

Determinazione di anticorpi anti SARS-CoV-2 in matrice salivare in individui vaccinati e in pazienti COVID-19

Chiara Cosma^{1,2}, Andrea Padoan^{1,2}, Costanza Di Chiara³, Daniela Rinaldi¹, Daniele Donà³, Andrea Gastaldi⁴, Daniela Basso^{1,2}, Carlo Giaquinto², Martina Zaninotto^{1,2}, Mario Plebani^{1,2}

¹Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale - Università di Padova

²QI.LAB.MED. Spin-off Università di Padova

³Divisione di Malattie Infettive Pediatriche, Dipartimento per la Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova

⁴Dipartimento di Pediatria, Ospedale Donna e Bambino, Università degli studi di Verona, Verona

Questo lavoro è stato in parte presentato al 53° Congresso SIBioC - 11-13 Ottobre 2021, Virtual Edition, come Comunicazione Orale

ABSTRACT

Determination of anti-sars-cov-2 antibodies in salivary samples from vaccinated individuals and COVID-19 patients

Introduction: Saliva is a promising biological fluid to be used for measuring a number of analytes. Aim of this paper is to verify if salivary anti-SARS-CoV-2 antibodies determination could be suitable for monitoring the viral spread and vaccination efficacy during the COVID-19 epidemic.

Methods: a total of 69 subjects were enrolled at the Padova University Hospital: 39 COVID-19 patients and 30 health care workers (HCW), who underwent a complete vaccination cycle with BNT162b2. All subjects collected a salivary sample, using Salivette, (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Germany). For 9 HCW, salivary samples were collected at three different times within the same day. A serum sample was also obtained for all individuals. Salivary COVID-19 N/S1 RBD (sal-IgG) and serum anti-SARS-CoV-2 S-RBD IgG Ab (ser-IgG) were used for determining anti SARS-CoV-2 antibodies. **Results:** positive sal-IgG were found in 67/69 (97.1%) samples; in serum samples, the positivity for ser-IgG was found in 68/69 (98.6%). The sal-IgG median levels differed from COVID-19 to vaccinated HCW, being 0,21 kAU/L in patients samples and 0,8 kAU/L in vaccinated HCV samples ($p = 0.030$). Median levels for ser-IgG in COVID-19 and patients vaccinated HCW were 121 kBAU/L and 940 kBAU/L ($p < 0.001$) respectively. A statistically significant correlation was found between ser-IgG levels and time post-vaccination in HCW ($\rho = -0.6292$, $p < 0.001$). Sal-IgG levels were not influenced by the daytime of collection ($\rho = 0.148$, $p = 0.373$). Passing-Bablok regressions showed that sal-IgG and ser-IgG comparability was assessable only when ser-IgG values were divided by 1000, showing slope and intercept values of 0.016 (95%CI: 0.016-0.078) and 0,221 (95%CI: -0.097 to 0.786), respectively.

Conclusions: sal-IgG are detectable both in COVID-19 and in vaccinated individuals and the values are not influenced by the daytime of collection. As expected sal-IgG were much lower than ser-IgG.

Parole chiave: saliva, SARS-CoV-2, anticorpi

INTRODUZIONE

Un nuovo virus, classificato come 2019 Nuovo Coronavirus dalla Organizzazione Mondiale della Sanità e come Sindrome Respiratoria Acuta Grave da Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) dal gruppo di studio dei coronavirus della Commissione Internazionale per la Tassonomia dei Virus, si è diffuso a livello mondiale dal 2020, provocando quella che oggi è definita malattia da Coronavirus 2019 (COVID-2019). Il principale, caratteristico segnale clinico è la sindrome da distress respiratorio che può provocare sia sintomi lievi ma anche severi quando vi è la comparsa

della “tempesta citochinica” (1) con conseguente disfunzione multiorgano e in alcuni casi, morte. La diagnosi eziologica è basata sull'identificazione dell'RNA virale attraverso la tecnica RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction), in campioni prelevati dalle alte vie respiratorie (attraverso tamponi oro-faringei e naso faringei) o dalle basse vie respiratorie (espettorato o lavaggio bronco-alveolare) (2).

