"Risultati dei test immunocromatograficirapidi per la rilevazione anticorpi SARS-CoV2 nella città metropolitana di Genova nell'aprile 2020"

Gaggioli Germano (1), Brignole Michele (2), Morgavi Paola (1), Alessia Bondanza (1), Federico Grifoni (3), Maria Vittoria Mallucci (3), Antonio Zampogna (4), Vena Antonio (5), Bassetti Matteo (5)

1) Laboratorio indipendente analisi cliniche "Casa della Salute, Genova"
2) Comitato Assistenza Malati Tigullio
3) Medico in formazione in Medicina Generale
4) Federazione Italiana Medici di Medicina Generale, sez. Tigullio
5) Cattedra malattie infettive Ospedale San Martino Genova

Indirizzo per la corrispondenza:
Germano Gaggioli, gaggioligermano@gmail.com

Abstract

Scopo. Il test immunologico cromatografico qualitativo (TICQ) a flusso laterale è in grado di rilevare nel sangue umano gli anticorpi specifici IgG e IgM per il virus Covid-19. Tali test hanno una buona sensibilità e specificità, sono facili da eseguire, sono a basso costo e pertanto sono idonei per una valutazione epidemiologica di ampie popolazioni di soggetti. Scopo dello studio è stato quello di eseguire una indagine nella popolazione non affetta da forma manifesta di infezione da Covid-19 nella città metropolitana di Genova.

Metodo. Abbiamo analizzato la risposta al TICQ in una popolazione consecutiva di soggetti che si sono sottoposti volontariamente al test nel periodo dal 24 marzo al 30 aprile 2020, suddivisi in: a) popolazione generale asintomatica; b) personale sanitario di residenze sanitarie assistenziali (RSA) e personale sanitario ospedaliero; c) ospiti anziani di residenze sanitarie assistenziali (RSA). Inoltre ai soggetti della popolazione generale è stato richiesto di rispondere ad un questionario sulla presenza o meno di sintomi sospetti pregressi o fattori di rischio di contagio (contatto con pazienti positivi Covid-19).

Risultati. Abbiamo eseguito il test a 4694 soggetti di età media di 59 anni (range 11-104), 64% femmine. Globalmente il TICQ è risultato positivo in 765 soggetti (16%). Gli ospiti delle RSA hanno evidenziato una positività al TICQ significativamente più elevata rispetto la popolazione generale e rispetto la popolazione sanitaria (25% vs 14% e 13% rispettivamente con $p<0.0001$). I soggetti con sintomi pregressi o che avevano avuto contatto con soggetti Covid-19 hanno una positività significativamente più elevata rispetto a chi non aveva tali caratteristiche (18% vs 11%, $p=0.007$). Infine, vi è stata una netta differenza geografica con prevalenza di test positivi fra gli abitanti dell'area di ponente (Genova centro) rispetto a quelli del levante (Tigullio) per tutti i sottogruppi, $p=0.0001$

Conclusioni. Una percentuale minoritaria, ma consistente, della popolazione della città metropolitana di Genova ha sviluppato una risposta anticorpale al virus SARS-CoV2, con cui è venuta a contatto entro il mese di aprile 2020. Estrapolando i nostri dati alla popolazione totale, stimiamo che circa 120.000 abitanti (il 14% della popolazione) abbiamo contratto l'infezione. Un'ampia variabilità della prevalenza anticorpale è presente in base a esposizione al rischio di contagio.

