

## Cosa significa veramente scoprire di essere sars-cov-2 “positivo”

Per prevenire la diffusione dell'attuale pandemia di COVID-19, è essenziale identificare i “positivi contagiosi” ed assicurarsi che, quelli che presentano una elevata carica virale, vengano isolati per impedire la diffusione dell'infezione.

Attualmente, la diagnosi, lo screening e la sorveglianza viene gestita sottoponendo il materiale prelevato attraverso un tampone nasofaringeo ad una RT-qPCR (trascrittasi inversa SARS-CoV-2 PCR quantitativa), i risultati vengono rubricati come “positivo” o “negativo”. Tuttavia, il test riporta anche un parametro che misura la carica virale nel campione in esame, il **Ct** o valore di soglia del ciclo. E' incomprensibile che questo valore non venga riportato ( ! ?) considerato che, se opportunamente valutato, consente di estrapolare la carica virale e pertanto possa aiutare a comprendere la reale consistenza di una positività e indirizzare nelle decisioni cliniche da intraprendere

**Michael Mina**, epidemiologo di Harvard, sostiene che sia importante durante una pandemia definire oltre alla positività al virus, anche il **Ct (ciclo soglia)** che oltre a ipotizzare indirettamente la quantità di virus presente, consente di individuare quei pazienti che presentano un rischio più alto di sviluppare una sintomatologia importante. (Tom M e Mina M 2020)

Inoltre il **ciclo soglia** potrebbe aiutare il medico generalista a stabilire la contagiosità, l'eventuale isolamento e ricostruire la catena dei contatti che il suo paziente ha avuto.

I tamponi individuano l'infezione da sars-cov-2 isolando l'RNA virale mediante la **RT-qPCR** una metodica che, attraverso una serie di cicli di amplificazione (come uno scanner che ricopia più volte la traccia del tampone) ne riproduce una quantità rilevabile. Il valore **Ct** indica appunto il numero dei cicli che servono per poter rilevare la presenza del virus.

*Il test SARS-CoV-2 RT-qPCR fornisce la quantificazione in tempo reale mediante una prima trascrizione inversa SARS-CoV-2 RNA in DNA (fase RT) e quindi esegue una qPCR dove un segnale di fluorescenza aumenta proporzionalmente alla quantità di acido nucleico amplificato, consentendo così una quantificazione accurata dell'RNA nel campione. Se la fluorescenza raggiunge una soglia specifica attraverso un certo numero di cicli PCR (valore Ct), il campione è considerato un risultato “positivo”. Il valore Ct è inversamente correlato alla carica virale e ogni aumento di ~ 3,3 nel valore Ct riflette una riduzione di 10 volte del materiale di partenza. Molti test qPCR comportano un cutoff Ct di 40 per considerare il test positivo, consentendo il rilevamento di pochissime molecole di RNA di partenza. Questa elevata sensibilità per l'RNA virale può essere utile per definire una diagnosi iniziale*

Se dopo **37-40 cicli** il virus non è rilevabile il tampone viene considerato negativo. Un tampone che risulta evidente dopo dodici cicli (Ct12) possiede all'incirca un materiale genetico virale dieci milioni di volte superiore ad un campione **Ct** 35. Generalmente nella prima fase dell'infezione i contagiati tendono ad avere un **Ct** inferiore a 30, valore che indica una forte presenza del virus. In seguito, man mano che i “positivi” si liberano del virus (escrezione?), il **Ct** aumenta progressivamente, ed il soggetto si definisce “negativo” (ma non guarito, meglio parzialmente “decontaminato”).

