

COVID-19

Gli strumenti diagnostici nella strategia di sorveglianza epidemiologica



MAURIZIO FERRI

Coordinatore scientifico Società Italiana di Medicina Veterinaria Preventiva

La gestione dei focolai Covid-19 nell'Unione Europea, almeno nella fase iniziale della pandemia, si è caratterizzata per la mancanza di uniformità delle strategie di sorveglianza e per interventi non farmaceutici (es. misure di contenimento, quarantena e distanziamento sociale) diversi tra i Paesi membri, con evidenti ripercussioni sulle libertà personali e sui diritti alla libera circolazione dei cittadini comunitari. Hanno sicuramente pesato, sulla risposta non coordinata e frammentaria¹ all'emergenza pandemica, i diversi contesti epidemiologici, l'assenza di un sistema concordato di flussi per la raccolta, elaborazione e comunicazione dei dati, ma

soprattutto la specificità dei sistemi sanitari nazionali su cui la UE non può fare molto, il cui ordinamento lascia agli Stati membri piena libertà nella organizzazione e gestione della sanità pubblica. Per ovviare a questi limiti intrinseci dell'Unione, la Commissione e il Consiglio dell'UE, su richiesta dei membri del Consiglio europeo, si sono accordati per l'elaborazione del *Joint European Roadmap*, una nuova tabella di marcia europea per l'eliminazione graduale delle misure di contenimento e definizione di una strategia di uscita il più possibile coordinata con gli Stati membri². Inoltre, sul terreno della diagnostica per l'infezione Covid-19, le raccomandazioni della

¹ <https://voxeuropa.eu/it/2020/l-ue-la-crisi-del-covid-19-5124545>

² https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/communication_-_a_european_roadmap_to_lifting_coronavirus_containment_measures_0.pdf

Commissione europea sui criteri di utilizzo dei test³, inclusi quelli rapidi⁴, e i documenti tecnici dell'ECDC – sull'utilizzo dei test per casi sintomatici e asintomatici in rapporto ai diversi contesti epidemiologici nazionali⁵, opzioni per l'uso di test rapidi antigenici per Covid-19⁶ – pongono le basi per lo sviluppo di standard uniformi e per un approccio coordinato all'adozione di misure di restrizione della libera circolazione per motivi di salute pubblica. Sul tema della sorveglianza epidemiologica invece, l'ECDC in un rapporto tecnico del 3 maggio 2021, fornisce agli Stati membri dell'UE/SEE una guida pratica sull'implementazione della sorveglianza genomica di SARS-CoV-2 e suggerimenti su come stimare il numero di campioni da sequenziare necessari per raggiungere vari obiettivi, inclusa la diagnosi precoce di nuove varianti⁷.

Sorveglianza epidemiologica umana e veterinaria a confronto

La storia e l'esperienza e hanno dimostrato come l'epidemiologia e la sorveglianza delle malattie infettive si declinano con lo stesso linguaggio sia che si tratti di medicina umana o veterinaria. L'obiettivo comune a entrambi i sistemi di sorveglianza è la riduzione della circolazione virale e della trasmissione dell'infezione. Permangono tuttavia differenze di approccio. In medicina umana, il trattamento del singolo paziente è centrale nel sistema sanitario, mentre le misure incentrate a livello di popolazione sono più rare. Diversamente, in medicina veterinaria, a causa delle serie conseguenze economiche e commerciali dei focolai infettivi, le misure sono rivolte all'intera popolazione animale.

