

QUELLO CHE IL CITTADINO DEVE SAPERE SU TAMPONI COVID-19 QUELLO CHE LE AUSL DEVONO DIRE

I test effettuati per la determinazione del virus che causa il COVID-19 sono principalmente tre ¹:

- Test del tampone (RT-PCR – presenza del virus)
- Test anticorpale (determinazione degli anticorpi IgG/IgM)
- Test rapido antigenico (presenza dell'antigene/proteina virale)

Test del tampone

si effettua attraverso il prelievo con tampone naso-faringeo di un campione di muco che viene poi analizzato mediante la tecnica in RT-PCR. ²

Questo metodo permette di evidenziare la presenza del virus (virus intero o frammenti), ma non di definire se il virus è funzionante, cioè se è in grado di replicarsi e causare la malattia nella persona positiva asintomatica, né definire la gravità o lo stadio della malattia se la persona è sintomatica (quindi non è un test diagnostico di malattia), né se la persona può essere contagiosa.

La presenza del virus, quindi in caso di test positivo, deve indirizzare il medico verso un approfondimento diagnostico con altre analisi più specifiche per il COVID-19, in particolare se la persona è già sintomatica.

Il test in RT-PCR che si effettua oggi può dare falsi negativi dovuti alle numerose mutazioni subite dal virus nelle sequenze di riferimento utilizzate per il suo riconoscimento, in questo caso è molto importante che la persona che presenta dei sintomi che possono far sospettare il COVID-19, soprattutto le difficoltà respiratorie, faccia altri accertamenti con una certa urgenza per confermare o escludere la malattia. ³

Anche i falsi positivi sono possibili per due motivi: il primo è dovuto all'aumento della sensibilità del test necessario per riuscire a rilevare una bassa carica del virus nei pazienti asintomatici, ³ e il secondo alla commercializzazione di kit difettosi, in cui i controlli negativi sono risultati contaminati e quindi danno un risultato positivo anche nelle persone sane non contagiate. ⁴

Altre criticità relative al test in RT-PCR che possono portare a falsi risultati dipendono dalla modalità di esecuzione del prelievo e di esecuzione del test. ⁵

¹ <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/diagnostic-testing>

<https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2020&codLeg=73799&parte=1%20&serie=null>

https://amedeo.com/CovidReference04_it.pdf pag. 119-133

² https://portale.fnomceo.it/wp-content/uploads/2020/01/Allegato_2_ISS_.pdf

³ Watson J, Whiting PF, Brush JE.
Interpreting a covid-19 test result.
BMJ. 2020;369:m1808. Published 2020 May 12. doi:10.1136/bmj.m1808
<https://www.bmj.com/content/369/bmj.m1808.long>

⁴ Wang CYT, Buckley C, Bletchly C, Harris P, Whiley D.
Contamination of SARS-CoV-2 RT-PCR probes at the oligonucleotide manufacturer
[published online ahead of print, 2020 Aug 19]. Pathology. 2020;doi:10.1016/j.pathol.2020.08.002
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7437487/>

⁵ Lippi G, Mattiuzzi C, Bovo C, Plebani M.
Current laboratory diagnostics of coronavirus disease 2019 (COVID-19).
Acta Bio Med [Internet]. 2020May11 [cited 2020Sep.3];91(2):137-45
<https://www.mattioli1885journals.com/index.php/actabiomedica/article/view/9548>

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), Volume 58, Issue 7, Pages 1070–1076, eISSN 1437-4331, ISSN 1434-6621, DOI: <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0285>.
<https://www.degruyter.com/view/journals/cclm/58/7/article-p1070.xml>

Wernike K, Keller M, Conraths FJ, Mettenleiter TC, Groschup MH, Beer M.

Per riuscire a dimostrare se una persona è un falso positivo è necessario procedere con l'esecuzione di un test più accurato da utilizzare come test di riferimento per l'RT-PCR.

Va detto che al momento il test in RT-PCR non è stato confrontato su un alto numero di campioni con un test di riferimento, che in questo caso può essere identificato nel sequenziamento di nuova generazione (NGS). Questa tecnologia molto avanzata consente di determinare l'intera sequenza del virus (a differenza dell'RT-PCR che ne determina dei frammenti rappresentativi), di valutarne le mutazioni acquisite e il numero di copie. Quindi si tratta di una metodica molto sensibile e specifica, anche se sono possibili falsi negativi in caso di un numero di copie molto basso o di un prelievo del campione non ottimale.

Per ovviare al problema dei falsi negativi anche con l'NGS e dei falsi positivi con l'RT-PCR sarebbe utile crescere in coltura il virus per valutare se è in grado di replicarsi.

In questo caso l'analisi da fare dovrebbe prevedere la messa in coltura del campione e l'analisi con sequenziamento a intervalli di tempo (cinetica di replicazione). Se il virus è in grado di replicarsi, la crescita è esponenziale e quindi si può affermare che il virus non solo è presente ma è anche funzionante cioè è in grado di infettare le cellule e danneggiarle.⁶

Questa procedura è fondamentale per risolvere la questione della trasmissione del virus (shedding) negli asintomatici sani.