Parole chiave: SARS-CoV-2, Covid-19, RT-PCR, striscia immunocromatografica sierologia, anticorpi IgMIgG

Introduzione

In dicembre 2019, a Wuhan, Hubei, in Cina, è stato isolato un nuovo agente patogeno virale della famiglia dei coronavirus. Tale virus, SARS-CoV-2, è responsabile della malattia denominata Corona Virus Disease 19(Covid-19) (1,2). I sintomi più comuni di COVID-19 sono febbre, tosse secca, astenia, produzione o meno di espettorato, dispnea, faringodinia, mialgia, cefalea, congiuntivite, rinite, ageusia o disgeusia, anosmia, congestione nasale e diarrea. I sintomi della malattia solitamente iniziano gradualmente e sono lievi nella maggior parte dei casi. Alcune persone si infettano ma non sviluppano alcun sintomo. La maggior parte delle persone (circa l'80%) guarisce dalla malattia senza un trattamento speciale. Circa una persona su sei che si infetta conCovid-19 si ammala gravemente e sviluppa difficoltà respiratorie (2,3); la complicazione maggiore è la polmonite virale interstiziale (tipicamente a “vetro smerigliato”) che in taluni casi può comportare una sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) e una tempesta di citochine, che possono portare alla morte del soggetto colpito (4). Le persone anziane e quelle con comorbidità preesistenti, come cardiopatia strutturale, diabete, BPCO, obesità, e tabagismo hanno maggiori probabilità di sviluppare una malattia grave (5). Il tasso di letalità a tutt’oggi non è stato ancora ben definito ma comunque sembra essere compreso ca tra lo 0.6 % e il il 2%. Il Covid-19 è trasmesso tramite particelle respiratorie che vengono espirate dalle persone infette tramite tosse, starnuti o parlando. Queste goccioline possono essere inalate o ingerite direttamente da altre persone o possono contaminare le superfici che rimangono poi infettive anche per diversi giorni. Si stima che il periodo di incubazione del Covid-19 vada da 1 a 14 giorni, durante i quali le persone potrebbero essere già infettive senza mostrare i sintomi di malattia (6). Nonostante la mortalità sia relativamente bassa, la trasmissibilità di Covid-19 invece si è dimostrata assai elevata. Simile a precedenti focolai di infezione da coronavirus nell'uomo, ad es 2003 SARS - CoV3, 4 e 2012 infezione da MERS -CoV, 5 SARS -CoV- 2, tale nuovo virus si è rapidamente diffuso come pandemia in Europa e in molte parti del mondo comportando, oltre che mortalità, disagio socio economico importante e difficoltà di gestione delle strutture sanitarie per l’iperaflusso di molti soggetti che si sono ammalati contemporaneamente in un breve periodo temporale (7).

La presenza del virus viene ricercata mediante tampone molecolare (reazione a catena della polimerasi a trascrizione inversa RT-PCR) che consiste nel rilevare fisicamente i filamenti di RNA del virus in zone anatomiche ben definite (orofaringe, cavità nasali). Il tampone molecolare è attualmente considerato lo "standard di riferimento" nella diagnosi di Covid-19 (8). Nonostante la RT-PCR sia ampiamente adottata come metodo diagnostico standard in Cina e nel mondo, la limitazione di questa tecnologia è evidente. Infatti, mentre i pazienti positivi ai test RT-PCR possono essere diagnosticati come infezione da Covid-19, quelli negativi ai test non possono escluderne la possibilità in quanto l’infezione potrebbe essere già superata al momento del prelievo e pertanto il soggetto risultare negativo al test (9). Inoltre, sono state descritte risposte falsamente negative al test.

Al contrario del test molecolare, i test sierologici consistono nel rilevare su siero plasma o su sangue intero la presenza di anticorpi (immunoglobuline) specifici Covid-19 per mezzo di un prelievo di sangue capillare da un dito o da un acceso venoso. Tra i vari metodi di rilevamento sierologico, la striscia immunocromatografica a base di oro colloidale ha permesso di fornire un approccio diagnostico supplementare per i pazienti con infezione da Covid-19. Tale test consiste in

