

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari e di
Sanità Pubblica

Direttore: Prof. Federico Rea

Istituto di Igiene

TESI DI LAUREA

**ANALISI DI UNA COORTE DI PAZIENTI FRAGILI IN TERAPIA
PRECOCE ANTI-COVID19: I RISULTATI DI UN OSPEDALE
UNIVERSITARIO DI TERZO LIVELLO**

RELATORE: Prof. Vincenzo Baldo
CORRELATORE: Dott. Michele Nicoletti

LAUREANDO: Alessandro Zorzi

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

1 Sommario

1	INTRODUZIONE	5
1.1	Le prime risposte di sanità pubblica ad un'emergenza crescente	5
1.2	La diagnostica molecolare: il <i>gold-standard</i>	6
1.3	I test antigenici	7
1.4	Evoluzione delle strategie di <i>testing</i>	9
1.5	Terapia antivirale e monoclonale.....	10
2	OBIETTIVO	13
3	MATERIALI E METODI	15
3.1	Procedure di <i>testing</i> e raccolta dati	15
3.2	Analisi statistica.....	16
3.3	Profilo clinico dei pazienti inclusi	18
4	RISULTATI	19
4.1	Popolazione oggetto dello studio.....	19
4.2	L'impatto dei valori del Ct e dei giorni dall'insorgenza dei sintomi sulla sensibilità del LumiraDx™	27
4.3	Sensibilità e giorni trascorsi dall'inizio dei sintomi	27
5	DISCUSSIONE	35
6	CONCLUSIONE	37
7	BIBLIOGRAFIA	39

RIASSUNTO

Lo studio in oggetto è stato condotto su una coorte prospettica di pazienti positivi a SARS-CoV2 e con quadro clinico pregresso, importante fattore di rischio per lo sviluppo di forme sindromiche di COVID-19 severe. Lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'affidabilità dei test antigenici di terza generazione LumiraDx™ in relazione alla circolazione di nuove varianti e di sperimentare il nuovo software quantitativo validandolo in funzione dei RT-PCR cycle threshold (Ct) calcolati con diagnostica molecolare dal laboratorio di Microbiologia dell'Azienda Ospedale Università di Padova. La validità dell'esito dei test antigenici è stata confermata, conservando valori di sensibilità e specificità ben al di sopra dei minimi richiesti dall'ECDC. Il software disponibile ad oggi si è dimostrato invece insufficiente per fornire una prima descrizione dell'andamento quantitativo della viremia in quanto le cariche virali rilevate superavano ampiamente il fondo scala disponibile.

ABSTRACT

This study was conducted on a prospective cohort of SARS-CoV2-positive patients with prior clinical picture, an important risk factor for the development of severe syndromic forms of COVID-19. The purpose of the study was to evaluate the reliability of the third-generation LumiraDx™ antigenic tests in relation to the circulation of new variants and to test the new quantitative software by validating it against RT-PCR cycle threshold (Ct) calculated with molecular diagnostics by the Microbiology laboratory of Azienda Ospedale Università di Padova. The validity of the outcome of the antigenic tests was confirmed, Retaining sensitivity and specificity values well above the minimums required by the ECDC. In contrast, the software available to date proved insufficient to provide an initial description of the quantitative viremia as the detected viral loads greatly exceeded the available full scale.