Il team di Xiao L ha segnalato che alcuni pazienti “positivi” possono rimanere tali fino cinque settimane dopo la comparsa della sintomatologia

*Sono state analizzate le RT-qPCR di 56 pazienti ospedalizzati con malattia COVID-19 da lieve a moderata. Di ogni paziente sono state eseguiti da quattro a sette test tampone per diverse settimane dopo l'insorgenza*

*dei sintomi. La percentuale di i risultati positivi sono diminuiti dal 100% nella prima settimana all'89,3%, 66,1%, 32,1%, 5,4% e 0% settimane due, tre, quattro, cinque e sei, rispettivamente. Il tempo mediano dall'insorgenza dei sintomi a test negativo è stato di 24 giorni.*

In questi pazienti il prolungamento della positività è stato correlato all'età avanzata, al diabete o ad una condizione ipertensiva. Nello studio di Xiao quattro pazienti con due test consecutivi negativi sono successivamente risultati nuovamente positivi. Numerose segnalazioni della letteratura riferiscono di pazienti con due test negativi consecutivi che, nonostante la risoluzione dei sintomi, sono successivamente risultati positivi. In casi come questi una valutazione dei valori Ct, potrebbe fornire informazioni preziose sulla quantità di RNA virale presente nei campioni testati per continuare a monitorare il corso dell'infezione.

**In sintesi:** un risultato RT-qPCR positivo potrebbe non significare necessariamente che la persona sia ancora contagiosa. In primo luogo, l'RNA potrebbe provenire da virus non vitali o uccisi. Il virus "vivo" è spesso isolabile solo durante la prima settimana di sintomi ma non dopo l'ottava anche con test RT-qPCR positivi alternativamente potrebbe essere necessaria una quantità minima di virus vitale per trasmissione successiva.

Una carica virale maggiore (Ct bassi) si ripercuote sulla gravità della malattia e in particolare sulla sua contagiosità. **Bernard La Sola**, infettivologo del *Institute Ihu-Méditerranée Infection* di Marsiglia ha analizzato un pool di 3790 campioni positivi con valori Ct noti per verificare se contenessero virus attivo o non funzionante e stabilire così una probabile contagiosità. Il 70% dei campioni con Ct inferiore a 35 poteva essere coltivato ed espanso *in vitro*, contro un 3% di quelli con Ct superiore a 35 concludendo così che una carica virale più alta, se associata ad un Ct più basso, può correlare con una maggiore contagiosità.

I "positivi" con un Ct elevato possono continuare a risultare "positivi" per settimane dopo la guarigione clinica, suggerendo che attraverso la PCR è stato individuato materiale genetico di "residui virali" non infettivi. Tuttavia il Ct può essere molto utile per risalire ai contatti che hanno avuto i "positivi". Inoltre conoscere i valori del Ct contribuisce a monitorare l'andamento dell'epidemia. Se prevalgono i Ct bassi è probabile che l'epidemia sia in fase di crescita e viceversa.

Riguardo la correlazione del Ct con la gravità dei sintomi uno studio del *Weill Cornell Medicine* riferisce che su 678 ricoverati deceduti il 35% aveva un Ct inferiore compreso tra 25-30, mentre il 6,2% di aveva un Ct superiore a 30. **Monica Gandhi**, dell'*Università di San Francisco*, ritiene che la carica virale non causa necessariamente sintomi: il 40% dei positivi è asintomatico pur avendo una quantità di virus simile a quella di chi si ammala (Gandhi M. 2020).

Tuttavia il Ct non dà "certezze assolute", è quanto sostiene **Marta Gaglia** virologa della *Tufts University*. Lo stesso campione può dare risultati diversi se si usano strumentazioni per la PCR di marchi differenti, e più tamponi della stessa persona se replicati possono dare risultati con differenze significative. Attualmente i membri del *College of American Pathologist* hanno consigliato cautela nella interpretazione dei risultati ottenuti attraverso i tamponi (Rhoads D 2020)

Il **Center for Evidence-Based Medicine** all'inizio di questo mese (novembre) riferisce che *"mentre uno stadio infettivo può durare circa una settimana, l'RNA inattivato intracellulare si degrada lentamente e può ancora essere amplificato molte settimane dopo che l'infezione si è risolta"*

