



## 2ª Giornata nazionale per la sicurezza delle cure e della persona assistita

17 Settembre 2020



### **UN CONTRIBUTO DI O.N.B. PER LA GIORNATA NAZIONALE PER LA SICUREZZA DELLE CURE E DELLA PERSONA ASSISTITA del 17.09.2020**

#### **Significato e applicazione dei *test* sierologici per SARS-CoV-2**

##### **Introduzione**

Il contributo di O.N.B. per la Giornata Nazionale per la Sicurezza delle Cure e della persona assistita del 17 settembre 2020 si propone di offrire un breve documento di approfondimento su un tema certamente molto discusso e critico, che sta generando dibattiti serrati tra i professionisti e dubbi nelle persone che stanno vivendo con preoccupazione l'attuale fase pandemica. Il contributo si fonda su uno specifico approfondimento prodotto dalla maggiore Società Italiana di Microbiologia Clinica, ovvero l'AMCLI, attualmente presieduta dal dr. Pierangelo Clerici.

La ricerca degli anticorpi specifici contro SARS CoV-2 è l'approccio diagnostico complementare alla ricerca diretta del virus o delle sue componenti, ed è in grado di fornire informazioni diverse e, esse stesse, complementari alle indagini biomolecolari. Infatti, mentre il virus (rilevato mediante *test* molecolare o antigenico) è evidenziabile nelle prime fasi dell'infezione, gli anticorpi vengono prodotti a partire da 7-10 giorni dopo l'esordio dei sintomi, e possono permanere per lungo tempo. Solo recentemente sono emersi dati, ancora preliminari, sull'entità e sulla durata della risposta anticorpale al SARS CoV-2, che sono maggiori nei soggetti che hanno presentato sintomatologia più grave, mentre la risposta anticorpale sembra molto evanescente nei soggetti paucisintomatici e asintomatici.

Mentre per molte infezioni la presenza degli anticorpi è testimonianza di immunità protettiva, al momento non è chiaro, se questo sia vero anche per COVID-19. La risposta a questo interrogativo è fondamentale per dare significato completo alla rilevazione degli anticorpi anti-SARS CoV-2 e per attuare la strategia vaccinale. Tuttavia, anche se al momento la presenza degli anticorpi contro il SARS CoV-2 non può essere considerata come indice di immunità protettiva, essa è sicura prova dell'avvenuto contatto con il virus.

Dal momento che, nei soggetti che si sono infettati, gli anticorpi permangono anche dopo la scomparsa del virus, i *test* che evidenziano la presenza di anticorpi specifici costituiscono un ottimo strumento per identificare le persone che si sono infettate, e quindi può aiutare a completare la diagnosi nei casi in cui non si disponga di un *test* molecolare positivo, ed a stimare l'avvenuta circolazione del virus nella comunità: quindi, costituiscono uno strumento epidemiologico fondamentale.

Non sono disponibili ad oggi evidenze conclusive in merito alla cinetica di comparsa delle varie classi di anticorpi (IgM, IgG ed IgA) nell'infezione da SARS CoV-2, con discrepanze derivanti in parte dalle diverse metodologie utilizzate, in parte dalla variabilità individuale e, probabilmente, anche dall'epidemiologia locale delle infezioni determinate da diversi Coronavirus. Infatti, alcuni lavori scientifici indicano la classica

sequenza, con la comparsa precoce delle IgM seguita da quella delle IgG, in altri casi viene riportato come la comparsa delle IgG preceda o si sovrapponga a quella delle IgM, mentre per le IgA le evidenze sono ancora limitate.

## Le tipologie di test sierologici

Al momento esistono due macro-tipologie di test sierologici:

- test rapidi
- test sierologici convenzionali

I **test rapidi** sono basati sul prelievo di sangue capillare mediante puntura al polpastrello, e si basano su dispositivi di semplice uso, che rilevano la presenza di IgG e di IgM. In genere sono test qualitativi, e la rilevazione viene effettuata o “a vista” o mediante la lettura di un segnale fluorescente mediante un lettore.

