

16. Maggio

## Rilevamento degli anticorpi anti-SARS-CoV-2 nei campioni di urina: un modo non invasivo e sensibile per saggiare la conversione immunitaria COVID-19

*Tutto dovrebbe essere reso il più semplice possibile,  
ma non più semplicistico.*  
Albert Einstein

Hans Hofmann, uno dei più significativi esponenti dell'espressionismo diceva che *semplificare significa eliminare il superfluo in modo che solo il necessario possa parlare*. Il team di **Fernanda Ludolf** della *Faculdade de Medicina di, Belo Horizonte* sembra che ci sia riuscito. Pochi giorni fa ha proposto un test ELISA basato sulle urine non invasivo, pratico, semplice ed efficace che ha le potenzialità di diventare uno strumento prezioso nella gestione della diagnostica dell'attuale e possibili future pandemie.

**La diagnosi di COVID-19** può essere effettuata mediante il rilevamento diretto degli antigeni SARS-CoV-2 RNA o SARS-CoV-2, nonché mediante il rilevamento indiretto di anticorpi specifici (saggi sierologici). Sono disponibili molti diversi test sierologici per COVID-19, incluso il test di *immunoassorbimento enzimatico (ELISA)*. Questi test si basano sull'uso delle proteine SARS-CoV-2 per valutare la presenza di anticorpi specifici dell'ospite, come l'immunoglobulina G (IgG), IgM e IgA. I test sierologici possono identificare individui che hanno sviluppato l'immunità a SARS-CoV-2 circa 2 settimane dopo l'insorgenza dei sintomi (PSO) e queste informazioni contribuiscono sostanzialmente agli studi epidemiologici aiutando a determinare la precedente esposizione a SARS-CoV-2 su un individuo e/ o livello di popolazione .

**Il prelievo di sangue** per i test sierologici è una delle procedure invasive più comuni nell'assistenza sanitaria e, sebbene abbia un basso tasso di complicanze, può essere spiacevole e difficile da eseguire in alcune circostanze. La raccolta del sangue dai bambini può essere difficile e anche alcuni adulti potrebbero non voler fornire campioni di sangue per motivi religiosi e/o personali. La procedura richiede anche un flebotomo esperto, che potrebbe essere potenzialmente esposto a agenti patogeni trasmessi per via ematica. La raccolta del sangue tramite prelievo venoso può essere particolarmente difficile in alcuni ambienti come le aree rurali con risorse e accesso limitati all'assistenza sanitaria. Le macchie di sangue secco raccolte mediante puntura del dito o del tallone sono un'alternativa minimamente invasiva con il potenziale per risolvere alcune delle sfide logistiche associate alla venipuntura e offrono i vantaggi della stabilità del campione e la possibilità di auto-raccolta

**L'urina** è un campione potenzialmente utile per i test sierologici perché la raccolta è non invasiva, semplice e sicura e l'urina è facile da maneggiare e conservare e molto conveniente per l'individuo e per la pratica clinica.

È noto dalla metà degli anni '50 che le *γ-globuline* possono essere rilevate nelle urine. Sebbene non siano ampiamente studiati o riportati, i test diagnostici basati sulle urine che rilevano gli anticorpi sono stati suggeriti come una possibile alternativa non invasiva per diagnosticare diverse condizioni, (*Dengue, infezione da Helicobacter pylori, epatite A e C, virus dell'immunodeficienza umana, strongiloidosi, schistosomiasi, paragonimiasi, e leishmaniosi*)

Al momento, non esiste uno studio pubblicato sulla rilevazione degli anticorpi anti-SARS-CoV-2 nelle urine. Nel loro studio i ricercatori brasiliani hanno utilizzato una proteina **nucleocapside (N) ricombinante (r) SARS-CoV-2** come parte di un test ELISA interno per esaminare la presenza di anticorpi antivirali nei campioni di urina raccolti da pazienti con infezione da SARS-CoV-2, dato

che è stato confermato in precedenza dalla reazione a catena della polimerasi di trascrizione inversa quantitativa (qRT-PCR).

Inoltre è stata confrontata la capacità di un test ELISA a base di proteine rSARS-CoV-2 N di discriminare i pazienti sierologicamente positivi con COVID-19 utilizzando *campioni di urina* o di siero. I dati hanno mostrato valori di sensibilità e specificità rispettivamente del 94,0 e del 100%, quando è stata utilizzata l'urina, ed è stata osservata la presenza di *anticorpi nelle urine* dei pazienti per alcuni giorni PSO. L'uso dell'*urina* ha dato una maggiore sensibilità *per rilevare la sieroconversione* rispetto all'uso di sieri in condizioni sperimentali ottimali. I test ELISA basati sul siero sono stati utilizzati per diagnosticare la sieropositività SARS-CoV-2 rilevando anticorpi specifici nei campioni di siero dei pazienti .