Difatti, per conoscere la natura e la dinamica di un focolaio epidemico possono venir svolte sia indagini di tracciamento (es. l'origine degli animali infetti), sia indagini random (es. test sierologici) su campioni (n. di animali) rappresentativi della popolazione, impiegando specifiche modalità di campionamento e includendo anche soggetti asintomatici ai fini della valutazione dell'esposizione all'interno della popolazione. L'approccio di sorveglianza scelto dipende quindi dalla fase dell'epidemia e dall'uso finale delle informazioni raccolte. In genere, a inizio epidemia, l'obiettivo principale è il tracciamento di tutti i casi, per tentare un'eradicazione precoce. In una seconda fase invece, se l'agente patogeno si è già diffuso nella

popolazione locale in un'ampia percentuale (prevalenza) di soggetti, i target principali sono due: separare le zone infette da quelle indenni (*free*, libere) così da limitare i movimenti tra le due popolazioni e stimare la prevalenza (reale o vera) dell'infezione nelle prime.

Questi concetti debitamente traslati in medicina umana, hanno portato alla elaborazione di un protocollo veterinario di base per l'impostazione della sorveglianza attiva casuale (random) nella gestione di SARS-CoV-2 a livello di popolazione umana, partendo proprio dall'esperienza veterinaria nella sorveglianza attiva e passiva di malattie animali altamente diffuse e nell'analisi dei rischi delle malattie infettive degli animali⁸.

È un contributo che, in linea con un approccio *One Health*, potrebbe integrare le conoscenze e le strategie di sanità pubblica per il controllo delle epidemie infettive umane; ma al centro dei programmi di sorveglianza sia delle infezioni umane sia animali rimane la scelta della metodica diagnostica con le sue caratteristiche di sensibilità e specificità. Pur considerando la citata differenza sostanziale di approccio per la sorveglianza umana e animale, si possono comunque fare parallelismi tra i test applicati al singolo individuo con i livelli di sensibilità e specificità, e il sistema di sorveglianza inteso come test applicato a un'intera popolazione animale, come entità unica. Ma prima di vedere quali siano gli strumenti diagnostici oggi disponibili all'interno dei programmi di sorveglianza per Covid-19 e come la loro scelta dipenda dal contesto epidemiologico e accuratezza degli stessi, è utile ricordare che l'ECDC nel rapporto sopra citato per la sorveglianza genomica di SARS-CoV-2, raccomanda due approcci di campionamento complementari: campionamento rappresentativo di casi positivi per SARS-CoV-2 con tampone molecolare RT-PCR (e sequenziamento per rilevare e monitorare nuove varianti di preoccupazione) da sistemi di sorveglianza di routine esistenti basati sulla popolazione; e campionamento mirato di casi positivi a SARS-CoV-2 che si verificano in sottogruppi di popolazione o popolazioni speciali.

Test rapidi o molecolari?

I test diagnostici (es. antigenico rapido o molecolare) costituiscono uno degli strumenti chiave per la gestione dei focolai infettivi epidemici anche e soprattutto in chiave

³ Commission Recommendation of 28.10.2020 on COVID-19 testing strategies, including the use of rapid antigen tests. EN European Commission Brussels, 28.10.2020 C(2020) 7502 final.

⁴ Brussels, 18.11.2020 C(2020) 8037 final Commission Recommendation of 18.11.2020 on the use of rapid antigen tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection.

⁵ https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/TestingStrategy_Objective-Sept-2020.pdf.

⁶ <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/options-use-rapid-antigen-tests-covid-19-eueea-and-uk>.

⁷ <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/guidance-representative-and-targeted-genomic-sars-cov-2-monitoring>

⁸ <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771420300483?via%3Dihub>.

preventiva. È utile qui ricordare che la performance di un test diagnostico si valuta in base a due caratteristiche fondamentali: la sensibilità e la specificità.

La sensibilità rappresenta la probabilità che un soggetto realmente infetto venga correttamente classificato come positivo dal test, mentre la specificità rappresenta la probabilità che un soggetto realmente non infetto venga correttamente classificato come negativo dal test. In genere, quando si aumenta la sensibilità di un test se ne riduce la specificità.