un immunodosaggio cromatografico a flusso laterale per l'individuazione qualitativa (TICQ) di IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 (Covid-19) in sangue intero, siero, oppure plasma umani. Essendo un test qualitativo, esso non è in grado di determinare la concentrazione di anticorpi nel campione. Tuttavia, esso è un test rapido (il risultato è evidenziato entro 15 minuti), a basso costo, di semplice esecuzione e, come tale, adatto alla valutazione di ampie popolazioni di soggetti. Tale test è stato valutato per quanto riguarda la possibilità di reazioni crociate ad altri virus ad es virus dell'influenza di tipo A, al virus dell'influenza di tipo B, anti-RSV, anti-adenovirus, anti-HBsAg,anti-T. pallidum, anti-H. pylori, anti-HIV e anti-HCV altri virus famiglia coronavirus e SARS e non è stata osservata reattività incrociata anche se non si può escludere in assoluto una reazione crociata nei confronti di virus di famiglia affini al Covid-19 o di altri virus (10,11). Nel loro complesso i test cromatografici hanno evidenziato in vari studi una sensibilità media di 80% -85% e una specificità di 95% (12). La sensibilità aumenta con l'aumento della distanza temporale dal contatto con il virus fino al 100%. In uno studio (12), eseguito in pazienti veri positivi, la sieroconversione per IgG e IgM fu riscontrata nel 30% dei pazienti dopo 2-4 giorni dall'inizio dei sintomi ed aumentò fino al 100% a partire dal 20-22 giorno. Dal mese di marzo 2020 sono stati messi in commercio numerosi Kit qualitativi cromatografici approvati dal Ministero della Salute.In conclusione, i test sierologici non sono in contrapposizione al test molecolare, ma piuttosto essi vanno intesi come strumento per una stratificazione epidemiologica della malattia.

Scopo dello studio è stato quello di eseguire una indagine nella popolazione non affetta da forma manifesta di infezione da Covid-19 nella città metropolitana di Genova.

Metodo

Dal 24 marzo al 30 aprile 2020 abbiamo sottoposto al TICQ rapido (Biosynex Covid-19 BSS, SclavoDiagostics International, Italia) una popolazione consecutiva di soggetti che si sono sottoposti volontariamente al test nel mese di aprile 2020, suddivisi in: a) popolazione generale asintomatica; b) personale sanitario di residenze sanitarie assistenziali (RSA) e personale sanitario ospedaliero (28 in Genova centro e 18 in Tigullio); c) ospiti anziani di residenze sanitarie assistenziali (RSA). Inoltre, ai soggetti della popolazione generale è stato richiesto di rispondere ad un questionario sulla presenza o meno di sintomi sospetti pregressi o fattori di rischio di contagio (contatto con pazienti positivi Covid-19).

Tutti i soggetti avevano consentito di essere sottoposti al test mediante un consenso informato; l'esame prevedeva il prelievo ematico, la centrifugazione del sangue in toto e l'analisi del siero oppure il prelievo di sangue capillare periferico da un dito della mano; un sanitario dedicato utilizzava per tutti i soggetti lo stesso Kit immunocromatografico ed inseriva 1 gtt di siero centrifugato prelevato dalla provetta del Paziente oppure 1 gtt di sangue periferico capillare da un dito della mano e 1 gtt di reagente inserendoli nell'apposita fessura "della saponetta del Kit" (**Figura 1**); il sanitario poi valutava in 15 minuti la risposta al test; durante il test, la miscela siero/sangue e reagente migrava poi lungo la membrana cromatograficamente per azione capillare e reagiva con le eventuali IgM e le IgG antiumane nella regione della linea di test 'IgM' e 'IgG' della membrana (**Figura 2**). La presenza di una linea colorata nella regione della linea del test 'IgM' e/o 'IgG' indicava un risultato positivo. L'assenza di una linea colorata nella regione della linea del test 'IgM' e/o 'IgG' indicava un risultato negativo. La presenza di una linea colorata nella