Nelle ultime decadi la matrice salivare è stata sempre più utilizzata per la valutazione di molti aspetti della salute umana. Essa è composta da una miscela molto complessa di secrezioni dalle differenti ghiandole salivari, cellule

Corrispondenza a: Chiara Cosma, Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale - Università di Padova, Email: chiara.cosma@aopd.veneto.it

Ricevuto: 19.08.2022

Revisionato: 11.09.2022

Accettato: 27.10.2022

Pubblicato on-line: 18.11.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.072

epiteliali orali desquamate, fluido crevicolare gengivale e da diversi tipi di microorganismi. Può contenere un gran numero di proteine come immunoglobuline, mucine, enzimi, così come elettroliti, ormoni e metaboliti. Questa sua composizione naturale facilita l'individuazione di patogeni ma anche la quantificazione di biomarcatori che possono fornire indicazioni riguardo allo stato immunologico, endocrinologico, infiammatorio e metabolico dell'individuo. In alcuni casi, il suo valore per rilevare i cambiamenti fisiopatologici è simile o, addirittura, superiore al siero, basti citare come esempio il cortisolo (3) e l'alfa amilasi (4).

L'utilizzo della matrice salivare per rilevare l'infezione attiva da COVID-19 è attualmente ormai consolidata sia con la tecnica molecolare RT-PCR sia con immunodosaggi enzimatici chemiluminescenti in piattaforme altamente automatizzate (5-7). Essa infatti presenta alcune caratteristiche favorevoli: è facile, veloce, economica da raccogliere, consentendo una esecuzione diffusa degli esami; il paziente stesso può raccogliercela autonomamente a casa, riducendo di conseguenza l'esposizione degli operatori sanitari ad infezioni nosocomiali; ed infine è idonea a campionamenti seriali su larga scala per studi epidemiologici e test di screening in virtù delle caratteristiche che la rendono particolarmente adatta a specifiche popolazioni come quella geriatrica o pediatrica. A causa di queste specifiche caratteristiche l'attenzione è stata recentemente rivolta a questo tipo di matrice per la valutazione della risposta anticorpale. Gli anticorpi, infatti, giocano un ruolo chiave nella neutralizzazione del virus ma anche forniscono una protezione all'ospite contro una possibile reinfezione. Le matrici dove è stata più ampiamente studiata la risposta anticorpale all'infezione da SARS-CoV-2 sono sangue, siero e plasma di pazienti affetti da COVID-19 per poter ottenere così il maggior numero di informazioni possibile riguardo alla risposta immunitaria dell'ospite (8). Particolare importanza rivestono gli anticorpi contro la proteina S (SPIKE), in quanto questa glicoproteina trimerica ospita il dominio di legame al recettore (RBD). L'RBD facilita l'accesso del SARS-CoV-2 alle cellule umane legandosi all'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE-2) ed è stato dimostrato che gli anticorpi neutralizzanti colpiscono i domini RBD o sono diretti contro la proteina del nucleocapside (N), unica proteina in grado di legarsi al genoma virale e proprio per questa sua caratteristica ha un ruolo chiave nel processo di confezionamento dell'RNA virale all'interno dei nuovi virioni.

Scopo di questo studio è di valutare se la matrice salivare possa essere utile per rilevare la presenza di anticorpi anti-SARS-CoV-2 considerando la semplicità della raccolta di questa matrice. Un secondo obiettivo è quello di capire se la tempistica della raccolta della saliva possa influenzare l'entità del titolo anticorpale.

METODI

Popolazione reclutata

Si tratta di 69 soggetti di cui 39 pazienti convalescenti

COVID-19 (non ancora sottoposti al ciclo vaccinale) che includono alcuni pazienti pediatrici e 30 operatori sanitari (esenti da precedente infezione da COVID-19 e sottoposti a screening aziendale con tampone oro-faringeo ogni 2 settimane) sottoposti alle prime due dosi di vaccino BNT162b2, BioNtech/Pfizer (eseguite a distanza di 21 giorni l'una dall'altra).

Nove operatori sanitari hanno raccolto la saliva in tre momenti differenti della stessa giornata (prima mattina 8:30-10:00, tarda mattina 10:30-12:00, pomeriggio). La popolazione è stata reclutata nell'arco temporale dei primi tre mesi dell'anno 2021. Come dati anamnestici sono stati raccolti l'età, il sesso e il tempo trascorso dall'insorgenza dei sintomi o il tempo trascorso dalla data della prima vaccinazione. Eventuali altre patologie sono state escluse.