Un preprint (che non è stato sottoposto a peer review) del 7 agosto (**Wrong person, place and time: viral load and contact network structure predict SARS-CoV-2 transmission and super-spreading events**) (Goyal A 2020) ritiene *improbabile che le persone con 10.000 copie del virus*

*rilevate nelle loro vie aeree diffondano il virus a qualcun altro, anche con un contatto prolungato (secondo i loro modelli, accadrebbe circa lo 0,002 per cento delle volte).*

*Una volta che la carica virale sale a 10 milioni di copie (cosa che avviene rapidamente, potenzialmente in circa un giorno), hanno circa il 40% di possibilità di trasmetterla attraverso un contatto ravvicinato e circa l'80% di possedere di 100 milioni di copie virali (vale la pena notare che quando raggiungono per la prima volta questo livello potrebbero ancora non avere alcun sintomo).*

*Nel momento in cui qualcuno ha avuto i sintomi del Covid-19 per diversi giorni (che potrebbe coincidere con il momento in cui riceve i risultati da un test PCR), la quantità di virus nel loro sistema è probabilmente diminuita al punto da essere effettivamente meno trasmissibile. Conclusione : la trasmissione dopo la prima settimana di infezione è piuttosto rara".*

Il vero enigma da risolvere è perché così tante persone continuano ad essere PCR-positive per settimane dopo aver superato la maggior parte dei sintomi. Un piccolo studio pubblicato su JAMA (di cui ho perso le reference , sorry!) riportava che un paziente su sei ex Covid-19 senza sintomi risultava "PCR-positivo" dopo 24 giorni dalla sua dimissione. Il significato clinico e la potenziale infettività di questi positivi "a coda lunga" sono marginali. Queste PCR positive probabilmente amplificano frammenti di RNA non infettivi e non rappresentano il rilevamento di virus vitali.

**David Paltiel**, epidemiologo di Haward, esperto nel campo della ricerca operativa e della modellazione della simulazione delle malattie ritiene che nelle condizioni su riportate *"La PCR viene ingannata tutto il tempo, sta solo raccogliendo fili di spazzatura virale". Se l'obiettivo finale dei tamponi è rallentare un'epidemia, osserva, questo tipo di dati non è effettivamente così utile.* E sagacemente stigmatizza il problema dei lunghi ritardi della PCR nel tracciamento dei contatti *"Più virus sono intorno alle tue vie aeree, è probabile che tu sia un rischio per gli altri".* (Paltiel DD 2020)

## **Perché i tamponi se usati come filtri anti covid sono "inutili"**

Il "punto" sollevato da David Paltiel non è quanto un tampone sia capace di rilevare le molecole virali in un singolo campione, ma quanto efficacemente sia in grado di rilevare l'andamento della pandemia . In ultima analisi, i milioni di tamponi eseguiti, dovrebbero principalmente creare un filtro "anti COVID" capace di identificare, e isolare le persone infette, comprese quelle asintomatiche. Il tamponamento su larga scala potrebbe realmente funzionare come un filtro efficace efficaci se i risultati dei tamponi fossero disponibili in tempo utile per valutare la diffusione dell'infezione.

Più che sulla sensibilità analitica di un test (la sua capacità di rilevare correttamente piccole concentrazioni di molecole in un campione) c'è la necessità di avere la disponibilità di test capaci di rilevare l'infezione nella popolazione e prevenire la diffusione dell'epidemia. Nella pratica quando il tampone identifica le persone infette, i "positivi", possono comunque diffondere l'infezione per giorni prima della notifica del risultato e questo vanifica l'impatto dell'isolamento e della tracciabilità dei contatti.

Attualmente le persone sono giustamente preoccupate e stanche di andare in un drive through o dover aspettare in fila per un test e poi aspettare più giorni per ottenere il risultato.