regione della linea di controllo (C) evidenziava il controllo procedurale interno indicando che è stato utilizzato il corretto volume di campione e che la migrazione sulla membrana è avvenuta correttamente. Importante sottolineare che l'intensità del colore nella regione della linea del test 'IgG' ed 'IgM' poteva variare a seconda della concentrazione di anticorpi anti-SARS-CoV-2 nel campione. Pertanto, qualsiasi sfumatura di colore nell'area della linea del test per "IgM" o "IgG" come è ben specificato dalla letteratura (13) è stata considerata come indicativa di un risultato positivo. (**Figura 2**). È stato valutato anche il test di riproducibilità immediata su 400 soggetti e tali test hanno dimostrato una riproducibilità nel 99% dei casi.

Venivano esclusi dallo studio i soggetti Covid-19 accertati mediante PCR o comunque Ospedalizzati per sintomi clinicamente riferibili o sospetti ad infezione Covid-19.

Risultati

In totale, abbiamo eseguito il test a 4694 soggetti di età media di 59 anni (range 11-104), 64% femmine (**Tabella 1**). Globalmente il TICQ è risultato positivo in 765 soggetti (16%). Gli ospiti delle RSA hanno evidenziato una positività al TICQ significativamente più elevata rispetto la popolazione generale e rispetto la popolazione sanitaria (25% vs 14% e 13% rispettivamente con $p<0.0001$) (**Figura 3**). I soggetti con sintomi pregressi o che avevano avuto contatto con soggetti Covid-19 hanno una positività significativamente più elevata rispetto a chi non aveva tali caratteristiche (18% vs 11%, $p=0.007$). (**Figura 4**) Infine, vi è stata una netta differenza geografica con prevalenza di test positivi fra gli abitanti dell'area di ponente (Genova centro) rispetto a quelli del levante (Tigullio) per tutti i sottogruppi, $p=0.0001$ (**Tabella 2**)

Discussione e conclusioni

I risultati di questo studio dimostrano che una percentuale minoritaria, ma consistente, della popolazione della città metropolitana di Genova ha sviluppato una risposta anticorpale al virus SARS-CoV2, con cui è venuta a contatto entro il mese di aprile 2020. Un'ampia variabilità della prevalenza anticorpale è presente in base a esposizione al rischio di contagio. La città metropolitana di Genova consta di 862.000 abitanti. Estrapolando i nostri dati alla popolazione totale, stimiamo che circa 120.000 abitanti (il 14% della popolazione) abbiano contratto l'infezione in un periodo di circa 2 mesi dall'inizio della pandemia fino ad aprile.

Nel periodo della nostra valutazione (dal 24 marzo al 30 aprile 2020), nella città metropolitana di Genova, sono stati diagnosticati 5095 pazienti Covid-19 e sono decedute 724 persone (dati istituto Superiore di Sanità [14]). I dati ISTAT rilevano che nel periodo che va dal 20 febbraio al 31 marzo 2020 sono decedute in totale 3234 persone vs 2364 persone (+870) dello stesso periodo di una media degli anni 2015-2019, pari ad un aumento del 37%. I suddetti dati evidenziamo l'impatto reale della mortalità diretta od indiretta legata all'infezione relativa al Covid-19. Pertanto, solo un percentuale minoritaria di soggetti, pari al 4.2% (5095/120.000) ha avuto una manifestazione clinica di gravità sufficiente a ricorrere al Servizio Sanitario pubblico ed una percentuale ancora minore è morta (870 persone pari a 0.7%).

I nostri risultati sono confrontabili con altri in letteratura. A Vò Euganeo (15),dal 21 febbraio, data del primo caso riscontrato al 8 marzo 2020, si sono riscontrati 81 casi su 2812 abitanti, pari ad una incidenza di 2.9% in un periodo di 15 giorni. Nell'epidemia sulla nave Costa Splendid, durante il periodo di quarantena nel porto di Yokohama (fonte Il Secolo XIX), su 3700 persone fra equipaggio e turisti, vi furono 712 affetti da infezione, pari al 19%.

