

Studio Clinico Comparativo tra un nuovo test antigenico rapido con metodo Elisa, antigenico rapido Lateral Flow Cassette e RT-PCR.

Argomento dello studio:

RT-PCR molecolare vs test antigenico rapido Lateral Flow Cassette vs nuovo test rapido antigenico utilizzando il metodo ELISA.

Di Domenico, M. (1); Boccellino, M. (1); Vercellotti, T. (2); Di Gaudio, F. (3); Rebaudi, A. (4); Internicola, P. (5); Bettini, C. (6); Salzano, N. (7), Castrianni, D. (7); Marotta, A. (8); De Rosa A. (8).

(1) Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli - Italia / Dipartimento di Medicina di Precisione.

(2) Università di Genova - Italia / Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostica Integrata.

(3) Assessorato alla Salute della Regione Sicilia - Italia / CRQ (Centro Controllo Qualità Laboratorio Regionale)

(4) Genova - Italia / Presidente Bio.C.R.A. (Biomaterials Clinical-Histological Research Association).

(5) Ospedale "Santa Maria della Pietà", Casoria (NA) - Italia / Servizio di Anestesia e Rianimazione

(6) Ospedale "Santa Maria della Pietà", Casoria (NA) - Italia / Laboratorio e Servizio Analisi Cliniche

(7) Ministero della Salute - USMAF SASN - Napoli - Italia

(8) Università della Campania "Luigi Vanvitelli" Napoli - Italia / Dipartimento Multidisciplinare di Specialità Medico-Chirurgiche e Odontoiatriche

Referente:

Dr. Alberto Rebaudi Piazza della Vittoria 8 Genova 16121

e-mail: alberto.rebaudi@gmail.com

Tel Mobile +393355930566

RIASSUNTO

Premessa: la necessità di test affidabili e rapidi per l'individuazione tempestiva di individui con infezione acuta da SARS-CoV-2 è sempre più pressante.

Scopo di questo lavoro è presentare i risultati di uno studio clinico comparativo indipendente sull'efficacia diagnostica (sensibilità e specificità) ed efficienza clinica (rapidità e facilità d'uso) di un nuovo test COVID-19 di nuova generazione: "Portable COVID-19 Antigen Lab Test by Stark", nato come spin-off di una ricerca intensiva sulla diagnosi precoce del cancro orale, utilizzando un campione citologico linguale e di saliva da cui vengono estratti e processati i marcatori endomembranici con il metodo ELISA. Tale nuovo test COVID-19 con metodo Elisa è rappresentato da un laboratorio portatile che in meno di trenta minuti consente la diagnosi attraverso una reazione chemio-colorimetrica su uno stick diagnostico. Tale test è stato comparato con due test diagnostici più comunemente utilizzati in Italia per la diagnosi di malattia da SARS -di CoV-2 durante l'attuale pandemia.

Valutazioni cliniche eseguite: Questo studio, è stato eseguito in più fasi in tre diverse strutture sanitarie a Palermo e Napoli. Una prima fase è stata eseguita su pazienti afferenti a uno screening a Palermo presso il Centro Militare allestito dall'Esercito Italiano alla Fiera del Mediterraneo in una procedura di screening autorizzata dall'Assessorato alla Salute della Regione Sicilia. Questa fase ha confrontato 493 test antigenici rapidi SARS-CoV-2 (Stark) con test rapidi antigenici Lateral Flow Cassette (Abott) ai quali sono stati successivamente eseguiti test SARS-CoV-2 utilizzando la tecnica RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Testing). Inoltre in una fase successiva è stata effettuata una valutazione su 63 persone: 40 persone asintomatiche presso gli Uffici Marittimi, Aerei e Sanitari di Frontiera uniti al personale dei Servizi Sanitari per la Navigazione, Marittimo e dell'Aviazione Civile (USMAF-SASN) del Ministero della Salute di Napoli, 14 pazienti ricoverati presso l'Ospedale Camilliani di Casoria (NA) con Covid in fase acuta, e 9 volontari scelti dal personale dello stesso ospedale, sui quali sono stati eseguiti contemporaneamente 3 test diversi: test antigenico rapido SARS-CoV-2 (Stark) con metodo ELISA, il test antigenico rapido Lateral Flow Cassette (Abbott) e il test RT-PCR SARS-CoV-2.