Modalità di raccolta dei campioni e fase preanalitica

I partecipanti allo studio sono stati educati riguardo alla modalità di raccolta della saliva: evitare di mangiare, bere e di eseguire la normale igiene orale almeno 1 ora prima della raccolta, e di tenere in bocca il tamponcino contenuto all'interno del dispositivo Salivette (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Germania, ref. 51.1534) per 1 minuto. Come dato aggiuntivo è stata richiesta l'ora di esecuzione della raccolta. Nello stesso giorno della raccolta salivare la popolazione reclutata è stata sottoposta anche ad un prelievo venoso per l'esecuzione del test sierologico SARS-CoV-2 S-RBD IgG (utilizzando come provetta la BD Vacutainer SSTTM II Advance, ref. 367953). Tutti i soggetti reclutati per questo studio hanno firmato uno specifico Consenso Informato in accordo con la dichiarazione di Helsinki, come emendata nel 2013.

La fase preanalitica per il trattamento della saliva, prevede una centrifugazione a del dispositivo Salivette contenente il tamponcino di 4000 giri per 5 minuti. La contaminazione ematica della saliva è stata esclusa con valutazione visiva effettuata su tutti i campioni dopo la centrifugazione.

La matrice salivare è stata conservata -20°C mentre la matrice sierica è stata conservata a -80 °C fino al giorno dell'esecuzione degli esami.

Metodi di analisi nella matrice salivare e sierica

La misura della quantità di anticorpi IgG presenti nella saliva (sal-IgG) è stata effettuata con una metodica ELISA (RayBiotech, RayBiotech Life, Inc., Peachtree Corners, GA 30092) che fornisce un dato quantitativo degli anticorpi contro la proteina nucleocapside (N) e RBD, sito legante il recettore (RBD, Receptor-Binding Domain) presente nella subunità S1 della proteina spike (S). Questo metodo utilizza una piastra rivestita con porzioni delle proteine N e S1-RBD di SARS-CoV-2, le quali poi si combinano con gli anticorpi presenti nel campione. Dopo un 1 ora di incubazione, la piastra viene sottoposta ad una serie di lavaggi e subito dopo viene aggiunto in ogni pozzetto l'anticorpo biotinilato

IgG. Segue una breve incubazione di 30 minuti seguita da una serie di lavaggi e dall'aggiunta della soluzione di HPR (perossidasi di rafano)-streptavidina. Dopo un'ulteriore incubazione di 30 minuti e una serie di ulteriori lavaggi, viene aggiunta la soluzione di substrato TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) ed infine, dopo un'incubazione di 15 minuti, viene aggiunta la soluzione acida per bloccare la reazione. La stessa procedura viene eseguita in un'altra piastra rivestita con albumina umana che è usata come bianco. I risultati della piastra rivestita con l'albumina devono essere sottratti a quelli ottenuti dalla piastra rivestita con le proteine N/S1-RBD SARS-CoV-2 IgG.

L'analisi su siero SARS-CoV-2 S-RBD IgG (ser-IgG) è stata eseguita utilizzando la piattaforma automatizzata Maglumi 2000 Plus (ditta SNIBE Diagnostic REF 130219017M) che sfrutta il principio della chemiluminescenza con particelle paramagnetiche rivestite con antigene ricombinante S-RBD (9).

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata eseguita utilizzando il programma GraphPad Prism (Versione 9.1). L'età dei soggetti (in anni), e i valori di COVID-19 N/S1-RBD IgG salivari (sal-IgG) in kAU/L e di SARS-CoV-19 S-RBD IgG sieriche (ser-IgG) in kBAU/L vengono espressi come mediana e intervallo interquartile (IQR). I test non parametrici (Kruskall-Wallis) sono stati utilizzati per valutare la significatività statistica, mentre per valutare il grado di relazione tra due variabili è stato usato il coefficiente di correlazione non parametrico di Spearman. L'analisi di Passing-Bablok è stata eseguita tramite il software MedCalc v19.5.0 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium).