I dati della letteratura sono concordi nel definire i pazienti fragili (soprattutto anziani con comorbidità degenti delle RSA) come i più a rischio di contrarre il Covid-19 e ad elevata mortalità. Nel nostro studio, la prevalenza di infezione fra gli ospiti anziani di RSA è stata del 24% (variabile da 16% nell'area con minore prevalenza nella popolazione generale a 36% nell'area a maggiore prevalenza nella popolazione generale). Tale prevalenza è minore di quella riscontrata nelle case di riposo della contea di King, Washington, USA che fù ben del 54% (16).

Il punto di forza di questo studio è che esso è il primo eseguito per la città di Genova in un campione sufficientemente numeroso ed uno dei primi in Italia. Il limite principale è un bias potenziale di campionamento per cui il campione non è rappresentativo della popolazione generale. Pertanto, i risultati dovranno essere verificati con quelli dello studio epidemiologico italiano dell'Istituto Superiore di Sanità, attualmente in corso. Comunque, il nostro studio dimostra l'ampia variabilità di risposte positive, variabile da 11% in chi non ha avuto contatti con soggetti affetti fino al 36% dei soggetti fragili ospiti delle RSA. Il personale sanitario ha avuto una probabilità intermedia. Infine, è in qualche modo inaspettata la notevole differenza di positività fra due aree contigue, il centro ed il Tigullio. A parte la casualità, possiamo ipotizzare che il rischio di infezione è tanto più grande quanto più vi è vicinanza fisica della popolazione tipica dei grandi aggregati di popolazione rispetto a zone, quali il Tigullio, in cui vi è maggiore possibilità di distanziamento sociale. Lo stesso è avvenuto in altre grandi città, come Milano, Madrid e New York, rispetto alle relative aree periferiche.

Bibliografia

1) WHO. Novel coronavirus—China. http://wwwwhoint/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/. Accessed January 12, 2020.
2) Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020; 382: 727- 733.
3) Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003; 348(20): 1953- 1966.
4) Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, et al. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2003; 362(9380): 263- 270.
5) Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223): 497- 506.
6) Rothe C, Schunk M, Sothmann P, et al. Transmission of COVID-19 Infection from an asymptomatic contact in Germany. *N Engl J Med*. 2020; 382(10): 970- 971.

7) Bogoch, Watts A., Thomas-Bachli A., Huber C., Kraemer M.U.G., Khan K. Pneumonia of unknown etiology in wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. J. Trav. Med. 2020

8) Chan JF, Kok KH, Zhu Z. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. EmergMicrobesInfect. 2020;9:221

9) Jasper Fuk-Woo Chan, Cyril Chik-Yan Yip, et al. Improved Molecular Diagnosis of covid by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated *In Vitro* and with Clinical Specimens . J Clin Microbiol. 2020 May; 58(5): Published online 2020 Apr 23. doi: 10.1128/JCM.00310-20

10) Wang C, Yu H, Horby PW, et al. Comparison of patients hospitalized with influenza A subtypes H7N9, H5N1, and 2009 pandemic H1N1. *Clin Infect Dis*. 2014; 58(8): 1095- 1103.

11) Lee HK, Lee BH, Seok SH, et al. Production of specific antibodies against SARS-coronavirus nucleocapsid protein without cross reactivity with human coronaviruses 229E and OC43. *J Vet Sci*. 2010; **11**(2): 165- 167.

12) Long QX, Liu BZ, Deng HJ, et al Antibody response to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. Nature medicine. doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1

13) Li Z[1], Yi Y[2], Luo X[3], Xiong N[4], et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. J Med Virol. 2020 Feb 27. doi: 10.1002/jmv.25727.