Risultati: Questo studio, condotto da diversi operatori e in tre diverse strutture sanitarie, ha permesso di valutare i risultati di sensibilità diagnostica comparativa in un gran numero di pazienti sintomatici e asintomatici. La performance diagnostica del nuovo "Portable COVID-19 Antigen Lab Test by Stark" è stata confrontata con quella dei due test più comunemente utilizzati in Italia per combattere la pandemia (antigenico rapido e molecolare) con i seguenti risultati: - Tutti e tre i test hanno dato la stessa diagnosi positiva quando la carica virale era alta - La massima efficacia diagnostica del nuovo test Stark si è riscontrata in pazienti asintomatici. Questo ha permesso di ridurre il gap nella rilevazione della presenza del virus nel cluster di popolazione maggiormente responsabile della persistenza del pandemia (come ampiamente descritto in letteratura). Nello studio sono state valutate la sensibilità e la specificità del test antigenico rapido SARS-CoV-2 (Stark). Si è riscontrata una specificità del 95,92%, mentre la sensibilità del test eseguito con campioni RT-PCR con soglia di ciclo <25, corrisponde al 100%.

Conclusioni: la sensibilità e la specificità del test antigenico rapido basato sul metodo ELISA sono paragonabili al test RT-PCR. Il test antigenico Stark rappresenta quindi

un'alternativa valida, rapida e di facile utilizzo da eseguire per la differenziazione dei soggetti infettati da SARS-CoV-2 da soggetti non contagiosi.

INTRODUZIONE

L'infezione da coronavirus SARS-CoV-2, iniziata a Wuhan, in Cina, nel gennaio 2020 (1,2), si è diffusa in tutto il mondo e dal 28 febbraio 2021 ha infettato 125.000.000 di persone, provocando 2.740.000 morti (3). La sindrome respiratoria acuta si è manifestata come una malattia altamente infettiva, ecco perché l'Organizzazione mondiale della sanità l'ha dichiarata un'emergenza sanitaria pubblica di interesse internazionale il 30 gennaio 2020 (4). Nel tentativo di impedire la diffusione del virus, i governi di molti paesi hanno imposto misure di salute pubblica efficaci, fin dalla fase iniziale della pandemia. In combinazione con restrizioni individuali alla libertà, queste si sono dimostrate particolarmente utili ma a volte difficili da attuare.

Alcune nazioni asiatiche che avevano già sperimentato epidemie virali in passato hanno adottato con successo nuovi sistemi di tracciabilità digitale, che hanno permesso di limitare in modo significativo la diffusione delle malattie. Purtroppo nella maggior parte del mondo la battaglia contro il virus non è stata combattuta con queste stesse misure di prevenzione, ma piuttosto con misure terapeutiche non sempre tempestive o adeguate alla gravità delle complicanze, con conseguente enorme perdita di vite umane.

Il Servizio Sanitario Nazionale Italiano ha così adottato come principale misura di prevenzione attiva l'uso intensivo dei test diagnostici, eseguendo tamponi rinofaringei nei pazienti sintomatici, al fine di iniziare il trattamento nelle prime fasi dell'infezione e limitare l'insorgenza di complicanze tanto temute. Inoltre, questo screening è stato esteso anche a pazienti asintomatici, con triage positivo, consentendo di identificare un gran numero di soggetti positivi che non erano consapevoli di essere portatori della malattia. La quarantena di quest'ultimo gruppo ha rappresentato e rappresenta attualmente la misura sanitaria più efficace per contenere le infezioni ed evitare il sovraffollamento degli ospedali.

Tuttavia, nonostante tutto ciò, siamo costretti a restare a guardare la continuazione della pandemia, con l'allarmante costo socio-economico che sembra destinato a continuare fino a quando la maggioranza della popolazione non sarà diventata immune al virus per naturale contagio e inseguito alla attuale campagna vaccinale in corso. Nella speranza che ciò avvenga presto, è importante migliorare gli strumenti per prevenire attivamente l'infezione e, in questo caso, migliorare i test utilizzati. Pertanto, lo scopo di questo lavoro è presentare i risultati di uno studio clinico comparativo sull'efficacia diagnostica (sensibilità e specificità) ed efficienza clinica (rapidità e facilità d'uso) dei due test diagnostici più comunemente utilizzati per la prevenzione e la pandemia SARS-CoV-2 confrontandoli ad un test di nuova generazione nato come spin-off di una ricerca intensiva sulla diagnosi precoce del cancro orale, utilizzando un campione sublinguale e di saliva da cui vengono estratti e processati i marcatori endomembranici con il metodo ELISA.