Pertanto, è difficile (se non impossibile) avere test perfetti con sensibilità e specificità entrambe uguali al 100%. Quindi, se un test ha una sensibilità = 95% e una specificità = 98%, vorrebbe dire che se l'individuo campionato è infetto nella realtà, il test ha il 95% di probabilità di classificarlo correttamente come positivo e il rimanente 5% di classificarlo erroneamente come negativo (falso negativo). Per contro, qualora l'individuo campionato non fosse infetto nella realtà, allora il test avrebbe il 98% di probabilità di classificarlo correttamente come negativo e il rimanente 2% di classificarlo erroneamente come positivo (falso positivo).

Come scegliere

Per la scelta dei test per la diagnosi di Covid-19 (tralasciando i test sierologici basati sulla ricerca di anticorpi e dunque spie di eventuale immunità naturale o vaccinale) con le proprie caratteristiche di sensibilità e specificità, è d'obbligo fare riferimento sia alla fase epidemica (popolazione) sia alla cinetica della carica virale nel corso dell'infezione (individuo). Nella cosiddetta traiettoria del processo infettivo, come si vede nella figura 1, vi sono

quattro stadi di transizione (o fasi) generali d'infezione, che vengono considerati sia quando si validano i test diagnostici sia quando si settano e valutano i sistemi di sorveglianza. Questi sono la fase di esposizione al virus, il periodo di incubazione (il lasso di tempo, circa 5-6 giorni per Covid-19 intercorrente tra l'esposizione all'agente patogeno e l'apparizione dei sintomi), la fase infettante/replicativa e la fase immunitaria. All'inizio, il virus (curva rossa) comincia a replicare per raggiungere cariche massime al quinto/sesto giorno, per poi scendere nella fase infettiva e immunitaria o post-infettiva fino a circa 20-25 giorni successivi. In queste fasi si incrociano i livelli di sensibilità dei test molecolari e antigenici.

I test molecolari

Il test molecolare RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) – attualmente ritenuto il *gold standard* sia a livello nazionale sia internazionale per la diagnosi di Covid-19, in termini di sensibilità e specificità, cerca sequenze genetiche specifiche del virus in un campione prelevato da naso, gola o saliva e crea più copie del materiale genetico. Questa metodica diagnostica, dunque, attraverso il processo di amplificazione permette di rilevare la presenza del genoma virale oltre che in soggetti sintomatici anche in quelli con bassa carica virale, pre-sintomatici o asintomatici.

La quantità di frammenti genici è determinata di routine in modo semi-quantitativo attraverso il valore soglia del ciclo o *threshold cycles* (Ct), che corrisponde al numero di cicli di amplificazione necessari per ottenere risultati positivi. È un test molto sensibile in quanto può rilevare minime