Questo è il primo studio che utilizza un test ELISA non invasivo basato sulle urine per identificare anticorpi specifici contro una proteina SARS-CoV-2. L'uso dell'urina per rilevare gli anticorpi potrebbe essere considerato più conveniente per la pratica clinica e per la sorveglianza epidemiologica rispetto alle sfide incontrate con la venipuntura, perché

- (i) consente ai pazienti di raccogliere i propri campioni e
- (ii) elimina la necessità di flebotomi addestrati per prelevare sangue e i rischi associati alla manipolazione di potenziali agenti patogeni trasmessi per via ematica.

SARS-CoV-2 ha quattro proteine strutturali: le proteine della punta (S), dell'involucro (E), della membrana (M) e del **nucleocapside (N)** e tutte sono già state testate come antigeni per la diagnosi di COVID-19 utilizzando proteine ricombinanti , peptidi sintetici e/o chimere polipeptidiche. Sebbene molti test diagnostici utilizzino la proteina S ricombinante come antigene, anche i test basati su ELISA che utilizzano una proteina N ricombinante sono stati ampiamente utilizzati con un'elevata sensibilità per rilevare gli anticorpi in pazienti lievemente infetti.

E' chiaramente dimostrato che le prestazioni diagnostiche dell'ELISA a base di siero (sensibilità e specificità rispettivamente dell'87,7 e del 100%) erano leggermente inferiori a quelle dell'ELISA a base di urine utilizzando la proteina N ricombinante.

**Ralph Veissleder** del *Center for Systems Biology, Massachusetts General Hospital Research Institute, Boston*, ha dimostrato che la **sieroconversione specifica** per IgG SARS-CoV-2 si verifica di solito da 7 a 14 giorni dopo l'infezione ed è presumibilmente accompagnata dallo sviluppo di un'immunità protettiva (Veissleder R 2020)

Nelle prime fasi dell'infezione, i *test anticorpali sierici* commerciali mostrano una bassa accuratezza perché la maggior parte della risposta immunitaria del paziente è ancora in via di sviluppo. L'accuratezza dei test sierologici può essere vicina al 100%, quando i campioni vengono acquisiti a 20 giorni PSO. Si noti che i campioni di urina raccolti da pazienti positivi con qRT-PCR che non hanno mostrato valori di indice positivi potrebbero essere stati raccolti troppo presto perché si verificasse la sieroconversione.

La conversione immunitaria per urina e siero si è verificata a una velocità simile, con un aumento della produzione di **IgG** lungo i giorni PSO, quando i valori dell'indice individuale sono stati tracciati per tali campioni. I valori dell'indice **ELISA-positivi** sono stati ottenuti con molti dei campioni raccolti prima di 10 giorni PSO, almeno per i soggetti ospedalizzati

**Vaccini approvati** per la protezione dall'infezione da SARS-CoV-2 e somministrati in tutto il mondo, come il vettore virale dell'adenovirus *Oxford/AstraZeneca AZD1222*, il vaccino mRNA *Pfizer-BioNTech BNT162b2*, il vettore virale modificato *Janssen di Johnson & Johnson*, *Moderna mRNA Spikevax* e l'adenovirus *Sputnik V vettore virale*, utilizzare solo la proteina S di SARS-CoV-2 per

suscitare l'immunità protettiva. Per questi vaccini, la risposta anticorpale della proteina SARS-CoV-2 N valutata mediante **ELISA** potrebbe essere utilizzata potenzialmente come strumento affidabile per valutare le risposte anticorpali a COVID-19 rispetto alle risposte anticorpali indotte dalla vaccinazione. D'altra parte, i vaccini virali CoronaVac/Sinovac o Sinopharm inattivati **contengono la proteina N** nella loro formulazione e potrebbero essere valutati per confermare la conversione anticorpale indotta dal vaccino.

Molte persone non hanno il loro stato infettivo confermato dal rilevamento diretto dell'RNA SARS-CoV-2 o degli antigeni, a causa dei limiti dei test, della breve finestra di rilevamento o della disponibilità dei test per i pazienti. Sebbene i test anticorpali non debbano essere utilizzati per stabilire la presenza o l'assenza di un'infezione acuta da SARS-CoV-2, possono essere uno strumento utile per identificare le persone con infezione da SARS-CoV-2 risolta o pregressa, che può aiutare la diagnosi e le complicazioni derivanti da COVID-19. In questo senso, lo sviluppo del nostro **ELISA** a base di urine con proteine N diventa un ulteriore strumento disponibile per uso individuale ed epidemiologico. Inoltre, poiché abbiamo identificato anticorpi contro la proteina SARS-CoV-2 N nelle urine, lo sviluppo di un test **ELISA** spike basato sulle urine può essere fattibile anche per coprire altre applicazioni di test sierologici come il rilevamento di anticorpi indotti dal vaccino.

In sintesi, stata accertata la presenza di anticorpi SARS-CoV-2 nelle urine, con una sensibilità del **94%** e una specificità del **100%** per la rilevazione degli anticorpi anti-SARS-CoV-2 con l'**ELISA** su base urinaria e una sensibilità dell'88% e una specificità del 100% con una **ELISA** accoppiato a base di siero. L'**ELISA** a base di urina che rileva gli anticorpi anti-SARS-CoV-2 è un metodo non invasivo con potenziale applicazione come piattaforma immunodiagnostica facile da COVID-19,

## Riferimenti

-Ludolf F et al. **Detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine samples: A noninvasive and sensitive way to assay COVID-19 immune conversion.** Sci Adv. 2022 May 13;8(19):eabn7424.