MATERIALI E METODI

Lo screening per la rilevazione dell'infezione da SARS-CoV-2 viene normalmente eseguito utilizzando test molecolari di laboratorio e test antigenici rapidi.

Test molecolare RT-PCR

Il test molecolare prevede il prelievo di un tampone nasofaringeo che deve essere processato in un laboratorio molecolare per 1 o 2 giorni. Il test RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) è il benchmark mondiale ed è quindi considerato il gold standard. Per quanto riguarda le attuali conoscenze, è la migliore approssimazione possibile dell'effettiva presenza o assenza della malattia; i risultati ottenuti con altri metodi dovrebbero quindi essere sempre riferiti a questo. È tuttavia importante sottolineare che il benchmark può includere anche evidenze biologiche e / o sintomatiche (5) che hanno validità diversa a seconda della fase di infezione durante la quale viene eseguita. Ad esempio, i test della saliva mostrano una positività che si verifica rapidamente e persiste nel tempo in modo più efficace rispetto ai campioni prelevati da aree diverse per il tampone RT-PCR.

Il test molecolare è una tecnica RT-PCR che consente la rilevazione dell'RNA del virus SARS-CoV-2 nel campione biologico. È infatti possibile identificare uno o più geni bersaglio del virus presenti nel campione biologico in modo altamente specifico e sensibile, e misurare la concentrazione iniziale della sequenza bersaglio. Di solito, i test RT-PCR mostrano risultati positivi da 1 a 2 giorni prima della comparsa dei sintomi e per le 2 o 3 settimane successive. Di conseguenza, è la prima scelta per i soggetti sintomatici per confermare la presenza della malattia e per i pazienti asintomatici per escludere l'infezione.

Recenti studi (7-8) hanno dimostrato che nella pratica clinica il test RT-PCR presenta una sensibilità diagnostica compresa tra il 60 e il 90% (93% per campioni di lavaggio broncoalveolare / 63% per tamponi rinofaringei) e una specificità diagnostica del 99% .

Test test antigenico rapido Lateral Flow Cassette.

Il test antigenico rapido Lateral Flow Cassette del flusso laterale (LFT) prevede il prelievo di un tampone nasofaringeo o di saliva. L'LFT ricerca la presenza di proteine virali tramite gli anticorpi policlonali presenti in un piccolo dispositivo noto come cassetta a flusso laterale. L'LFT può fornire risultato rapido lato paziente, in circa 15 minuti, contribuendo ad accelerare le misure preventive. Questo test è stato ampiamente utilizzato per i suoi risultati rapidi e convenienti, senza richiedere la presenza di personale sanitario.

Considerando che la finestra diagnostica di un LFT è stretta perché limitata al picco virale, la sua positività dovrebbe essere confermata da una RT-PCR molecolare, mentre se è negativa il test va ripetuto dopo 2-4 giorni secondo il provvedimenti di cui alla Circolare n. 32850 del 12/10/2020. Nel gennaio 2021, il Center for Disease Control (CDC) ha pubblicato uno studio clinico (6) che ha valutato l'efficacia del test antigenico rapido Lateral Flow Cassette. su 3450 pazienti. I risultati hanno mostrato:

Pazienti sintomatici: 64,2% di sensibilità diagnostica; 100% di specificità.

Pazienti asintomatici: 35,8% di sensibilità diagnostica; 99% di specificità.

Test antigenico rapido utilizzando il metodo ELISA: "Portable COVID-19 Antigen Lab Test di Stark"

Il test antigenico rapido Stark si basa sul metodo ELISA. Consiste nel processare un campione sublinguale e di saliva direttamente in un piccolo laboratorio portatile, delle dimensioni di un libro, che permette di fare una diagnosi rapida e precisa grazie alla sua elevata sensibilità e specificità. Il laboratorio portatile è un dispositivo diagnostico professionale in vitro (IVD) ad uso del personale sanitario che, semplicemente seguendo uno specifico tutorial, può effettuare una diagnosi in meno di trenta minuti.