14) Dati ufficiali Istituto Superiore di Sanità (ISS) Sole 24 ore online

15) Lavezzo E, Franchin E, Ciavarella C, et al. Suppression of COVID-19 outbreak in the municipality of Vo', Italy medRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2020.04.17.20053157.t

16) Mc. Michael TM[1], Currie DW[1], et al Epidemiology of Covid-19 in a Long-Term Care Facility in King County, Washington. N Engl J Med. 2020 Mar 27. doi: 10.1056/NEJMoa2005412.

Figura 1. “Saponetta” TICQ

Figura 2. Varie risposte al TICQ. Da sinistra a destra: risposta positiva IgG/IgM, risposta “debole” IgM, risposta negativa, risposta “debole” IgG, riposta IgG, risposta IgM

Figura 3

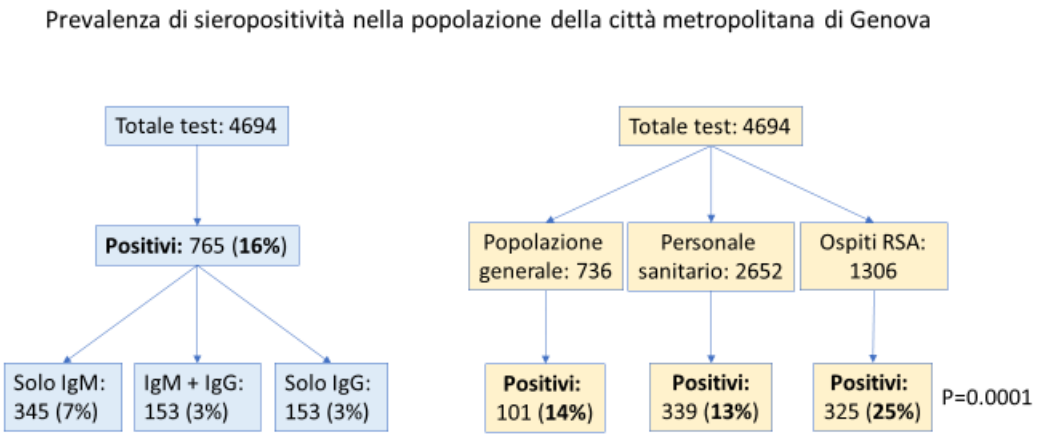

Figura 4

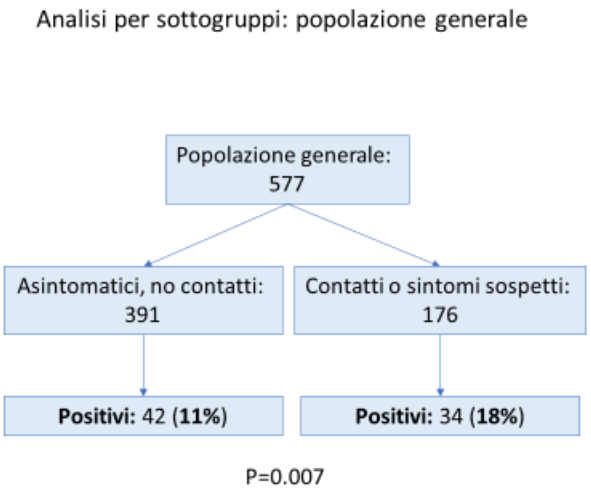

Tabella 1. Caratteristiche ella popolazione

	Totale N=4694	Popolazione generale N=736	Personale sanitario N=2652	Ospiti RSA N=1306
Età, media (range)	59 (11-104)	47 (11-79)	45 (20-67)	87 (66-104)
Femmine %	64%	50%	67%	75%

Tabella 2. Analisi per sottogruppi: distribuzione geografica

	Genova centro		Tigullio		p
	Numero test	Positività	Numero test	Positività	
Popolazione generale	445	147 (16%)	291	31 (11%)	0.0001
Personale sanitario	666	193 (29%)	1986	146 (7%)	
Ospiti RSA	600	213 (36%)	706	112 (16%)	