1 INTRODUZIONE

1.1 Le prime risposte di sanità pubblica ad un'emergenza crescente

SARS-CoV-2 è un coronavirus emerso all'attenzione della comunità scientifica globale sul termine del 2019 nella provincia cinese dell'Hubei e successivamente dichiarato pandemico nel marzo del 2020 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (1). Nell'ultimo triennio, ha manifestato un tropismo cellulare diversificato. Specialmente nelle sue varianti attualmente circolanti, si sta dimostrando un patogeno delle alte vie aeree (2), da cui una delle ragioni sottostanti alla maggiore contagiosità rispetto ai ceppi primordiali, che colpivano maggiormente le basse vie aeree. Posto che la pericolosità di un patogeno è definita dalla risultante della sua mortalità e della sua contagiosità, nel caso di SARS-CoV-2, rispettivamente si attestano la prima allo 0,7% delle infezioni (3), mentre la seconda è stata ed è ancora fortemente dibattuta anche in relazione ai diversi sistemi di sorveglianza attuata nei differenti Paesi. Infatti, inizialmente nell'assenza di questi, la contagiosità è stata difficilmente stimabile. Successivamente, con lo sviluppo e la diffusione delle prime varianti, è sorta la necessità di monitorarne le caratteristiche epidemiologiche, stimando per esempio la contagiosità delle nuove varianti come indicatore surrogato dell'effetto delle mutazioni acquisite. Per esempio, l' R_0 , il numero di riproduzione di base, del ceppo ancestrale di Whuan è stato stimato a 2,79, cresciuto poi a 5,08 nella variante Delta, fino a arrivare a Omicron, per cui si stima un tasso di infettività 3,76 volte superiore a Delta (4)(5).

La risposta a SARS-CoV-2 si è dimostrata una sfida particolarmente complicata poiché la popolazione era *naïve* nei confronti di un nuovo virus estremamente diffusivo. Questo ha permesso che un numero crescente di soggetti contraesse l'infezione, con la comparsa di quadri clinici di polmonite severa e di insufficienze respiratorie, comportando un incredibile impatto sui servizi sanitari dei diversi Paesi, sia in termini diretti (pazienti

con necessità del ricovero) oltre che indiretti (ritardi dell'accesso alla diagnosi e cure delle patologie non COVID-19).

Vista l'evoluzione dello scenario epidemiologico inizialmente locale, poi generalizzato ed internazionale, molta attenzione è stata data alle strategie di prevenzione della circolazione virale.

La prima risposta di sanità pubblica si è basata sull'utilizzo di interventi non farmacologici, adottando misure igienico sanitarie preventive, con restrizioni personali e il blocco della mobilità nazionale ed internazionale (6), il distanziamento fisico, l'utilizzo di barriere fisiche per limitare la liberazione di *droplets*, l'utilizzo universale di mascherine chirurgiche o FFP2 (7) e all'adozione di specifiche strategie di testing (8). Proprio su quest'ultimo aspetto sono state investite molte risorse per incrementare rapidamente la capacità diagnostica.

1.2 La diagnostica molecolare: il *gold-standard*

Durante la prima ondata, il Ministero della Salute ha indicato la ricerca del genoma virale tramite biologia molecolare del SARS-CoV-2, inizialmente unica tecnologia disponibile, come *gold-standard* per la valutazione dei test rapidi antigenici.

Nelle prime fasi della pandemia, l'unico laboratorio accreditato per l'analisi dei tamponi era quello dell'Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani" (Roma), centro di riferimento nazionale. Successivamente vennero identificati una serie di centri di riferimento regionali e provinciali, fino all'accreditamento di strutture convenzionate e private.

In poco più di tre anni di pandemia, la diagnostica con biologia molecolare si è conservata praticamente invariata, salvo l'utilizzo di sonde aggiornate in funzione delle varianti circolanti. L'esame identifica il materiale genetico di SARS-CoV-2, ovvero specifiche sequenze di RNA virale, mediante l'utilizzo della metodica *real time reverse transcriptase-polymerase chain*

reaction (RT-PCR), metodica che permise a Kary Mullis di essere insignito del premio Nobel per la chimica nel 1993 (9).

Nei test molecolari, il campione viene raccolto da un operatore sanitario che, strofinando gentilmente un tampone monouso sulla mucosa dell'oro e rinofaringe, raccoglie un campione di muco del paziente. Questo viene immediatamente posto all'interno di un contenitore sterile contenente primer oligonucleotidici e sonde che fissano il materiale organico prelevato, garantendo una stabilità del campione nell'ordine delle 48 ore, purché conservato ad una temperatura di +4°C, e permettendo così il tempo di logistica necessario per sopraggiungere in laboratorio (10). Il microbiologo analizza poi una aliquota della soluzione primer più muco. Se la sonda identifica del materiale genetico virale, la macchina fornisce un esito positivo. Il test si compone di due fasi: inizialmente la RT-PCR avvia la retrotrascrizione del frammento di RNA virale prelevato, successivamente il cDNA, copia complementare, ricavato viene amplificato tramite PCR mantenendo i relativi rapporti di concentrazione con l'RNA virale (11).