Per quanto riguarda le caratteristiche generali di *performance* e di semplicità di esecuzione, i test rapidi sono sicuramente semplici da usare, non richiedendo attrezzature specifiche né personale esperto, ma hanno caratteristiche di *performance* più scadenti rispetto ai test convenzionali: pertanto, il loro impiego non è sostitutivo di quello dei test convenzionali, ma è accettato – a condizione che chi è chiamato ad interpretarne i risultati sia ben conscio dei limiti della metodica - in talune condizioni particolari: nelle situazioni di difficoltà di effettuazione dei prelievi, nei casi in cui sia richiesta una risposta rapida e preliminare, quando non sia possibile effettuare il prelievo venoso e quando non sia possibile ricorrere a un laboratorio specializzato. Rimangono, tuttavia, aperti – per criticità di valenza medico-legale – il capitolo della refertazione del risultato del test e delle azioni conseguenti ad esiti di positività, se esso è effettuato “a vista” da persone non necessariamente identificabili quale personale sanitario oppure non afferenti ad un laboratorio. Si segnala, inoltre, che il risultato positivo ottenuto con un test rapido dovrebbe essere confermato ripetendolo con un test convenzionale.

I test rapidi, proprio per le loro caratteristiche tecniche, sono solamente **qualitativi**, e sono di solito caratterizzati da **sensibilità subottimale** (in particolare per IgM), assolutamente variabile da sistema a sistema, mentre la loro specificità è considerata in genere soddisfacente; la lettura è “operatore-dipendente”, salvo che per le versioni con lettura in fluorescenza in grado di garantire anche informazioni semiquantitative. Inoltre, i test rapidi con rilevazione “a vista” - che sono i più diffusi nella categoria dei test rapidi - generalmente non sono interfacciabili con LIS e, quindi, la loro tracciabilità è minima.

L'interpretazione del significato clinico ed epidemiologico dei risultati del test rapido non può non tener conto della loro sensibilità subottimale, né del contesto di prevalenza della condizione. In genere il potere predittivo positivo verso un'avvenuta infezione (non verso un'infezione in atto) è elevato, mentre è considerato basso il potere predittivo negativo.

Il censimento dei test sierologici rapidi disponibili sul mercato mondiale annovera prodotti di moltissime aziende: l'affidabilità diagnostica, oltre a quanto sopra citato, dipende anche, in modo assolutamente significativo, dal singolo produttore; inoltre la disponibilità del marchio CE – obbligatorio per legge quale *conditio sine qua non* per la commercializzazione – non è di per sé requisito sufficiente di qualità analitica.

I **test sierologici convenzionali** si basano, invece, sul prelievo di sangue venoso e comportano la rilevazione di anticorpi delle varie classi immunoglobuliniche (IgG, IgM e IgA) mediante un metodo immunoenzimatico o in chemiluminescenza. La rilevazione può essere quantitativa. Le piattaforme strumentali attualmente disponibili consentono livelli di automazione di grado più o meno elevato, con conseguente ricaduta sulla

processività, sul trasferimento dei risultati e sulla relativa tracciabilità nel sistema informatico di laboratorio (LIS).

Fra le tecniche convenzionali classiche va anche annoverata l'immunofluorescenza indiretta (IFA), che viene eseguita utilizzando cellule infette depositate su un vetrino per microscopia, alle quali si legano gli anticorpi. Questi vengono rilevati mediante marcatura con fluorocromi e vengono letti al microscopio a fluorescenza. La quantificazione viene eseguita grazie a diluizioni seriali del siero in esame, e possono essere riconosciute tutte e tre le classi di immunoglobuline. La lettura dei *test* IFA richiede personale molto

esperto e, inoltre, non essendo al momento disponibili metodi commerciali, la preparazione dei vetrini richiede la coltivazione del virus in laboratorio di biosicurezza di livello 3 (BSL3). Per tale motivo l'utilizzo di tale tecnologia è assolutamente limitato, di fatto, nella pratica diagnostica.