RISULTATI

La popolazione di pazienti che avevano avuto la malattia presentava un'età mediana 40,9 anni (IQR, 19,4-50,9), mentre la popolazione dei soggetti vaccinati aveva un'età mediana di 52 anni (IQR, 26-57). I livelli mediani degli anticorpi COVID-19 N/S1-RBD sal-IgG differivano statisticamente tra i due gruppi, ossia tra i pazienti

Tabella 1

Età e concentrazione degli anticorpi salivari e sierici nella popolazione studiata. I dati sono espressi come mediana e intervallo interquartile. Il valore decisionale è $>0,05$ (anticorpi salivari) e $>4,33$ (anticorpi sierici).

	Pazienti COVID-19	Operatori Sanitari	
Età (anni)	40,9 (19,4-50,9)	52 (26-57)	p <0,001
sal-COVID-19 N/S1-RBD IgG kAU/L	0,21 (0,12 - 0,36)	0,8 (0,2-1,16)	p=0,03
ser-SARS-CoV-2 S-RBD IgG kBAU/L	121 (19,9-341,7)	940 (561-1826,8)	p <0,001

sal-COVID-19 N/S1-RBD, anticorpi salivari; ser-SARS-CoV-2 S-RBD, anticorpi sierici.

COVID-19 e gli operatori sanitari sottoposti alle prime due dosi di vaccino, in quanto erano rispettivamente di 0,21 kAU/L e 0,8 kAU/L ($p=0,030$). La stessa differenza, si è notata nei valori mediani dei valori di SARS-CoV-2 S-RBD ser-IgG che erano di 121 kBAU/L per i soggetti COVID-19 e di 940 kBAU/L per gli operatori sanitari ($p <0,001$) (Tabella 1).

Considerando il valore soglia di reattività agli anticorpi per le due le analisi ($>0,05$ kAU/L per COVID-19 N/S1-RBD sal-IgG e $>4,33$ kBAU/L per SARS-CoV-2 S-RBD ser-IgG) la popolazione è risultata essere positiva al 97,1 % (67 su 69 soggetti) per le sal-IgG e al 98,6% (68 su 69 soggetti) per le ser-IgG. Il tempo trascorso dall'insorgenza dei sintomi e/o il tempo trascorso dalla prima dose vaccinale sono state due variabili considerate in questo studio, sia per quanto riguarda le sal-IgG sia per quanto riguarda le ser-IgG (Figura 1a e 1b). Per quanto riguarda le sal-IgG si è notato che il livello di questi anticorpi non era influenzato né dal tempo trascorso dall'insorgenza dei sintomi ($\rho=0,0267$, $p=0,986$) né dal tempo trascorso post-vaccino (ρ di Spearman $=-0,147$, $p=0,402$) (Figura 1a). I valori delle ser-IgG e sal-IgG non erano condizionati dal tempo intercorso dall'insorgenza dei sintomi (ρ di Spearman $=0,102$, $p=0,419$), mentre invece erano fortemente correlati con il tempo trascorso dalla prima vaccinazione ($\rho=-0,6292$, $p <0,001$) (Figura 1b). Inoltre, dallo studio è emerso che, pur con il limite della bassa numerosità dei campioni (9 soggetti) i livelli delle sal-IgG non erano influenzati dal momento della raccolta ($\rho=0,148$, $p=0,373$). L'analisi di regressione di Passing-Bablok ha dimostrato che vi è una buona comparabilità tra i valori di sal-IgG salivari e ser-IgG solo quando quest'ultimi erano divisi per un fattore 1000, con una pendenza ed una intercetta di 0,016 [intervallo di confidenza al 95% (95%IC:0,016-0,078)] e 0,221 (95%IC:0,097-0,786), rispettivamente (Figura 2).