Caratteristica principale di questa metodica diagnostica è l'estrema sensibilità, poiché il test molecolare rileva anche quantità minime di materiale virale. D'altro canto, le principali criticità associate a questa metodica sono legate ai tempi di refertazione (11) e al costo per singolo esame, indicativamente 40€ l'uno (12). Inoltre, la necessità di un laboratorio di microbiologia e di personale specializzato può rappresentare un ulteriore problema specialmente in scenari di emergenza sanitaria e alta circolazione virale.

1.3 I test antigenici

I test antigenici comprendono differenti tecnologie diagnostiche, sviluppatesi progressivamente e generalmente appellate con il termine "generazioni".

La prima, introdotta a distanza di pochi mesi dall'inizio della pandemia, è quella composta dei test a flusso laterale (13). In questa, il campione prelevato dal naso/rinofaringe del paziente viene immerso nel *buffer* in grado di inattivare il virus e di renderlo non più infettivo. Alcune gocce della soluzione vengono versate nella "saponetta" kit, dove il fluido diffonde capillarmente in un materiale di nitrocellulosa arricchito di anticorpi specifici contro proteine di superficie di SARS-CoV2. In caso di infezione, il legame delle stesse con gli anticorpi determina la comparsa di una reazione cromatografica. Caratteristica di questi test è di fornire un esito con un tempo di refertazione di 10-15 minuti (14) ed essendo non dipendenti dal laboratorio consentono un loro impiego su larga scala (15).

Uno dei possibili errori nel processo diagnostico dei test di prima generazione era l'interpretazione della reazione cromatografica, è stata introdotta una seconda generazione di test che consiste nella lettura dei kit di prima generazione non più dall'occhio dell'operatore, ma tramite un macchinario con apposito sensore ottico. In questa maniera si è riusciti a ridurre una quota di errore analitico, superando gli errori operatore dipendenti. Limite di entrambe le generazioni restano però la sensibilità e la specificità, legate alla quantità e qualità degli anticorpi utilizzati.

Visti i limiti delle precedenti due generazioni, nella terza si è abbandonato l'utilizzo dei test a flusso laterale, introducendo un *device* che si configura come un piccolo laboratorio portatile. La diagnostica è quindi basata sul metodo della microfluidica in cui il dispositivo processa il campione tramite l'uso di un lettore a fluorescenza che rileva le radiazioni emesse dagli anticorpi fluoresceinati leganti specifici antigeni della proteina N di SARS-CoV-2. Vantaggio di questa metodica è la possibilità di analizzare i campioni al *point of care*, con una elevata sensibilità e specificità.

Con la circolare n°. prot 705 del 08/01/2021 (16), il Ministero della Salute ha aggiornato le strategie di *testing*, considerando la diagnostica antigenica di terza generazione un test di prima linea alla pari dei test molecolari. A seguito dell'entrata in vigore della citata circolare, in caso di riscontro di

positività con un test antigenico di terza generazione, non si rendeva più necessaria la conferma diagnostica. Successive indicazioni hanno autorizzato l'uso dei test di prima e seconda generazione solamente in scenari di elevata circolazione virale in funzione della ormai documentata minore sensibilità e specificità diagnostica.

Questo poiché in caso di alta circolazione virale il valore predittivo positivo (PPV) del test è elevato; al contrario in scenari a bassa prevalenza il valore predittivo negativo (NPV) sarà elevato ma il PPV troppo basso per rendere sufficientemente solido l'esito.

In relazione a ciò, l'*European Center for Disease Control and Prevention* (ECDC) ha suggerito che i test antigenici in uso in Europa avessero come requisito minimo una sensibilità pari ad almeno l'80% e una specificità del 97% (8).