Questi metodi permettono di rilevare e misurare gli anticorpi, ma non forniscono informazioni sul loro potere protettivo, per la cui determinazione bisogna ricorrere alla tecnica virologica classica della "sieroneutralizzazione", che misura *in vitro* la capacità degli anticorpi di bloccare la replicazione virale. Trattandosi di un *test* che si basa sull'infettività del virus, può essere eseguito soltanto in BSL3, e richiede personale esperto nella coltura del virus. Inoltre non si presta all'automazione e alla tracciabilità delle varie fasi. Per tale motivo, l'utilizzo anche di tale tecnologia è assolutamente limitato nella pratica diagnostica.

Immunofluorescenza e sieroneutralizzazione non sono compatibili con l'automazione, e richiederebbero – qualora eseguiti – anche l'immissione manuale dei risultati nel LIS.

Il mercato dei *test* sierologici classici per SARS CoV-2 è in rapida evoluzione, con prodotti già disponibili, anche dotati di marchio CE, e prodotti in corso di sviluppo da parte di molte aziende note e largamente diffuse fra i laboratori del sistema sanitario. I dati disponibili indicano una certa variabilità fra i sistemi, dipendente dal tipo di antigene e dalla tecnologia di visualizzazione dell'avvenuto legame antigene- anticorpo. Questo fa sì che, benché vi sia una correlazione fra i risultati dei vari *test* sierologici, i risultati ottenuti con un metodo non siano sempre assolutamente sovrapponibili con i risultati ottenuti con altri metodi.

Inoltre, va sottolineato ancora una volta che la presenza di anticorpi non equivale a protezione: gli unici anticorpi protettivi sono quelli misurati con il *test* di neutralizzazione. Tuttavia è possibile ricavare indicazioni indirette sul potere neutralizzante degli anticorpi. L'antigene utilizzato per la ricerca degli anticorpi tramite metodo immunoenzimatico o in chemiluminescenza determina la correlazione con il potere neutralizzante degli anticorpi, in quanto questo è direttamente dipendente dal legame dell'anticorpo alla proteina S (*Spike*) del virus che si lega al recettore cellulare ACE-2 e determina l'avvio dell'infezione. Gli anticorpi diretti verso antigeni diversi da S mostrano una correlazione inferiore con il potere neutralizzante. Per tale motivo è importante che sul referto del *test* sierologico sia riportata l'indicazione – oltre che del metodo analitico – anche della tipologia di antigene verso cui sono rivolti gli anticorpi (S1, S2, nucleocapside, altro) e della classe anticorpale rilevata.

#### **Applicazione dei *test* sierologici con riferimento alla classe di individui potenzialmente beneficiari dei *test***

In generale, riguardo all'utilizzo dei *test* sierologici per scopi diagnostici bisogna tenere in considerazione

che:

- - le diverse classi di immunoglobuline sono prodotte in tempi diversi: gli studi attualmente disponibili nel caso di COVID-19, fatti salvi pochi studi scientifici e *case report*, non consentono ancora certezze sull'intervallo temporale né sulla sequenza della loro comparsa;
- - si tratta di *test* indiretti, che mettono in evidenza la risposta del sistema immunitario all'infezione, e **non rilevano direttamente la presenza del virus nell'ospite**; in altre parole, **il rilevamento di anticorpi specifici non è indicativo di un'infezione in atto**;

- - le evidenze ad oggi disponibili indicano che, indipendentemente dal loro ordine di comparsa (IgM vs IgG vs IgA), la positivizzazione degli anticorpi nei soggetti che contraggono l'infezione **non coincide con la fine della replicazione virale nelle vie respiratorie**. Si sono osservati, infatti, periodi di **coesistenza anche lunghi più di 2 settimane**. Al momento, non è chiaro se vi siano differenze

solo nella durata di tale sovrapposizione fra i soggetti sintomatici ed i soggetti asintomatici, oppure in base alla durata del periodo di incubazione oppure, ancora, alla severità della manifestazione clinica;