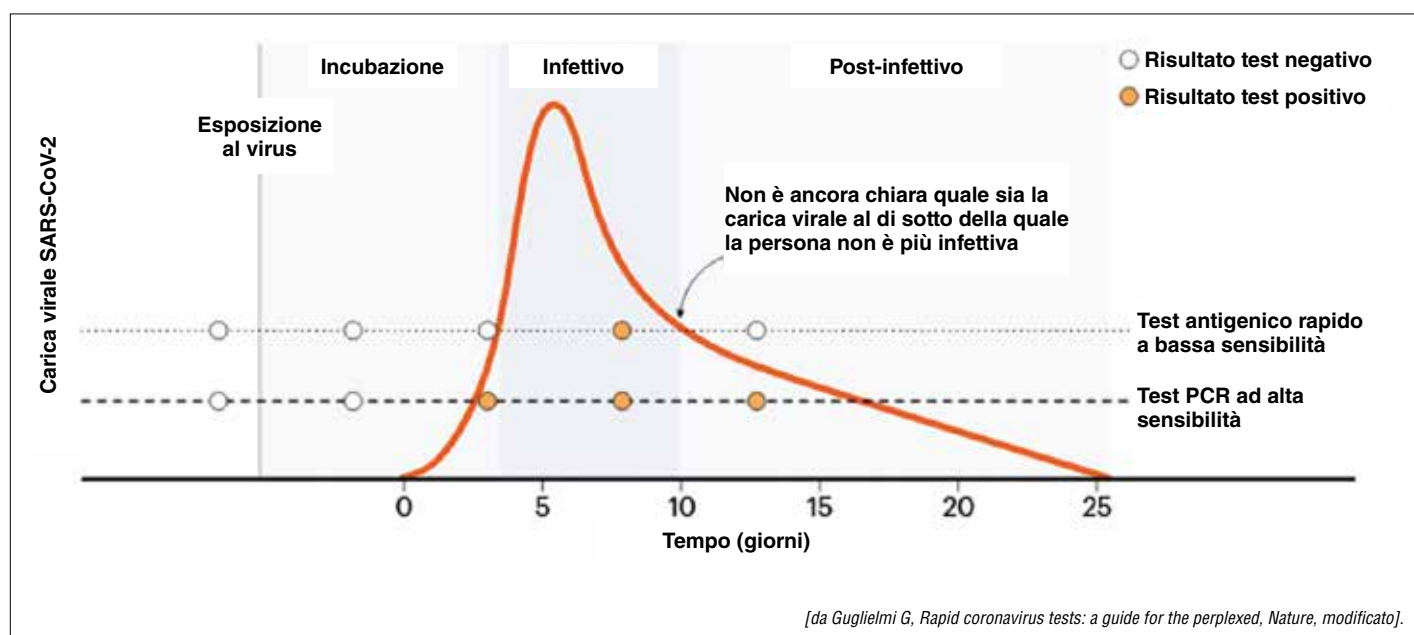


Figura 1. Stadi di transizione che caratterizzano la traiettoria del processo infettivo in corso di Sars-CoV-2.

quantità di materiale genetico virale, e dunque può dare una positività anche in un soggetto che non è più contagioso. Il valore Ct aumenta con la diminuzione della carica virale, e dunque un valore elevato correlato a una bassissima quantità di materiale genetico SARS-CoV-2 nel campione, potrebbe essere privo di significato clinico (questo dato è confortato dai risultati di un lavoro di revisione di diversi studi che ha dimostrato come SARS-CoV-2 di solito non sia più coltivabile con un valore Ct > 30-33), mentre un valore basso indica una carica virale elevata. Se da una parte il valore Ct può predire la durata, la gravità o il decesso per Covid-19, dall'altra tale utilità clinica è dibattuta poiché il valore Ct può variare a seconda dei diversi protocolli RT-PCR. Ciò in quanto i sistemi molecolari operano con diversa calibrazione e dunque i risultati sono difficilmente confrontabili tra i laboratori⁹. Attualmente, il Ct non viene fissato dalle autorità sanitarie, ma dai produttori dei test con valori che variano da 37 a 40, limiti elevati solitamente associati a pochi frammenti di virus, e che potrebbero produrre una sovrastima dei casi positivi. Si capisce come giocando con i limiti di Ct le percentuali di positività variano sensibilmente: se si sceglie un Ct troppo basso o troppo alto c'è il rischio di avere rispettivamente false negatività (ridotta sensibilità) o false positività (aumentata sensibilità). L'alternativa potrebbe consistere nel ri-testare i soggetti con un valore Ct elevato. E comunque anche in presenza di alte cariche e dunque con Ct uguale o inferiore a 25, non è ancora definito il livello chiave che consenta di discriminare una situazione di contagiosità da non contagiosità. Ci sono poi svantaggi per l'uso di massa legati ai tempi di refertazione (ci vogliono almeno 24 ore prima di avere in mano un referto), disponibilità di personale qualificato e costose apparecchiature di laboratorio. Ulteriori svantaggi più di natura tecnica che hanno alimentato contestazioni sulla validità scientifica dei test PCR¹⁰ riguardano i seguenti aspetti:

- il test PCR non rileva l'intero virus infettivo, ma frammenti genetici unici. In sostanza, il rilevamento di materiale virale mediante PCR non indica che il virus sia completamente intatto e infettivo, ovvero in grado di causare infezioni. L'infettività può essere confermata solo attraverso l'isolamento del virus da individui positivi su colture cellulari in laboratori con strutture di contenimento specializzate. Uno studio recente ha dimostrato che SARS-CoV-2 non è più coltivabile da 8 a 10 giorni dopo l'inizio della malattia

nonostante la positività al test molecolare¹¹;

- non esiste un test definitivo *gold standard* cui comparare i test RT-PCR.