Recentemente LumiraDx™ ha iniziato a valutare lo sviluppo della tecnologia di terza generazione quantitativa, ovvero dispositivi dotati di hardware del tutto identico a quelli autorizzati in commercio, ma con un software che, oltre a fornire l'esito positivo o negativo, è in grado di quantificare la quantità di microfluorescenza rilevata dal sensore, consentendo potenzialmente una stima della viremia del soggetto.

1.4 Evoluzione delle strategie di *testing*

Con l'arrivo della pandemia da SARS-CoV-2, si sono susseguite molteplici strategie di *testing* incentrate su obiettivi strategici differenti. Inizialmente la priorità era stata fissata nei soli soggetti sintomatici dal momento che si pensava che solo questi avessero un ruolo attivo nella trasmissione virale. Successivamente è stato descritto il ruolo anche dei soggetti paucisintomatici e asintomatici nella trasmissione del virus (17), rendendo *de facto* impossibile il blocco delle catene di contagio. Conseguentemente

l'unica opzione percorribile risultava nella mitigazione dei contagi, con l'individuazione precoce dei contatti e con l'autoisolamento precauzionale. Con l'introduzione dei vaccini si è assistito ad una radicale evoluzione dello scenario epidemiologico: la progressiva riduzione della popolazione *naïve* determinava, quanto meno sulla carta, una riduzione dei soggetti suscettibili. La parallela introduzione di una licenza di circolazione, denominata *Green Pass* (18), ha determinato un progressivo focus del *testing* sulla popolazione non ancora vaccinata. Questo ha fatto sì che venissero maggiormente testate le persone a maggiore rischio, sia di infezione oltre che sintomatologia severa.

Il successo della campagna vaccinale, la progressiva riduzione delle misure non farmacologiche e la significativa educazione sanitaria operata dai media, hanno portato ad un incremento dell'autonomia del cittadino. Questo ha reso possibile introdurre, oltre ai tamponi eseguiti da personale sanitario, anche i test in autosomministrazione(19).

Lo scenario epidemiologico attuale ha poi portato all'emanazione di indicazioni dell'ECDC (20) che stimolano i Paesi dell'area EU ad attuare strategie di *testing* caratterizzate dalla sostenibilità. Ciò si spiega alla luce del fatto che la pandemia ha gravato indirettamente sui servizi sanitari, rendendo ora prioritari interventi di recupero delle prestazioni arretrate.

1.5 Terapia antivirale e monoclonale

I soggetti che hanno maggiore rischio di sviluppare una forma sindromica severa sono fortunatamente una piccola frazione della popolazione generale. Vista l'attenzione riservata alla tematica, parallelamente alle strategie per il contenimento della circolazione virale, si sono ricercate molecole che potessero avere una azione preventiva o sull'infezione o sui quadri sindromici gravi. Tra le tante molecole studiate, una menzione particolare è da riservare all'idrossiclorochina, un farmaco antimalarico con azione anche antiinfiammatoria nella patologia reumatica. Inizialmente, nella

concitazione dettata dall'emergenza mondiale, il suo utilizzo, anche compassionevole, ha portato alla comparsa di eventi indesiderati in un numero consistente di pazienti a fronte di un beneficio clinico statisticamente nullo (21).

Ad oggi sono state individuate diverse strategie terapeutiche. Queste non sono ancora idonee per essere offerte alla popolazione generale visti i costi, le possibili complicanze e la modalità di somministrazione infusiva. In ogni caso, non si è ancora scoperta nessuna molecola con una efficace azione terapeutica dell'infezione, viceversa sono stati individuati diversi farmaci in grado di impedire l'evoluzione dell'infezione in una sintomatologia severa, per cui il Ministero della Salute ha prescritto specifiche condizioni d'uso (22).