DISCUSSIONE

Questo studio preliminare ha esaminato la risposta anticorpale salivare in una popolazione selezionata composta da soggetti convalescenti dall'infezione da COVID-19 e da soggetti sottoposti a vaccinazione

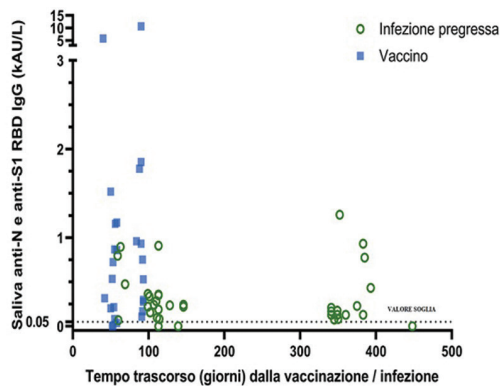


Figura 1a

Correlazione tra i valori di anti- COVID 19N/S1 -RBD IgG salivari (kAU/L) e il tempo trascorso dalla vaccinazione/infezione

(BNT162b2, BioNtech/Pfizer), con lo scopo di verificare se il metodo scelto possedesse una sensibilità adeguata basata sul valore soglia proposto dal produttore. Questa dimostrazione è fondamentale in quanto la letteratura scientifica è concorde nell'affermare la bassa concentrazione di anticorpi nella saliva (10). Questa esperienza ha evidenziato come le sal-IgG fossero rilevabili in entrambe le categorie di persone reclutate per questo studio. La prima osservazione che possiamo fare è la riconferma dei dati della letteratura scientifica che riporta come i valori degli anticorpi nella saliva, in particolare le IgG fossero da 800 a 1000 volte più bassi dei valori nel siero (10). L'analisi di regressione di Passing-Bablok ha dimostrato una correlazione significativa tra i valori di ser-IgG e di sal-IgG. Una differenza da sottolineare è che mentre le concentrazioni di sal-IgG non erano influenzate né dal tempo di insorgenza dei sintomi né dal tempo trascorso dalla prima dose vaccinale, gli anticorpi ser-IgG, invece, erano fortemente correlati con il tempo trascorso dalla prima vaccinazione

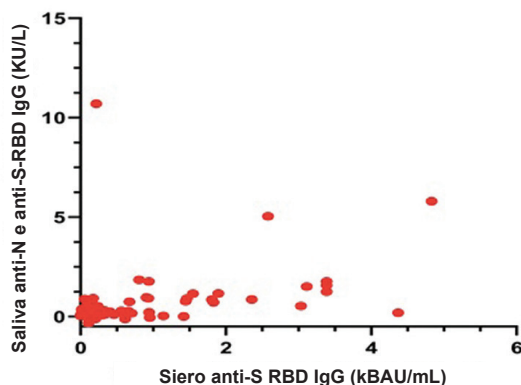


Figura 2

Anticorpi salivare e sierici: regressione di Passing-Bablok.

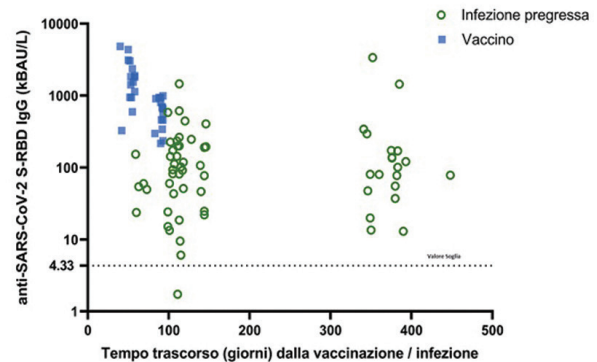


Figura 1b

Correlazione tra i valori di anti-SARS-CoV-2- RBD IgG (kBAU/L) sierici e il tempo trascorso dalla vaccinazione/infezione

(11). Questo diverso comportamento degli anticorpi ser-IgG tra la popolazione dei vaccinati nella quale vi è una forte associazione tra reattività sierica e tempo trascorso dalla vaccinazione e la popolazione con precedente infezione da COVID-19, nella quale invece non c'è questa correlazione (infatti si trovano titoli anticorpali elevati anche a distanza di mesi dall'infezione) è supportata dalla letteratura scientifica (12,13). Da questa casistica, seppur di bassa numerosità, è emerso che il tempo di raccolta del campione salivare non risulta una variabile che possa influenzare la concentrazione degli anticorpi in esame. Questa osservazione gioca un ruolo in favore di questa matrice soprattutto se si ipotizza il suo utilizzo in una popolazione pediatrica o fragile, all'interno della quale la raccolta del campione può avvenire durante una visita ambulatoriale effettuata in orari diversi del giorno. Il nostro studio ha utilizzato la saliva raccolta tramite dispositivo Salivette; recentemente è stato pubblicato un lavoro di Martinez-Subiela et al. (14) contenente dati in accordo a quelli ottenuti in questo lavoro relativamente alla più bassa concentrazione di anticorpi presenti nella saliva rispetto al siero: Tuttavia il lavoro citato evidenzia una differenza di concentrazione anticorpale tra la saliva raccolta con Salivette e l'escreato passivo; in quest'ultimo vi è infatti una concentrazione anticorpale più elevata e quindi una migliore correlazione con i dati sierici.