In termini di strategia per il controllo dei focolai, e per la riduzione di R0 (ovvero il numero di riproduzione di base che rappresenta il numero medio di infezioni secondarie prodotte da ciascun individuo infetto), il test molecolare, in virtù degli aspetti sopracitati, andrebbe utilizzato nelle fasi iniziali con bassi tassi di infezione e dunque ridotta prevalenza per supportare il rintraccio, test ed isolamento dei contatti. Con l'aumento della prevalenza dovuta alla massiva circolazione virale nella fase avanzata dei focolai, ritorna utile l'impiego ripetuto su larghe fasce di popolazione (*screening* di massa) del test rapido, meno sensibile, ma anche meno costoso e con evidenti vantaggi per la mitigazione dei focolai, come descritto più avanti.

I test rapidi

I test rapidi sono divenuti centrali per le strategie di controllo dei focolai di Covid-19 nel Regno Unito e Stati Uniti e sempre più utilizzati nell'Unione Europea per potenziare la capacità diagnostica complessiva, contrastare la ridotta disponibilità dei test molecolari o ovviare ai tempi eccessivi di refertazione con impatto negativo sulla loro utilità clinica.

A partire dall'11 novembre 2020, sono stati registrati sulla piattaforma online FIND (*Foundation for Innovative New Diagnostic*) un'iniziativa del WHO, 56 test antigenici con marchio CE¹². I dati sono in continuo aggiornamento relativamente ai saggi per SARS-CoV-2 disponibili sin dalle prime fasi di sviluppo fino alla piena approvazione normativa.

Il 18 Febbraio 2021, il Comitato per la sicurezza sanitaria dell'UE (*EU Health Security Committee*) concorda un elenco comune di test antigenici rapidi Covid-19, ai fini del riconoscimento reciproco dei risultati da parte degli Stati membri e standardizzazione dei dati da includere nei certificati di refertazione¹³.

I test rapidi sono definiti anche "antigenici" in quanto, utilizzando le stesse matrici e modalità di raccolta di quelli molecolari (tamponi oro-faringei e salivari), sono in grado di rilevare solo le proteine specifiche, denominate collettivamente antigeni di superficie del virus. Diversamente dal test molecolare, non amplificano ciò che è nel campione e rilevano il virus solo se è presente con cariche elevate (es. centinaia di migliaia o milioni di copie virali per millilitro di campione) tipiche delle fasi iniziali pre-sintomatiche e

⁹ <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/guidance-representative-and-targeted-genomic-sars-cov-2-monitoring>

¹⁰ [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(20\)32504-2/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(20)32504-2/fulltext).

¹¹ Off Guardian, Jun 27, 2020. COVID19 PCR Tests are Scientifically Meaningless Though the whole world relies on RT-PCR to "diagnose" Sars-Cov-2 infection, the science is clear: they are not fit for purpose, Torsten Engelbrecht and Konstantin Demeter.

¹² <https://www.finddx.org/diagnostic/covid-10-igg-elisa-detection-kit/>.