- - **l'entità e la durata** della risposta anticorpale al SARS CoV-2 sono maggiori nei soggetti che hanno presentato sintomatologia più grave, mentre sembrano molto evanescenti nei soggetti paucisintomatici e asintomatici;
- - la rilevazione degli anticorpi non permette di stabilire se il virus è ancora in fase replicativa: quindi, **un risultato negativo del test anticorpale non esclude né la possibilità di un'infezione in atto** in fase precoce né il relativo rischio di contagiosità del singolo individuo;
- - non è noto se la presenza delle immunoglobuline di classe G garantisca protezione dalla reinfezione, né si conosce la durata della protezione nel tempo;
- - poiché le preparazioni antigeniche non sono uguali nelle formulazioni dei diversi test disponibili in commercio, la corrispondenza dei risultati tra test diversi non è scontata; inoltre il marchio CE non è garanzia di *performance* adeguate. Dunque, perché un test sierologico sia considerato affidabile è necessario che la sua *performance* diagnostica sia validata in studi indipendenti, confrontata verso un test considerato *gold standard* o, comunque, considerato di riferimento.

Sebbene i test sierologici - come indicato dai maggiori organismi di sanità pubblica nazionali e internazionali - non possano, allo stato attuale dell'evoluzione tecnologica, sostituire il test molecolare basato sulla rilevazione di RNA virale nei tamponi nasofaringei nell'identificazione dei soggetti che hanno contratto l'infezione nelle fasi precoci, essi sono comunque fondamentali nella ricerca e nella valutazione epidemiologica della circolazione virale; quindi, potrebbero trovare applicazione nel:

- determinare la sieroprevalenza dell'infezione da SARS CoV-2:
  - nella popolazione generale (solo sulla base di campionamenti organizzati con arruolamenti statisticamente definiti su base scientifica);
  - in contesti particolari, quali comunità chiuse, residenze assistite, strutture sanitarie, carceri, ecc.
- definire l'esposizione a SARS CoV-2 di soggetti per i quali non sono disponibili dati precedenti, quale è la sintomatologia compatibile con un quadro di COVID 19 oppure la mancata effettuazione del test molecolare. In particolare:
  - identificare in via preliminare operatori sanitari che hanno già contratto l'infezione, e l'hanno possibilmente superata, sperabilmente riducendo al minimo il rischio di diffusione virale a colleghi ed altri pazienti;
  - porre diagnosi eziologica di COVID 19 in pazienti che abbiano presentato sintomatologia suggestiva, in assenza di possibilità di conferma microbiologica ("tamponi" negativo o non eseguito).

In tutti i casi, tuttavia, la valutazione sierologica va integrata con la valutazione di rischio.

**Applicazione dei test con riferimento alla classe di individui potenzialmente beneficiari del test sierologico (e, in minor misura, capillare)**

In relazione alla possibilità di utilizzo dei *test* sierologici per verificare lo stato di contagio, le applicazioni nei diversi *setting* ed il significato dei risultati vanno quindi differenziate in base alla prevalenza della condizione che si va ad indagare ed alle caratteristiche delle due tipologie di *test*. Nello specifico:

### **1. Sospetti sintomatici**

I *test* sierologici classici ed i *test* rapidi in genere risultano negativi nelle fasi precoci dell'infezione (entro 5-7 giorni dall'inizio dei sintomi): quindi sono privi di valore diagnostico. Essi vanno, pertanto, esclusi da possibili eventuali algoritmi diagnostici in fase precoce o acuta.

Va ricordato che, secondo le indicazioni dell'OMS, recepite dall'ECDC e dalle indicazioni del Ministero della Salute italiano, la diagnosi di laboratorio di elezione per l'infezione da SARS-CoV-2 rimane quella basata sul rilevamento diretto del virus nelle secrezioni del distretto respiratorio mediante *test* molecolari specifici (vedi: *Addendum*).