Dopo la raccolta, i campioni in genere richiedono il trasporto a un laboratorio centralizzato dove viene processato da personale specializzato, il che fa aumentare i costi, riduce la frequenza e può ritardare i risultati di uno o più giorni. La soluzione ideale sarebbe avere a disposizione un test pratico che può essere fatto in casa autonomamente (come ad esempio il gravidex) a partire da una goccia di sangue, saliva o urina. Le persone così non entrerebbero nell'angosciante percorso delle segnalazioni e aspettare a volte in una angosciosa attesa i risultati del tampone. In ultima analisi durante una pandemia le persone vorrebbero conoscere il loro stato, quello dei propri figli e decidere se restare in casa o uscire per andare a trovare i propri genitori presso una casa di cura, e cosa fondamentale affidarsi al proprio medico per gestire le soluzioni terapeutiche più appropriate.

Se è vero che con il COVID-19 dovremmo convivere per tutto il 2021 i test che dovremmo utilizzare, in una ipotetica terza fase dell'attuale pandemia (che nessuno si augura) dovrebbero essere fundamentalmente diversi dai test clinici attualmente in uso e devono essere vissuti in modo diverso. Dovremmo utilizzare test di sorveglianza rapidi sufficientemente semplici, economici da ripetere autonomamente più volte per stabilire un personale auto-monitoraggio. Abbiamo imparato che la trasmissione di SARS-CoV-2 sembra avvenire quando la carica virale raggiunge il picco questo andamento conferma l'importanza di poter eseguire una elevata frequenza di test, per provare ad arrestare la diffusione.

I *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) hanno stimato nel giugno 2020 che negli Stati Uniti ci sono stati 10 volte più casi di Covid-19 negli Stati Uniti quanti erano stati rilevati. Nonostante la sensibilità analitica molto elevata dei tamponi-PCR utilizzati ai fini di una sorveglianza hanno, nella migliore delle ipotesi hanno evidenziato solo il 10% di sensibilità per rilevare le infezioni e non funzionano come filtri anti Covid. Inoltre la positività dell'RNA dopo lo stadio trasmissibile riporta che molte, se non la maggior parte, dei positivi, non lo sono più al momento del rilevamento, oltre il 50% dei PCR positivi presenta valori soglia del ciclo bassi riconducibili ad una infezione allo stadio iniziale o avanzato. La lunga durata della "coda positiva all'RNA" suggerisce che la maggior parte delle persone infette vengono identificate dopo che il periodo infettivo è passato. Migliaia di positivi vengono posti in quarantena di 10 giorni dopo i test RNA positivi nonostante abbiano già superato la fase trasmissibile dell'infezione.

In conclusione i soggetti positivi SARS-CoV-2 RT-qPCR positivi sollevano più di un interrogativo sull'efficienza e sostenibilità delle attuali linee guida sull'isolamento. **Bill Gates**, che contribuisce generosamente a finanziare i PCR- test ritiene che aspettare tre giorni per un risultato PCR *"non lo chiamerei un test"* e riferendosi all'epidemia scatenatesi in Arizona nel mese di agosto, dove i risultati della PCR sono stati disponibili dopo 14 giorni *non è un punto di riferimento per una patologia che si sviluppa in 14 giorni* concludendo che *"La maggior parte di tutti i test statunitensi sono completamente spazzatura, sprecati"* e auspica l'arrivo di test rapidi. Ma quali sono questi test ?

## **I test rapidi a flusso laterale**

È una tecnologia chiamata flusso laterale, perché, essenzialmente, le particelle virali fluiscono letteralmente attraverso una striscia di carta e vengono attratte da proteine antigeniche del virus .