¹³ https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/MEX_21_682.

sintomatiche precoci, fino a cinque giorni successivi all'insorgenza dei sintomi. Pertanto, hanno una sensibilità inferiore, ma possono ritornare utili per identificare i casi più contagiosi, che presentano cariche virali elevate e con un valore Ct <25 al RT-PCR. Sono disponibili diversi tipi di test antigenico, dai saggi immunocromatografici *lateral flow* (LFT, prima generazione) ai test a immunofluorescente (seconda generazione) con migliori prestazioni. Il problema della scarsa sensibilità può spiegare i risultati ottenuti in uno studio pilota condotto su migliaia di persone a Liverpool, nel Regno Unito con il test antigenico rapido *Innova lateral test*, che ha identificato solo due terzi dei casi (sensibilità del 66%) con livelli di Ct (al test molecolare) inferiori a 25, lasciando un terzo dei casi con basse cariche virali e potenzialmente ancora in grado di infettare¹⁴. Una sensibilità ancora più bassa (49%) è stata ottenuta in un altro studio condotto sempre nel Regno Unito¹⁵.

Recentemente, sono stati messi a punto test rapidi a immunofluorescenza con lettura in microfluidica (terza generazione) che sebbene abbiano una sensibilità circa dieci volte inferiore rispetto ai test molecolari, sono almeno cento volte più sensibili dei test antigenici rapidi. Sono in grado di rilevare qualitativamente la proteina nucleo-capside di SARS-CoV-2 e sembrano mostrare risultati sovrapponibili ai saggi di RT-PCR, specie se utilizzati entro la prima settimana di infezione.

Nei casi in cui i saggi antigenici rapidi di ultima generazione o i test molecolari in RT-PCR non siano disponibili, o i tempi di risposta siano eccessivi, precludendone l'utilità clinica e/o di salute pubblica, l'OMS raccomanda i test rapidi che soddisfino i requisiti minimi di prestazione di sensibilità $\geq 80\%$ e specificità $\geq 97\%$ (entro 5 gg dall'inizio dei sintomi o 7 giorni dall'esposizione), mentre l'ECDC suggerisce, soprattutto in situazioni di bassa prevalenza di SARS-CoV-2/COVID-19 di utilizzare test con prestazioni più vicine alla RT-PCR, ovvero sensibilità $\geq 90\%$ e specificità $\geq 97\%$. Solitamente, la sensibilità dei test rapidi disponibili in commercio tende ad essere simile in presenza di cariche virali elevate, e molto diversa con cariche inferiori¹⁶. Purtroppo, al momento le specifiche tecniche fissate da ciascuna azienda produttrice non sono oggetto di valutazione indipendente, e dunque la mancanza di protocolli standard di misurazione delle prestazioni e validazione non rende possibile la loro comparazione. Un altro svantaggio è legato al fatto che i dati di sensibilità del test rapido si ricavano principalmente da prove di laboratorio che utilizzano soggetti

sintomatici che sappiamo avere alte cariche virali. Se le valutazioni vengono effettuate al di fuori dei laboratori su soggetti con cariche virali inferiori è molto probabile la presenza di performance differenti. E comunque, con la diminuzione delle cariche, ovvero con l'aumento dei valori Ct del test molecolare, i test rapidi iniziano a non rilevare le infezioni. Per assicurare un livello minimo di performance, la Commissione europea ha invitato gli Stati membri ad elaborare un sistema di convalida dei test rapidi prima della loro implementazione.