I *test* sierologici possono essere di ausilio nel determinare lo stato di infezione in quei casi in cui il tampone abbia dato risultato negativo a dispetto del forte sospetto clinico. Tuttavia, in questo caso, la valutazione deve essere effettuata retrospettivamente, verificando la sieroconversione in prelievi distanziati: quindi non è utile per la valutazione diagnostica alla presentazione clinica, ma solo ed esclusivamente a fini di sorveglianza. I **test sierologici classici** sono certamente i più indicati in questo caso, in quanto più sensibili di quelli capillari.

### **2. Contatti stretti di soggetti positivi.**

I *test* sierologici, indipendentemente dalla classe di immunoglobuline rilevate, possono identificare le persone che hanno già contratto l'infezione. La loro presenza può dare qualche indicazione sul tempo in cui è avvenuto il contagio, e quindi può contribuire a ricostruire l'ordine della catena di trasmissione. Non si può, però, prescindere dalla contemporanea ricerca dell'RNA virale nel tampone.

Le *performance* subottimali dei *test* rapidi ne sconsigliano fortemente l'utilizzo in questo contesto, mentre i *test* classici sono da considerarsi informativi. Non è chiaro se la presenza di IgM piuttosto che di IgG sia di aiuto nella collocazione temporale dell'infezione. Il significato delle IgA è ancora meno chiaro. La differenziazione delle classi anticorpali pare pertanto – al momento – non fondamentale ai fini diagnostici e, quindi, non costituisce requisito di scelta assoluto. Anche in questo caso i **test sierologici classici** sono i più indicati in quanto più sensibili di quelli capillari.

Tuttavia, nei casi in cui l'identificazione dei contatti che hanno già contratto l'infezione (non che hanno la malattia da infezione in atto, e che quindi sono contagiosi) richieda una risposta assolutamente immediata e non sia possibile raggiungere un laboratorio per l'esecuzione del *test*, **è possibile ricorrere ai test rapidi**, tenendone ben presenti i limiti di sensibilità e con la riserva di eseguire ulteriori controlli laddove possibile. Pare evidente che tale evenienza è, nella pratica diagnostica, in realtà limitata.

### **3. Screening su operatori ed individui asintomatici.**

I *test* sierologici sono informativi rispetto all'avvenuta infezione, ma – se l'esito è negativo - non danno informazioni né sull'eventuale fase di contagiosità del soggetto potenzialmente infettato ma che ancora non ha sviluppato anticorpi, né sull'eventuale "perdita" di anticorpi in un soggetto precedentemente paucio o asintomatico. Non danno informazione neppure – se l'esito è positivo - sullo stato di contagiosità dei soggetti testati, né sull'eventuale protezione conseguita.

Quindi, in questo contesto l'utilizzo dei *test* sierologici non serve a identificare i soggetti con infezione attiva, ma può informare sulla circolazione del virus nella comunità presa in considerazione. A sua volta, questa informazione può fornire utili indicazioni sulle misure collettive di contenimento da adottare o da mantenere.

Pare evidente, d'altra parte, che la pregnanza "scientifica" del risultato dei *test* sierologici in una data popolazione è strettamente correlata ai criteri di campionamento.

Purtroppo, al momento non è possibile sostenere con ragionevole certezza l'equazione: "presenza di anticorpi = presenza di immunità protettiva", né si hanno informazioni conclusive sulla durata della risposta anticorpale. Considerando la tipologia di *test*, **può essere preso in considerazione l'uso dei test rapidi solo a scopo di indagine di sieroprevalenza** esclusivamente nel caso in cui il campione da analizzare sia sufficientemente ampio e se la sensibilità, verificata mediante confronto con un *test* sierologico classico di riferimento, sia sufficientemente elevata (almeno 80%), avendo l'accortezza di correggere opportunamente la stima della frequenza.

In ogni caso, deve essere sottolineato che il contesto degli operatori sanitari è diverso da quello della popolazione generale di individui asintomatici. Infatti la probabilità di un'infezione attiva nella popolazione degli operatori sanitari, così come le conseguenze rispetto alla vulnerabilità dei pazienti assistiti, sono certamente più elevate rispetto alla popolazione generale e, quindi, la scelta della metodologia di *testing* più idonea va ragionata in funzione della probabilità *a priori* e del contesto sanitario in relazione alle conseguenze della circolazione asintomatica di un operatore infetto.