I principali farmaci in uso clinico sono:

- Sotrovimab (nome commerciale Xevudy): è una IgG monoclonale umana che si lega ad una porzione altamente conservata della proteina S. Si è dimostrato essere uno strumento relativamente efficace poiché sembra essere in grado di impedire la progressione clinica della malattia nell'85% dei pazienti trattati (22) .
- Remdesivir (nome commerciale Velkury): si tratta di un analogo nucleotidico. La sua efficacia è dettata dal fatto che va a competere con l'adenosina inducendo l'insorgenza di errori nel processo di replicazione virale. Questo antivirale si è dimostrato particolarmente efficace, tanto più precocemente veniva assunto al punto che l'indicazione all'utilizzo è entro i 5-7 giorni dalla comparsa dei sintomi (22) .
- Nirmatrelvir (nome commerciale Paxlovid): è formato da due componenti: una proteasi ed un inibitore delle proteasi. Il farmaco si è dimostrato efficace nella riduzione del numero di ricoveri e della mortalità, con la peculiarità di essere somministrabile al domicilio per os (22).
- Molnupiravir (nome commerciale Lagevrio): si comporta come un precursore di un analogo nucleotidico: una volta introdotto

nell'organismo umano, viene convertito in citidina, andando ad introdurre errori nell'RNA virale nel processo di replicazione virale (22).

- Tixagevimab e Cilgavimab (nome commerciale Evusheld): il farmaco è composto da due anticorpi monoclonali leganti la proteina Spike virale. A seguito del legame con la proteina target, l'azione farmacologica è volta ad impedire l'ulteriore ingresso del virus nelle cellule umane. Si son dimostrati efficaci nel ridurre sindromi severe e mortalità del 67% (22).

L'utilizzo di questi farmaci viene modulato secondo alcuni criteri tra cui il tempo dall'insorgenza della sintomatologia, le interazioni farmacologiche con la terapia precedentemente assunta, specifiche condizioni di rischio come età o malattia.

Questo comportamento è dettato anche dai costi delle sopraelencate terapie. Ad esempio, il Remdesivir ha un costo standardizzato di 390€ per fiala che, per un ciclo terapeutico completo può arrivare a 2340€ (23). Vista la numerosità dei soggetti infetti, un loro utilizzo diffuso non risulterebbe sostenibile per le finanze del sistema Paese.

2 OBIETTIVO

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'affidabilità del test antigenico di terza generazione LumiraDx™ nella diagnostica di SARS-CoV-2, anche alla luce di nuove VOC, variants of concern, tra cui il *lineage* Omicron è attualmente il dominante.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Procedure di *testing* e raccolta dati

Sono stati raccolti 601 campioni da 266 individui che sono stati seguiti nel reparto di Malattie Infettive e Tropicali di Padova. Tutti i pazienti arruolati avevano ricevuto una pregressa diagnosi di positività a SARS-CoV2 e si presentavano all'ambulatorio "monoclonali" per ricevere una terapia antivirale su segnalazione del proprio curante. La popolazione sottoposta a studio è stata seguita nel periodo compreso tra il 14/07/2022 e il 03/01/2023. I pazienti sono stati testati con tre differenti tamponi: il primo era un tampone nasale antigenico (LumiraDx™), il secondo e il terzo erano tamponi orofaringei e rinofaringei, analizzati tramite RT-PCR e sequenziamento genetico.

Il campionamento è stato eseguito in accordo con le linee guida statunitensi dell'ECDC per la raccolta di tamponi orofaringei e nasofaringei. I campioni sono stati conservati tra 2 e 8°C fino al momento del test, eseguito entro le 72 ore dalla raccolta (24). I primer e le sonde utilizzate legano specificatamente geni codificanti l'involucro (*Envelope*) e l'RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp: RdRp_SARSr-F, RdRp_SARSr-R, RdRp_SARSr-P1, and RdRp_SARSr-P2).

Gli esami RT-PCR sono stati condotti in un volume finale di 25 µL, contenente 5 µL di acidi nucleici purificati, usando il kit *One Step Real Time* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e sono stati eseguiti su ABI7900HT *Fast Sequence Detection Systems* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La sensibilità degli *assay* genici *Envelope* e RdRp è stata rispettivamente di 5 e 50 copie equivalenti il genoma per reazione al 95% di probabilità di rilevamento. Entrambi gli *assay* non hanno mostrato cross-reattività né con i coronavirus umani endemici HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 né con MERS-CoV.