Descrizione molto breve della procedura di laboratorio portatile:

Il prelievo sublinguale e di saliva viene prelevato in modo non invasivo, spazzolando con un metodo ripetibile la mucosa della cavità buccale e la parte superiore della lingua; viene processato a temperatura ambiente seguendo fasi specifiche partendo dall'estrazione di proteine virali dal lisato cellulare. Gli antigeni vengono quindi intercettati da un doppio sandwich di anticorpi policlonali e monoclonali, costituenti immunocomplessi che, insieme a sistemi di rilevamento di tipo enzimatico, attivano una reazione colorimetrica di positività al virus. Il risultato del test è sempre certo: negativo, positivo o nullo se non è stato eseguito correttamente. L'efficacia diagnostica è caratterizzata da una sensibilità analitica (LOD) pari a $3,7 \cdot 10^{-5}$ mol / ml virus SARS-CoV-2.

RISULTATI

Studio clinico comparativo

Nel gennaio 2021 è stato effettuato lo screening per valutare l'efficacia diagnostica del nuovo Test Rapido Antigenico utilizzando il metodo ELISA rispetto ai test più comunemente utilizzati dal Servizio Sanitario Nazionale Italiano. Lo studio clinico dei risultati ottenuti mirava a prevenire l'infezione di pazienti asintomatici e ad aiutare nella gestione clinica di pazienti sintomatici per SARS-CoV-2.

Lo studio ha esaminato i risultati ottenuti da uno screening diagnostico eseguito su 556 volontari asintomatici e sintomatici. Ogni soggetto è stato sottoposto ad un tampone nasofaringeo iniziale. Il campione biologico è stato trasferito in un laboratorio per i test molecolari, mentre un secondo tampone nasofaringeo è stato contemporaneamente prelevato per un test Lateral Flow Cassette. Infine, un terzo campione linguale e di saliva è stato prelevato dalla mucosa buccale e dalla parte superiore della lingua ed è stato utilizzato per il test rapido dell'antigene utilizzando il metodo ELISA (Stark).

Un primo gruppo di 493 soggetti asintomatici è stato testato a Palermo presso il centro militare italiano in una procedura di screening autorizzata dall'Assessorato alla Salute della Regione Sicilia.

I pazienti sono stati prima testati con un test antigenico rapido a flusso laterale (Lateral Flow Cassette - Abbott) e poi con il test Stark linguale e della saliva. Ogni qualvolta uno di questi due test è risultato positivo, è stato prelevato un ulteriore tampone per la RT-PCR molecolare.

- Il test rapido dell'antigene con il metodo ELISA (Stark) ha mostrato 422 negativi e 71 positivi, corrispondenti al 14,4%;
- Il test a flusso laterale (Abbott) ha mostrato 480 negativi e 13 positivi, corrispondenti al 2,6%.

La percentuale di positività per il periodo durante il quale è stato effettuato lo screening è

	Portable COVID-19 Antigen Lab Test (Stark) Results	Lateral Flow Test Results
Positive	71	13
Negative	422	480
Total	493	493

Table 1

stata compresa tra il 17,28% e il 18,25%, come risulta dai bollettini emessi dal Ministero della Salute. (Tabella 1)

Un secondo gruppo di 40 soggetti asintomatici è stato testato presso l'Ufficio USMAF-SASN del Ministero della Salute di Napoli, utilizzando un test a flusso laterale rispetto al nuovo test rapido dell'antigene con metodo ELISA, entrambi elaborati dai pazienti stessi. Un terzo gruppo di 23 soggetti è stato testato utilizzando ulteriori tamponi linguali e salivari con il test di nuova generazione utilizzando il metodo ELISA presso l'Ospedale Camilliani (Casoria, Napoli), che ha valutato anche la specificità e l'efficacia diagnostica utilizzando il test molecolare come gold standard. Di questi 23 soggetti, 14 erano ricoverati in unità di terapia sub-intensiva, erano tutti sintomatici quando esaminati e avevano una diagnosi clinica e radiografica confermata di COVID-19. I restanti 9 soggetti arruolati presso l'Ospedale Camilliani erano operatori sanitari asintomatici risultati negativi al test molecolare. Tutti i pazienti sintomatici erano risultati inizialmente positivi al test molecolare al ricovero ma successivamente erano risultati negativi anche se erano ancora in terapia sub-intensiva e in ossigenoterapia poiché i sintomi persistevano. Ciò è avvenuto due giorni prima dell'esecuzione del test rapido dell'antigene con il metodo ELISA. Questi soggetti sintomatici che hanno eseguito il test Stark sono risultati tutti positivi. Da questi pazienti è stato prelevato, sia un campione citologico linguale che di saliva per il test rapido con metodo antigenico rapido ELISA (STARK) e sia un tampone nasofaringeo per il test molecolare RT-PCR: Questi campioni sono stati prelevati contemporaneamente da tutti i 63 soggetti allo screening, mentre solo 40 soggetti hanno fatto un ulteriore tampone nasofaringeo prelevato per il test Lateral Flow Cassette (Tabella 2).