#### 4. Indicazioni in merito alle modalità di refertazione

Allo scopo di garantire omogeneità di comportamento, completezza ed armonizzazione delle informazioni contenute nel referto dei *test* sierologici, tenuto conto delle diverse possibilità che il mercato offre, si propongono queste indicazioni finalizzate a fornire l'adeguato supporto nel processo decisionale clinico salvaguardando la corretta interpretazione dei risultati del *test* sierologico:

- Nome del *test*: "Ricerca anticorpi anti SARS CoV-2"
- Classe di anticorpo: Ig totali, IgG, IgM, IgA
- *Target* dell'anticorpo: ad esempio ◊ anti-nucleocapside, anti-proteina S1, anti-proteina S1/S2, ecc.
- Metodica di rilevazione: ad esempio ◊ CLIA; ELISA; CMIA; IF; ecc.
- Esito del *test*:
  - per i *test* quantitativi o semiquantitativi deve essere indicata l'unità di misura e le soglie di positività e di negatività. In funzione del *test* in uso, se necessario, è opportuno indicare il *range* in cui il *test* dà un risultato dubbio o indeterminato;
  - per i *test* qualitativi deve essere indicato l'esito come: positivo o negativo. In funzione del *test* in uso, se previsto, dubbio o indeterminato.
- Commento all'esito del *test*, se:
  - positivo "Un risultato positivo deve essere interpretato in associazione con gli esiti clinici e l'eventuale ricerca del genoma virale su tampone rinofaringeo";
  - negativo "Un risultato negativo indica l'assenza o un livello molto basso di anticorpi diretti contro il virus; questo accade in assenza di infezione o durante il periodo di incubazione e negli stadi precoci della malattia, oppure negli stati di immunodepressione, o in caso di decadimento dei livelli anticorpali specifici"
  - dubbio "Si consiglia di ripetere l'esame fra una settimana".

#### 5. Conclusioni

Ai fini diagnostici, i *test* sierologici sono in grado di rilevare l'avvenuta infezione solo a partire da un certo numero di giorni dopo l'inizio dell'infezione, e quindi sono poco efficaci durante la fase iniziale di infezione, quando gli anticorpi non si sono ancora sviluppati. La sensibilità aumenta via via che ci si allontana

dall'esordio dell'infezione, superando il 95% di sensibilità dopo le prime due-tre settimane dal contagio. Per questo motivo l'OMS e tutti gli organismi impegnati nella risposta sanitaria danno l'indicazione di privilegiare i *test* per la ricerca diretta ai fini della diagnosi e gestione dei pazienti.

Ciò detto, si segnala che solo recentemente sono emersi dati sull'entità e sulla durata della risposta anticorpale al SARS CoV-2: essi sono maggiori nei soggetti che hanno presentato sintomatologia più grave, mentre sembrano molto evanescenti nei soggetti pauci- ed asintomatici. Queste osservazioni hanno due ordini di ricadute: la prima riguarda l'attendibilità dei dati di sieroprevalenza ottenuti su soggetti asintomatici per desumere l'entità della circolazione virale in una data popolazione, mentre la seconda riguarda la durata della protezione e ovviamente si riflette sulla previsione di efficacia dei vaccini. Solo l'accumulo di dati solidi e numerosi permetterà di inquadrare nella giusta prospettiva l'interpretazione dei dati sierologici nei riguardi di queste due importanti problematiche.

Deve essere comunque ricordato che la presenza degli anticorpi indica: "infezione avvenuta", ma non dà informazioni né sulla risoluzione dell'infezione né sulla presenza di immunità protettiva. Per questa ragione, nei contesti in cui sia necessario individuare le persone contagiose, il *test* sierologico da solo non è sufficiente, e deve essere abbinato al *test* di ricerca diretta (molecolare o antigenico). Inoltre, al momento, a causa delle ancora insufficienti evidenze scientifiche, non è prevista l'implementazione di algoritmi che prevedano l'uso consequenziale di più *test* sierologici.

