L, Sanguinetti M, Cattani P, Capobianchi MR, Posteraro B. Performance of a novel diagnostic assay for rapid SARS-CoV-2 antigen detection in nasopharynx samples. *Clin Microbiol Infect* 2020;Sep 23:S1198-743X(20)30583-8.
3. Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Nagakubo Y, Hosaka K, Amemiya K, Sueki H, Hayakawa M, Mochizuki H, Tsutsui T, Kakizaki Y, Miyashita Y, Yagi S, Kojima S, Omata M. Comparison of automated SARS-CoV-2 antigen test for COVID-19 infection with quantitative RT-PCR using 313 nasopharyngeal swabs, including from seven serially followed patients. *Int J Infect Dis* 2020;99:397-402.
4. https://www.iss.it/documents/20126/o/COVID+19_+test+v4k_last.pdf/gab1f211-7d88-bcb1-d454-cfed04aa8b05?t=1604483686312
5. Liotti FM, Menchinelli G, Marchetti S, Posteraro B, Landi F, Sanguinetti M, Cattani P. Assessment of SARS-CoV-2 RNA Test Results Among Patients Who Recovered From COVID-19 With Prior Negative Results. *JAMA Intern Med* 2020;Nov 12:e207570.
6. Mina MJ, Parker R, Larremore DB. Rethinking Covid-19 Test Sensitivity - A Strategy for Containment. *N Engl J Med* 2020; Sep 30. doi: 10.1056/NEJMp2025631.
7. Bordini L, Sberna G, Lalle E, Piselli P, Colavita F, Nicastrì E, Antinori A, Boumis E, Petrosillo N, Marchionni L, Minnucci G, D'Agostini E, Castilletti C, Locatelli F, Zumla A, Ippolito G, Capobianchi MR, On Behalf Of Inmi ReCOVeRI Study Group. Frequency and Duration of SARS-CoV-2 Shedding in Oral Fluid Samples Assessed by a Modified Commercial Rapid Molecular Assay. *Viruses* 2020 Oct 20;12(10):1184.