Il test del tampone e lo studio della cinetica di replicazione con coltura e sequenziamento devono essere effettuati in un laboratorio di biosicurezza 3 autorizzati per la manipolazione del virus. I laboratori in cui si

Pitfalls in SARS-CoV-2 PCR diagnostics

[published online ahead of print, 2020 Jun 14]. *Transbound Emerg Dis.* 2020;10.1111/tbed.13684. doi:10.1111/tbed.13684
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7323359/>

Tahamtan A, Ardebili A.

Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results.

Expert Rev Mol Diagn. 2020;20(5):453-454. doi:10.1080/14737159.2020.1757437

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7189409/>

<https://www.cebm.net/covid-19/what-tests-could-potentially-be-used-for-the-screening-diagnosis-and-monitoring-of-covid-19-and-what-are-their-advantages-and-disadvantages/>

Wishaupt, J. O., Ploeg, T. V. D., Smeets, L. C., Groot, R. D., Versteegh, F. G. A., & Hartwig, N. G. (2017).

Pitfalls in interpretation of CT-values of RT-PCR in children with acute respiratory tract infections. *Journal of Clinical Virology*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.02.010>

<https://covid19.elsevierpure.com/da/publications/pitfalls-in-interpretation-of-ct-values-of-rt-pcr-in-children-wit>

⁶ Nyayanit DA, Sarkale P, Baradkar S, et al.

Transcriptome & viral growth analysis of SARS-CoV-2-infected Vero CCL-81 cells

[published online ahead of print, 2020 Jul 30]. *Indian J Med Res.* 2020;10.4103/ijmr.IJMR_2257_20. doi:10.4103/ijmr.IJMR_2257_20

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32773420/> (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32773420/>)

Banerjee A, Nasir JA, Budyłowski P, et al.

Isolation, Sequence, Infectivity, and Replication Kinetics of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2.

Emerg Infect Dis. 2020;26(9):2054-2063. doi:10.3201/eid2609.201495

https://www.researchgate.net/publication/340603961_isolation_sequence_infectivity_and_replication_kinetics_of_SARS-CoV-2

Liu Z, Zheng H, Lin H, et al.

Identification of Common Deletions in the Spike Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2.

J Virol. 2020;94(17):e00790-20. Published 2020 Aug 17. doi:10.1128/JVI.00790-20

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7431800/pdf/JVI.00790-20.pdf>

Ogando NS, Dalebout TJ, Zevenhoven-Dobbe JC, et al.

SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology

[published online ahead of print, 2020 Jun 22]. *J Gen Virol.* 2020;10.1099/jgv.0.001453. doi:10.1099/jgv.0.001453

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001453/sidebyside>

Milewska A, Kula-Pacurar A, Wadas J, et al.

Replication of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Human Respiratory Epithelium.

J Virol. 2020;94(15):e00957-20. Published 2020 Jul 16. doi:10.1128/JVI.00957-20

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7375387/> (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7375387/>)

manipola il campione (estrazione, coltura) e quelli in cui si effettua il test in RT-PCR o NGS possono anche essere diversi.

Qualora si intenda contestare la validità del test (es. sospetto di falso positivo) è necessario richiedere al laboratorio che ha già svolto l'analisi che vengano fornite le seguenti informazioni riguardo il kit utilizzato:

- metodica usata per l'estrazione del campione e l'RT-PCR (sequenza della Spike di riferimento, primers, sonde, scheda tecnica del kit),
- produttore del kit,
- dettagli della validazione del metodo con controlli positivi e negativi
- dettagli dei controlli qualità sul test che permettano di verificare come è stata determinata la specificità, sensibilità, accuratezza e robustezza del metodo analitico
- modalità per valutazione del cut-off per la determinazione dei risultati positivi
- giustificazione della modalità di prelievo il tampone naso-faringeo rispetto al prelievo salivare⁷ o delle feci⁸

Riguardo il laboratorio di analisi:

- autorizzazione da parte delle autorità competenti a svolgere l'analisi sul virus SARS-Cov-2
- strumenti utilizzati per la determinazione mediante RT-PCR
- certificazione/ accreditamento del sistema qualità del laboratorio

Per la conferma del risultato è necessario procedere come visto sopra:

- Sequenziamento in NGS qualora si intenda contestare la presenza del virus (asintomatico sano) o l'assenza (sintomatico con complicazioni che potrebbero far sospettare il COVID-19)
- Sarebbe opportuno richiedere una cinetica di replicazione (sequenziamento con coltura) in caso di prolungata positività del test con bassa carica virale.

⁷ Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs
Anne Louise Wyllie, et al
medRxiv 2020.04.16.20067835; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.20067835>
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.16.20067835v1>

Iwasaki S, Fujisawa S, Nakakubo S, et al.
Comparison of SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swab and saliva.
J Infect. 2020;81(2):e145-e147. doi:10.1016/j.jinf.2020.05.071
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7270800/>

⁸ Wang X, Zheng J, Guo L, et al.
Fecal viral shedding in COVID-19 patients: clinical significance, viral load dynamics and survival analysis
[published online ahead of print, 2020 Aug 28]. Virus Res. 2020;198147. doi:10.1016/j.virusres.2020.198147
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7455175/>