Come interpretare i risultati dei test rapidi

I risultati dei test rapidi vanno interpretati in base alla situazione epidemiologica della popolazione studiata. Pur non riuscendo a intercettare soggetti infetti e con basse cariche virali, e dunque con prestazione inferiori rispetto a RT-PCR (es. bassa sensibilità), se utilizzati in un contesto ad alta prevalenza tipica delle fasi epidemiche avanzate caratterizzate da elevata circolazione, e in maniera ripetuta (es. due volte a settimana) o due volte sullo stesso soggetto a distanza di 2-3 giorni, la sensibilità cresce e consentono di identificare rapidamente e con elevata probabilità i soggetti infetti (anche asintomatici) più contagiosi che presentano picchi della carica virale e dunque si rilevano funzionali all'obiettivo di prevenire il più possibile la diffusione del virus, isolare i casi positivi, tracciare i contatti, gestire i trattamenti salvavita in modo più tempestivo e contribuire a frenare la pandemia¹⁷. In queste condizioni, i test antigenici rapidi avranno un valore predittivo positivo (PPV)¹⁸ elevato ed è probabile che la positività sia indicativa di una vera infezione, non richiedendo conferma con il test RT-PCR. Su questo punto le evidenze accumulate dall'inizio della pandemia dimostrano proprio come la crescita epidemica di Covid-19 sia legata alla trasmissione virale sostenuta da soggetti asintomatici e pre-sintomatici. Ciò si traduce nella raccomandazione pratica di saggiare le persone indipendentemente dai sintomi, quando si attende una percentuale di positività elevata che, per esempio, approssimi o superi il 10%. L'obiettivo, dunque, non è di individuare ogni singola persona infetta, piuttosto di mitigare i focolai. Viceversa, in un contesto di bassa prevalenza, i test antigenici rapidi avranno un valore predittivo negativo (NPV)¹⁹ elevato, ma un PPV basso. Pertanto, se utilizzati correttamente, in un contesto a bassa prevalenza dovrebbero essere in grado di rilevare un caso altamente contagioso. In questo caso, un risultato positivo richiederà una conferma immediata.

¹⁴ <https://www.gov.uk/government/publications/liverpool-covid-19-community-testing-pilot-interim-evaluation-report-summary>.

¹⁵ Wise, J. Covid-19: Lateral flow tests miss over half of cases, Liverpool pilot data show. *BMJ*371, m4848 (2020).

¹⁶ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33564189/>.

¹⁷ <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp2025631>.

¹⁸ PPV: corrisponde alla proporzione di pazienti con un test positivo che hanno la malattia, quindi diagnosticati correttamente come malati.

¹⁹ NPV: corrisponde alla proporzione di pazienti con un test negativo che non hanno la malattia, quindi diagnosticati correttamente come sani.

Questi test sembrano dunque mostrare risultati sovrapponibili ai saggi di RT-PCR, specie se utilizzati il più presto possibile e in ogni caso entro cinque giorni dall'insorgenza dei sintomi.

Tra i benefici per lo *screening* di massa con i test rapidi, ci sono la facilità d'uso, economicità e rapidità di risposta (i risultati disponibili entro mezz'ora). Per queste ragioni presentano un buon rapporto costo-benefici e si sono rilevati estremamente efficaci come *screening* nelle scuole, università, prigioni o in aree geografiche con alta circolazione virale²⁰, piuttosto che in *setting* con personale a rischio elevato quali ospedali o residenze per anziani, dove è prioritario il test molecolare dotato di elevata sensibilità per evitare di fare una diagnosi sbagliata. Si comprende come l'utilizzo e l'interpretazione dei risultati siano legati non solo all'accuratezza del test, ma anche al contesto epidemiologico. Ad esempio, un eventuale risultato negativo di un soggetto con sintomi tipici dell'infezione e proveniente da un'area con alti livelli di prevalenza Covid-19, va probabilmente interpretato come falso negativo che necessita di un doppio controllo con il test molecolare. Un ulteriore svantaggio del test rapido è che i campioni, diversamente dal test molecolare, non vengono inviati ai laboratori di sanità pubblica per l'eventuale sequenziamento genomico dell'isolato clinico.

In conclusione, i test rapidi presentano i seguenti vantaggi:

- rapida gestione clinica dei casi con sintomi compatibili con Covid-19;
- controllo della trasmissione: rilevamento precoce dei casi, tracciamento dei contatti, test a livello di popolazione;
- mitigazione dell'impatto del Covid-19 in ambito sanitario e socio-assistenziale: *triage* all'ammissione, diagnosi precoce e isolamento;
- identificazione dei *clusters* o focolai in contesti specifici: rilevamento precoce e isolamento.