-Weissleder R, et al. **COVID-19 diagnostics in context.** Sci Transl Med. 2020 Jun ;12(546):eabc1931.



## **Un anno fa... Baedeker/Replay del 16 Maggio 2021**

*Dalla neutralizzazione disattivazione metacronale alla deciliazione: parte seconda*

**Prologo** La mucosa nasale è attrezzata per impedire la penetrazione di virus grazie al lining protettivo regolato dai microvilli apicali e dall'attività metacronale esercitata dalle ciglia presenti nella porzione apicale degli epitelioцити che rivestono la mucosa nasale. Mezzo secolo di osservazioni sperimentali ci dicono che alcuni virus sono in grado di colonizzarla attraverso un processo che, nel lontano 1948 il patologo ungherese Fazekas de St Groth definì "viropexis" paragonandolo alla fagocitosi. Questi riescono a neutralizzare i sistemi difensivi andando ad interferire con la attività dei microvilli e sabotando (danneggiando?) i macchinari molecolari che regolano il funzionamento ciliare. Questa strategia adottata da molti virus (es. Sendai ) utilizza le ciglia per entrare negli epitelioцити e da qui bloccare il funzionamento ciliare fino ad ottenere una progressivamente una deciliazione parziale del epitelio mucosale che viene indirettamente avvertita come anosmia e perdita dell' odorato come conseguenza delle modificazioni chemo-sensoriali che determina.

**Evidenze Sperimentali** Nel 1970, Dourmashkin e Tyrrell del Clinical Research Centre Laboratories, National Institute for Medical Research di Londra hanno dimostrato che il virus dell'influenza si allinea e si fonde con la membrana ciliare . Dopo essere penetrato nelle ciglia, il nucleocapside del virus Sendai si è parzialmente srotolato diffondendosi all'interno del corpo basale ciliare. Nel 1994, Bjorn Afzelius, del Dipartimento ultrastrutture dell' Università di Stoccolma, per primo descrisse una discinesia ciliare primaria in uno studio ultrastrutturale della mucosa nasale di un paziente con diagnosi di rinite cronica e bronchite "I virioni erano visibili all'interno e all'esterno delle cellule ciliate, ma non all'esterno o all'interno delle cellule caliciformi o di altre cellule della mucosa nasale. Alcuni virioni si trovano vicino ai microvilli, altri nelle tasche della membrana cellulare apicale. Il citoplasma conteneva molte piccole vescicole con un singolo virione, grandi vescicole apicali contenenti centinaia di virioni e citosomi simili a lisosomi con un numero moderato di virioni. Alcune particelle simili a virus prive di un interno denso di elettroni erano visibili sia nei citosomi che a livello extracellulare. Il germogliamento del virus è stato osservato nell'apparato di Golgi ma in nessun altro posto nella cellula". In sintesi le ciglia fungono da siti di assorbimento per diverse famiglie di virus e, almeno per il virus Sendai, le ciglia sembrano essere uno dei siti di ingresso per l'infezione virale. Al momento non esistono evidenze dirette che dimostrino come i coronavirus Siano capaci di colonizzare oltre la mucosa respiratoria nasale anche di infettare i neuroni olfattivi rendendo l'intera fossa nasale ugualmente a rischio di infezione.

Le puntuali osservazioni di Afzelius sono state confermate in studi successivi e recentemente dal Dipartimento di Viroscienza, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, che rilevato il coronavirus nelle cellule ciliate di macachi infettati da SARS - CoV - 2. (Rockx B 2020 ) Interazioni coronavirus epitelio respiratorio nasale I coronavirus entrano nelle cellule ospiti usando la proteina spike (S), che si lega a uno specifico recettore cellulare presente sulla superficie ciliare con l'innesco automatico della proteina S dipendente dalla proteasi utilizzando l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) come recettore dell'ospite e TMPRSS2 come proteasi cellulare. I set di dati di sequenziamento dell'RNA a cellula singola (scRNA - seq) del consorzio Human Cell Atlas hanno descritto l'espressione del recettore e della proteasi nelle cellule epiteliali nasali fornendo la base molecolare per l'ingresso del coronavirus nell'epitelio nasale umano. ( Lukassen S 2020) Sebbene i virioni non danneggiassero indebitamente l'epitelio ciliato, la deciliazione rappresentava una delle anomalie ultrastrutturali più evidenti nelle cellule infettate da coronavirus (Sungnak W 2020)

Il team di Mary Mirvis del Dipartimento di Fisiologia Molecolare e Cellulare, Stanford University, Stanford, California, ha proposto due modelli alternativi che spiegano i possibili meccanismi che portano alla deciliazione: l'amputazione ed il riassorbimento. (Mirvis M 201) .....

**(Per continuare vai all'originale)**