Molto efficacemente **Mina** , l'epidemiologo di Harvard, in una intervista al New York Times lo spiega così: *I test COVID possono essere effettivamente eseguiti su un pezzo di carta, proprio come*

*un test di gravidanza. In effetti, è quasi esattamente come un test di gravidanza. Ma invece di cercare gli ormoni che dicono se qualcuno è incinta, cerca le proteine del virus che fanno parte della struttura molecolare del virus. L'esecuzione è molto semplice puoi prelevare con un cotton un po' di materiale dalla parte anteriore del naso, o un po' di saliva da sotto la lingua, e metterla su una di queste strisce di carta. E se vedi una riga, significa che sei positivo. E se non vedi nessuna linea significa che sei negativo, almeno per avere un'elevata carica virale che potrebbe essere trasmissibile ad altre persone.*

I test a flusso laterale fanno parte di una tecnologia adoperata da molto tempo per molti patogeni. Viene utilizzato nelle cliniche di tutto il mondo, ad esempio per patologie specifiche come la malaria. Finora non sono stati utilizzati durante questa pandemia. Ma certamente possono essere disponibili. I test descritti da Mina esistono già: sono nell'ufficio di **e25 Bio**, una piccola start-up a Cambridge, Massachusetts; una mezza dozzina di altre aziende stanno lavorando a prodotti simili. Sono in avanzato stato di realizzazione test rapidi a flusso laterale basati sulla tecnologia di modifica genetica CRISPR. Nei primi giorni di agosto la *Food and Drug Administration degli Stati Uniti* ha autorizzato l'uso del **Abbott BinaxNOW**, il primo test antigenico rapido a ricevere un EUA. (autorizzazione all'uso di emergenza). Questi kit attualmente disponibili permettono a chiunque di testare se stesso per il coronavirus in qualsiasi momento (e ovunque) con un costo di 5 dollari e ottenere risultati in circa 15 minuti. Non sono necessari medici, laboratori, macchine costose o reagenti speciali. E' un test che richiede solo una striscia di carta patinata e un piccolo tampone. La portata della sua produzione è sbalorditiva: Abbott ha prodotto 50 milioni di questi test solo nel mese di ottobre.

Al momento attuale (novembre) esistono su PUBmed "rari lavori" mentre sui media "molte polemiche" sulla sensibilità dei test rapidi (BinaxNOW, Sd Biosensor, Standard F Covid-19 Ag Fia). La storia del progresso racconta che ogni nuova tecnologia porta inevitabili polemiche e che, purtroppo, *la virulenza delle polemiche su un argomento è inversamente proporzionale alla reale importanza dell'argomento stesso* (Arthur Bloch). Fortunatamente "la scienza" si muove più velocemente quando ci sono dibattiti seri e polemiche se ben documentate. Con evidenze limitate si denuncia una sensibilità del test Abbot di circa il 70% inferiore a quella dichiarata (Pronto Soccorso Università di Padova) e una efficacia del SD Biosensor del 21.95% nettamente inferiore a quella dichiarata nel foglietto illustrativo del produttore, stimato superiore all' 80% (Istituto Spallanzani).

Attualmente, non esiste una strategia che preveda l'uso di test rapidi per ridurre la trasmissione nelle comunità. L'obiettivo prioritario rimane concentrato esclusivamente sui test diagnostici clinici tamponi PCR ma nuove metriche dovrebbero essere applicate per valutare i test alla luce di un quadro epidemiologico in cui l'obbiettivo è quello di ridurre la prevalenza comunitaria del virus. Sarà necessario nei prossimi mesi una attenta valutazione e trovare un compromesso tra frequenza, limiti di rilevamento e tempi di risposta.

E' evidente che i test rapidi non possono sostituire i PCR test, ma considerato il costo basso, la praticità di esecuzione e la possibilità di ripeterli più volte tuttavia possiedono una "compliance intrinseca" che può assicurare l'utente e potrebbero interrompere le catene di trasmissione dell'infezione fornendo alle persone la consapevolezza del loro potenziale stato di trasmissibilità e in particolare la consapevolezza del "tempo" a loro disposizione. Alcuni miei amici psichiatri mi confermano che questo potrebbe essere un punto cruciale per la rimozione della "covid-paura".