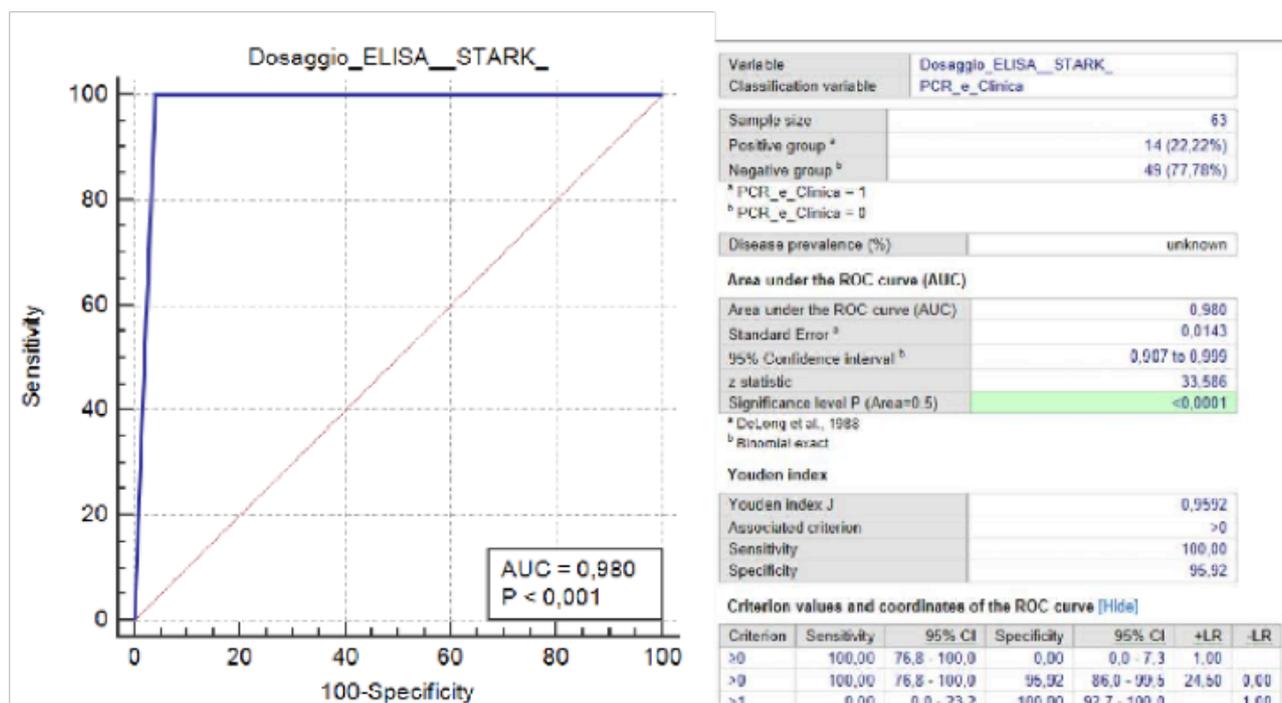
	PCR Test Results	Lateral Flow Test Results	Portable COVID-19 Antigen Lab Test (Stark) Results
Positive	3	3	14
Negative	60	37	49
Total	63	40	63

Table 2

I risultati mostrati nella tabella 2 indicano:

- test rapido dell'antigene con metodo ELISA. Positività per il virus SARS-CoV-2: 22,22%
- RT-PCR molecolare. Positività per il virus SARS-CoV-2: 4,8%

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il metodo dei calcolatori statistici MedCalc. Il risultato della PCR è stato utilizzato come gold standard e il quadro clinico è stato tracciato come una curva ROC. La determinazione della curva ROC (Figura 1) ha considerato la "positività" clinica di questi pazienti quando si includono i valori. Confrontando i risultati del test rapido dell'antigene utilizzando il metodo ELISA con i risultati del test PCR, la curva rivela una sensibilità del 100% e una specificità del 95,92%, con una AUC di 0,980 (Figura 1).