In particolare, nei contesti sanitari e nelle comunità di persone fragili la limitazione insita nell'approccio sierologico va tenuta ben presente nell'interpretazione dei risultati, soprattutto se il quesito diagnostico riguarda l'individuazione delle persone contagiose.

Al fine di stabilire l'avvenuta circolazione del virus in vari contesti, invece, i *test* sierologici rappresentano l'approccio di scelta, e rispetto ai *test* molecolari - che forniscono una rappresentazione istantanea dello stato di infettività delle persone - riflettono, con i limiti sopra citati, l'avvenuta esposizione risalente anche ad un tempo relativamente remoto.

Mentre il genoma del virus è evidenziabile nelle prime fasi dell'infezione, gli anticorpi vengono prodotti a partire da 7-10 giorni dopo l'esordio dei sintomi, e possono permanere per lungo tempo. Non è ancora chiaro quanto duri tale permanenza, e solo l'esperienza che si accumulerà nel prossimo futuro potrà aiutare a comprendere questo aspetto.

Infine, mentre per molte infezioni la presenza degli anticorpi è testimonianza di immunità protettiva, al momento non è chiaro se questo sia vero anche per COVID 19. La risposta a questo interrogativo è fondamentale per dare significato completo alla rilevazione degli anticorpi anti-SARS CoV-2 e attuare la strategia vaccinale.

## **6. Addendum sull'approccio diagnostico nella strategia di contrasto a COVID-19**

- La diagnosi dell'infezione da SARS CoV-2 si basa sulla ricerca diretta del virus nelle vie aeree dei pazienti, effettuata principalmente con un *test* molecolare che rivela la presenza del genoma del virus nel tampone nasofaringeo o, nelle forme più gravi, nelle secrezioni profonde. Questa modalità operativa permette di identificare le persone che albergano virus in fase di replicazione nell'apparato respiratorio: è, quindi, considerato l'approccio primario nella strategia diagnostica. Altri campioni biologici, quali il sangue o le feci o il liquor cefalorachidiano (nei casi con presentazione neurologica), sono stati presi in considerazione come potenziale supporto della diagnosi, ma al momento le evidenze su presenza e significato del virus in tali

matrici biologiche sono non uniformi e univoche, e devono quindi essere scoraggiate nella pratica diagnostica routinaria. Invece la saliva si sta progressivamente affermando come un potenziale campione significativo per la ricerca del virus: potrebbe essere una valida alternativa al tampone, in quanto è meno invasivo e più facile da prelevare anche senza disporre di operatori particolarmente formati. **La validazione di questa tipologia di campione per i test molecolari è, tuttavia, ancora in corso**, e pare prematuro preconizzarne la sua introduzione quale materiale preferenziale per le indagini molecolari.