COVID-19 è la parola che certamente non verrà dimenticata da tutti coloro che sono vissuti nella prima metà del ventunesimo secolo, l'attuale pandemia è senza alcun dubbio uno degli eventi più devastanti della nostra storia recente. Braccati notte e giorno da un killer invisibile e oscuro, consapevoli che in ogni istante potrebbe penetrare dentro di noi e ucciderci (potenza invisibile nell'era della visibilità...). Il rischio di una morte improvvisa, che ti coglie disarmato e ti spersonalizza trasformandoti in *un numero* da aggiungere all'elenco dei deceduti di oggi.

Il tempo all'epoca del covid è un "tempo sospeso", che ci priva delle nostre piccole grandi libertà personali. È un'esperienza di impotenza. E quando le fragili certezze date da una mascherina e da due gocce di amuchina evaporano e non sappiamo dove si nasconde il pericolo prende corpo la consapevolezza di essere disarmati l'ansia e le paure crescono. La consapevolezza di sentirsi continuamente immersi nel pericolo in alcuni fa aumentare l'aggressività. La necessità di continuare a sentirsi vivi e reali a volte spinge molti a essere inconsciamente spietati, a prevaricare e distruggere l'altro, innescando così un circuito pericoloso, fatto di aggressioni represses, che possono spesso esplodere in comportamenti di aggressione distruttiva e *personalmente, ritengo di determinare la possibile trasmissione transgenerazionale di traumi e violenza.*

Anche se le sensibilità analitiche di questi test sono di gran lunga inferiori a quelle dei test di benchmark, un loro uso diffuso può contribuire a fermare Covid già dalle prime sue tracce lasciate nei tamponi. Questi test dovrebbero integrare, non sostituire, gli attuali test diagnostici clinici. Un indubbio vantaggio nascerebbe utilizzando test frequenti, economici e rapidi su larga scala per mitigare i focolai. I pazienti sospetti che potranno essere analizzati con un secondo test rapido mirato all'epitopo di una specifica proteina o utilizzando un test PCR di riferimento.

#### **A chi legge:**

**Quanto su riportato è un draft in costruzione (work in progress) e pertanto non può che giovare delle vostre critiche e considerazioni .Mi scuso dei possibili piccoli grandi errori presenti nel testo :Mistakes are proof that you are trying, *Gli errori sono la prova che ci stai provando***

#### **Riferimenti :**

Gandhi M, Yokoe DS, Havlir DV. Asymptomatic Transmission, the Achilles' Heel of Current Strategies to Control Covid-19. N Engl J Med. 2020 May 28;382(22):2158-2160. doi: 10.1056/NEJMe2009758. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32329972; PMCID: PMC7200054

Gaglia MM, Glaunsinger BA. Viruses and the cellular RNA decay machinery. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2010 Jul-Aug;1(1):47-59. doi: 10.1002/wrna.3. Epub 2010 May 6. PMID: 21956906; PMCID: PMC7169783

Goyal A, Reeves DB, Cardozo-Ojeda EF, Schiffer JT, Mayer BT. Wrong person, place and time: viral load and contact network structure predict SARS-CoV-2 transmission and super-spreading events. medRxiv [Preprint]. 2020 Sep 28:2020.08.07.20169920. doi: 10.1101/2020.08.07.20169920. PMID:

Paltiel AD, Zheng A, Walensky RP. Assessment of SARS-CoV-2 Screening Strategies to Permit the Safe Reopening of College Campuses in the United States. JAMA Netw Open. 2020 Jul 1;3(7):e2016818. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.16818. PMID: 32735339; PMCID: PMC7395236.

Rhoads D, Peaper DR, She RC, Nolte FS, Wojewoda CM, Anderson NW, Pritt BS. College of American Pathologists (CAP) Microbiology Committee Perspective: Caution must be used in interpreting the Cycle

Threshold (Ct) value. Clin Infect Dis. 2020 Aug 12:ciaa1199. doi: 10.1093/cid/ciaa1199. Epub ahead of print. PMID: 32785682.

Tom MR, Mina MJ. To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. Clin Infect Dis. 2020 May 21:ciaa619. doi: 10.1093/cid/ciaa619. Epub ahead of print. PMID: 32435816; PMCID: PMC7314112