Come si può vedere nella Tabella 3, per 14 pazienti sintomatici, il test rapido antigene (Stark) utilizzando il metodo ELISA è risultato positivo per tutti i soggetti, mentre il test molecolare è risultato positivo solo in 3 pazienti.

I pazienti che erano sintomatici alla data dello screening sono stati ricoverati in ospedale con sintomi respiratori acuti COVID-19 e in particolare sono risultati negativi al test molecolare entro una media di due giorni.

I pazienti sintomatici erano stati testati con il test rapido dell'antigene utilizzando il metodo ELISA al termine dei loro sintomi, per valutare la possibile persistenza del virus.

CONCLUSIONI

Questo studio clinico, condotto da diversi operatori e in tre diverse strutture sanitarie indipendenti, ha permesso di valutare i risultati di sensibilità diagnostica comparativa in un gran numero di pazienti sintomatici e asintomatici. La performance diagnostica del nuovo "Portable COVID-19 Antigen Lab Test by Stark" è stata confrontata con quella dei

due test più comunemente utilizzati in Italia per combattere la pandemia (antigene molecolare e rapido) con i seguenti risultati:

- Tutti e tre i test hanno dato la stessa diagnosi positiva quando la carica virale era alta
- La massima efficacia diagnostica del nuovo test Stark si è riscontrata in pazienti asintomatici, che ha permesso di ridurre il gap nella rilevazione della presenza del virus nel cluster di popolazione maggiormente responsabile della persistenza della pandemia, come ampiamente descritto in letteratura.

I risultati clinici dello studio hanno confermato la sensibilità diagnostica del 100% e la

Screening at Camilliani Hospital and Ministry of Health							
	RT PCR		LATERAL FLOW		STARK TEST		
Results and Performance	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Total
Result of the test participant (n=63)	3	60	3	37	18	45	63
Symptomatic	3	11	0	0	14	0	
Asymptomatic	0	49	3	37	2	47	
Test/Clinical Performance (Fig 1)							
Participants							63
Symptomatic							14
Asymptomatic							14
Sensitivity							100%
Specificity							95.92%
P-value							<0.0001
Confidence Interval							95%

Table 3

specificità del 95,92%, con un intervallo di confidenza del 95% e un valore $P < 0,0001$. Gli stessi autori hanno concluso che disporre di un kit lato paziente che consenta una diagnosi rapida con la massima sensibilità rappresenta un nuovo paradigma nella lotta contro l'infezione SARS-CoV-2, accelerando un sicuro ritorno all'attività.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Peng Zhou, Xing-Lou Yang, Xian-Guang Wang et al. "A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin" *Nature*. 2020; 579(7798): 270–273.
- 2) Wu F, Zhao S, Yu B, et al. "A new coronavirus associated with human respiratory disease in China" *Nature*. 2020; 579(7798):265–269.
- 3) World Health Organization Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Situation Report-97. Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200426sitrep-97-covid-19>.
- 4) Nao N, Yamagishi J, Miyamoto H, et al. "Genetic predisposition to acquire a polybasic cleavage site for highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin" *mBio*. 2017;8(1): e02298.
- 5) Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. "Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2" *JAMA*. 2020;323(22):2249-2251. doi: 10.1001/jama.2020.8259.
- 6) CDC CENTER FOR DISEASE CONTROL: Evaluation of Abbott BinaxNOW Rapid Antigen Test for Sars-CoV-2 Infection at Two Community-based Testing Sites - Pima County Arizona, November 3-17, 2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report Early Release / Vol. 70 January 19, 2021*
- 7) *International Journal of Infectious Diseases* 28 July 2020: Sensitivity of different RT-qPCR solutions for SARS-CoV-2 detection
- 8) NCBI GOV Sensitivity of Chest CT for COVID-19: Comparison to RT-PCR 2020 Aug;296(2): E115-E117.doi: 10.1148/radiol.2020200432. Epub 2020 Feb 19.