- Il censimento dei *test* molecolari per SARS CoV-2 mostra un mercato in rapida evoluzione, con molti prodotti disponibili, dotati di marchio CE, compatibili anche con sistemi automatizzati. Le frontiere più avanzate sono rivolte, poi, verso *test* molecolari a risposta rapida, con tecnologie basate, fra l'altro sull'amplificazione isotermica (es. LAMP).
- La ricerca molecolare richiede, in ogni caso, il supporto di un laboratorio esperto, e non si sposa bene con l'esigenza di effettuare elevate quantità di *test* e di garantire grande velocità di risposta, necessarie per attuare *screening* per grandi volumi di attività. Recentemente si è cominciato a dedicare grande attenzione ai *test* per la ricerca diretta del virus basati sulla rilevazione degli antigeni virali, *test* formulati anche con l'assetto di *test* rapidi. I *test* attualmente disponibili, compatibili con grandi volumi di attività e con applicazioni in contesti non medicalizzati (quali le campagne di *screening* in gruppi particolari di popolazione) hanno, tuttavia, minore sensibilità dei *test* molecolari dal punto di vista sia analitico che clinico, tali da sconsigliarne – ad oggi – l'introduzione quali *test* da utilizzare nella *routine* diagnostica. Tuttavia, i vantaggi connessi con la semplicità di esecuzione e la rapidità di risposta potrebbero, probabilmente, controbilanciare gli aspetti negativi legati alla ridotta sensibilità, anche in considerazione del fatto che si stanno accumulando evidenze che basse cariche virali, non evidenziate dai *test* rapidi, possano non essere rilevanti nel sostenere la trasmissione dell'infezione. Tuttavia, i limiti dei *test* antigenici rapidi devono essere ben conosciuti dagli utilizzatori.
- La platea dei *test* antigenici è in rapida evoluzione, con numerosi prodotti già pronti e disponibili sul mercato. Tuttavia, l'affidabilità diagnostica di tali *test* dipende anche, in modo assolutamente significativo, dal singolo produttore, e la disponibilità del marchio CE – obbligatorio per legge quale *conditio sine qua non* per la commercializzazione – non è di per sé garanzia sufficiente di qualità analitica.
- Tuttavia il *test* molecolare costituisce una specie di fotografia istantanea del momento in cui viene effettuato il prelievo, e inoltre può risultare negativo, anche in persone infette, perché:
  - il prelievo non è stato eseguito quando il virus è in fase di attiva replicazione;
  - il prelievo è stato eseguito in maniera inadeguata;
  - la sensibilità del *test* è insufficiente a rilevare quantità minime di virus nel campione biologico.

Le persone infette possono risultare positive alla presenza del virus per un lasso di tempo variabile, che in genere va dalle prime fasi dell'infezione ai 7-10 giorni successivi, ma che può protrarsi anche per alcune settimane e, in alcuni casi, mesi. A tale proposito pare fondamentale considerare il numero di geni rilevati dal sistema diagnostico ed il valore dei cicli soglia (Ct) di amplificazione genica che determinano un esito di positività. Vi è al momento un grande dibattito sul significato della positività ad un singolo gene o con Ct elevati, situazione che in genere viene etichettata come "debolmente positivo". È stato infatti dimostrato che solo una piccola percentuale (in genere meno del 5%) dei "tamponi" risultati "debolmente positivi" comporta – se messo in coltura – un esito di positività virologica. Pertanto, nel caso il valore di Ct ricada nell'ultimo percentile di positività – variabile da sistema diagnostico a sistema diagnostico, anche in base al numero di geni rilevati – è opportuno procedere alla refertazione di:

- Esito Positivo;



- la positività con valori di Ct elevati (indicare la soglia individuata come ultimo percentile o, in mancanza di questa informazione, indicare >35) in più del 95% dei casi non è associata a presenza di infettività.

In questo caso, pare improcrastinabile la valutazione collegiale tra microbiologi, clinici, epidemiologi ed igienisti per definire l'algoritmo operativo da adottare nei singoli *setting* di popolazione.

Dal punto di vista organizzativo parrebbe auspicabile una modalità di gestione della diagnostica, sul territorio, in accordo con la strategia *hub and spoke*, lasciando alle singole strutture sanitarie di diagnosi e cura l'esecuzione dei *test* a beneficio dell'utenza "interna" a stretta valenza ospedaliera, ed a laboratori centralizzati a livello regionale quella dei *test* di *screening* effettuati per finalità di salute pubblica (categorie particolari: viaggiatori internazionali o comunque provenienti da aree particolarmente "a rischio", corpo docente e non della scuola, contatti di soggetti positivi, residenti in aree a rischio particolare, ...). Tale approccio è valido sia per la diagnostica virologica diretta che per quella sierologica. In particolare, per la ricerca molecolare dovrebbe poter prevedere l'utilizzo di modalità di esecuzione con *kit* "commerciali" nelle strutture sanitarie e con strumentazioni ad elevatissima processabilità a livello territoriale cui dovrebbero essere affidate anche le attività di *screening* di popolazione.