Effetto delle varianti sui test diagnostici e vaccinazioni

La circolazione delle varianti di SARS-CoV-2: es. inglese (B.1.1.7), sudafricana (B.1.351), brasiliana/giapponese (p.1), indiana (B.1.617.1/2/3), alcune delle quali dotate di probabile maggiore capacità immuno-evasiva e di trasmissibilità (es. inglese e sudafricana) ha sollevato non poche preoccupazioni circa l'accuratezza dei test diagnostici antigenici e molecolari utilizzati per identificare l'infezione. Il dubbio è che se la variante possiede una sequenza genetica diversa da quella del virus originario, il

test non sia in grado di diagnosticare l'infezione con il risultato di avere un risultato falso negativo. Non dimentichiamo, inoltre, che la variante inglese B.1.1.7 era stata identificata anche a causa di un problema del test diagnostico, chiamato "fallimento del bersaglio del gene S"²¹. Per questo stesso problema la FDA aveva già emesso avvisi di potenziali fallimenti dei target per alcuni test²². Tuttavia, la stessa FDA sulla base dei dati disponibili e del monitoraggio di più di 200 strumenti diagnostici molecolari soggetti ad autorizzazione emergenziale, ha calcolato che l'85% di questi test sono diretti non solo verso il gene che codifica la proteina Spike (che muta più frequentemente), ma anche verso altri geni e dunque in questo modo si riduce la possibilità di false negatività nel caso di infezioni sostenute dalle varianti²³. Stesso discorso vale per i test antigenici. In sostanza, sono stati finora aboliti tutti i test molecolari precedentemente disegnati sulla regione Spike del virus e sviluppati quelli che hanno come target più geni diversi dal gene Spike mentre la maggior parte della diagnostica prende di mira più geni diversi dal gene Spike. Alla luce dell'emergenza di mutazioni del gene che codifica per la proteina S, la recente circolare del Ministero della Salute sconsiglia l'utilizzo di test basati esclusivamente sul gene S per il rilevamento dell'infezione da SARS-CoV-2 mediante RT-PCR²⁴.

Poiché le mutazioni in circolazione modificano la proteina Spike su cui è basato il riconoscimento ad opera di anticorpi specifici disegnati per riconoscerla nel virus SARS-Cov-2 *wild type*, un altro aspetto da indagare è l'impatto delle stesse sull'accuratezza dei test diagnostici e sierologici post-vaccinazione e il potenziale effetto delle varianti sull'efficacia delle vaccinazioni. Ciò in quanto i test sierologici rilevano gli anticorpi che hanno come target diverse parti del virus, mentre quelli indotti dalla vaccinazione, come ad esempio con i vaccini Pfizer e Moderna sono diretti solo verso la proteina Spike.

Tuttavia, si ritiene che anche nell'ipotesi di avere risultati negativi successivi alla somministrazione del vaccino, non viene minata l'efficacia dello stesso. Nell'incertezza, l'alternativa potrebbe consistere in un test specifico progettato per gli anticorpi di interesse.

È chiaro che per garantire in futuro l'accuratezza dei test diagnostici (molecolare ed antigenico) è di fondamentale importanza portare avanti i programmi di vaccinazione il più rapidamente possibile, catalogare gli obiettivi genomici della diagnostica SARS-CoV-2 e sequenziare in maniera regolare e diffusa i campioni clinici.

²⁰ <https://covid19.arizona.edu/covid19-testing>.

²¹ <https://www.gov.uk/government/publications/investigation-of-novel-sars-cov-2-variant-variant-of-concern-20201201>.

²² <https://www.fda.gov/medical-devices/letters-health-care-providers/genetic-variants-sars-cov-2-may-lead-false-negative-results-molecular-tests-detection-sars-cov-2>.

²³ <https://www.jhsph.edu/covid-19/articles/variants-vaccines-and-what-they-mean-for-covid19-testing.html>.

²⁴ <http://www.quotidianosanita.it/allegati/allegato4716712.pdf>