Questi risultati preliminari sono di stimolo per proseguire in questo percorso affinché la misura degli anticorpi salivari possa a breve quanto meno affiancarsi all'analisi sierica.

Questo studio presenta alcune limitazioni e carenze che potranno essere affrontate in successive sperimentazioni quali: la valutazione della specificità del test, della ripetibilità e della riproducibilità, nonché una casistica non particolarmente numerosa.

In questo studio non sono state prese in considerazione altre classi di anticorpi poiché oggetto di un altro studio del nostro gruppo (15).

In conclusione, questi risultati dimostrano che la determinazione degli anticorpi anti SARS-CoV-2 su matrice salivare potrebbe essere impiegata con successo, in alternativa o in aggiunta alla matrice sierica, soprattutto in specifici contesti in cui il prelievo venoso possa essere problematico (14,16).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Lippi G, Plebani M. Cytokine "storm", cytokine "breeze", or both in COVID-19? *Clin Chem Lab Med* 2020;59:637-9.
2. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1070-6.
3. Antonelli G, Ceccato F, Artusi C et al. Salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome. *Clin Chim Acta* 2015;451:247-51.
4. Strahler J, Skoluda N, Kappert MB et al. Simultaneous measurement of salivary cortisol and alpha-amylase: Application and recommendations. *Neurosci Biobehav Rev* 2017;83:657-77.
5. Wang Y, Upadhyay A, Pillai S, et al. Saliva as a diagnostic specimen for SARS-CoV-2 detection: A scoping review. *Oral Dis* 2022;21-26.
6. Basso D, Aita A, Padoan A et al. Salivary SARS-CoV-2 antigen rapid detection: A prospective cohort study. *Clin Chim Acta* 2021;517:54-9.
7. Kaczor-Urbanowicz KE, Carreras-Presas CM, Aro K, et al. Saliva diagnostics – Current views and directions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2017;242:459-472.
8. Padoan A, Bonfante F, Pagliari M et al. Analytical and clinical performances of five immunoassays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in comparison with neutralization activity. *EbioMedicine* 2020;62:103101.
9. Padoan A, Bonfante F, Cosma C et al. Analytical and clinical performances of a SARS-CoV-2 S-RBD IgG assay: comparison with neutralization titers. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:1444-52.
10. Granade TC, Phillips S K, Parekh B et al. Detection of antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in oral fluids: a large-scale evaluation of immunoassay performance. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:171-15.
11. Padoan A, Dall'Olmo L, Della Rocca F et al. Antibody response to first and second dose of BNT162b2 in a cohort of characterized healthcare workers. *Clin Chim Acta* 2021;519:60-3.
12. Tu M, Chiang S, Richard Bender R et al. The Kinetics of COVID-19 Vaccine Response in a Community Vaccinated Population. *J Immunol* 2022;208:819-26.
13. Isho B, Abe KT, Zuo M et al. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci Immunol* 2020;5:eabe5511.
14. Martínez-Subiela S, Franco-Martínez L, Rubio C P et al. Measurement of anti SARS-CoV-2 RBD IgG in saliva: validation of a highly sensitive assay and effects of the sampling collection method and correction by protein. *Clin Chem Lab Med* 2022;60:1683-9.
15. SARS-CoV-2 identification and IgA antibodies in saliva: One sample two tests approach for diagnosis. Aita A, Basso D, Cattelan A M et al. *Clin Chim Acta* 2020;510:717-22.
16. Di Chiara C, Cantarutti A, Costenaro P et al. Long-term Immune Response to SARS-CoV-2 Infection Among Children and Adults After Mild Infection. *JAMA Netw Open*, 2022;5:e2221616.