Il tampone è stato eseguito in entrambe le narici, è stato fatto gentilmente ruotare contro le pareti nasali più volte. Tutti i campioni sono stati testati con la piattaforma LumiraDx™.

Il LumiraDx™ SARS-CoV-2 Ag-RDT è un test rapido a immunofluorescenza microfluidica per il rilevamento qualitativo di un antigene proteico del nucleocapside del SARS-CoV-2 con l'utilizzo di tamponi nasali o nasofaringei. Il costruttore dichiara che non ci siano cross-reazioni né con HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, né con MERS-CoV, né con H1N1, H3N2, Adenovirus, hMPV, Enterovirus, Virus Respiratorio Sinciziale e Rinovirus.

Sono state raccolte le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti oltre che i dati relativi a precedenti infezioni o vaccinazioni contro il COVID-19,

I valori del Ct sono stati forniti dal reparto di Microbiologia e Virologia dell'ospedale universitario di Padova.

3.2 Analisi statistica

Le caratteristiche del campione dei soggetti e dei test sono state riassunte usando frequenze e percentuali. I dati sono stati analizzati utilizzando il test chi-quadrato e il test *t* di *Student* per dati non appaiati, quando appropriato. Per valutare l'accuratezza diagnostica del LumiraDx™, il numero dei veri positivi (VP), dei veri negativi (VN), dei falsi positivi (FP) e dei falsi negativi (FN), è stato ottenuto assumendo come *gold-standard* il risultato della RT-PCR.

Successivamente sono state calcolate i seguenti indicatori e i rispettivi intervalli di confidenza (CI) al 95%: sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP), valore predittivo negativo (VPN) e accuratezza. Tutti questi parametri sono stati stratificati a seconda dell'età, del sesso, dello stato dei sintomi, del numero dei giorni trascorsi dall'insorgenza dei sintomi, della tempistica del test e delle varianti del COVID-19.

I parametri sono stati valutati considerando l'ordine temporale del campionamento (primo, secondo, ecc.), limitando l'analisi a 4 test per paziente.

Sono stati inoltre valutati, con il primo test positivo, le possibili differenze nella carica virale correlate alle diverse varianti (in termini di valori medi del Ct e con CI 95%).

È stata indagata la relazione tra l'affidabilità dei test rapidi antigenici e diagnostica molecolare analizzando la concordanza degli esiti in funzione del Ct e del numero dei giorni trascorsi dall'inizio dei sintomi. Si è tracciata la distribuzione bivariata (calcolata tramite la stima della densità multivariata di Kernel) e le distribuzioni marginali relative alla concordanza tra LumiraDx™ e RT-PCR (VP contro FN). Inoltre si è calcolata la sensibilità con CI 95% stratificando in modo congiunto per le due variabili. La correlazione tra i valori del Ct e il numero dei giorni trascorsi dall'inizio dei sintomi è stata verificata tramite lo *Spearman's rank test*.

Infine, un'analisi di regressione logistica multivariata multilivello è stata eseguita sui test positivi della RT-PCR considerando la concordanza tra l'*outcome* del LumiraDx™ e della RT-PCR come variabile dipendente e il sesso, l'età, i giorni dall'inizio dei sintomi, i valori del Ct, lo stato dei sintomi e le varianti del COVID-19 come covariate indipendenti. Poiché per la maggior parte dei pazienti arruolati erano disponibili più test eseguiti in giorni diversi, il codice identificativo anonimizzato del singolo soggetto è stato usato come una variabile di raggruppamento. Inoltre è stato modellato un effetto casuale separato (intercetta) per ciascun paziente per rendere conto della variabilità individuale.

L'intervallo di confidenza (CI) al 95% è stato approssimato con la formula di Wald per le metriche di accuratezza e gli *odd ratios*, mentre il CI al 95% per i valori medi è stato ottenuto tramite la distribuzione *t* di *Student*. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi con un valore di $p < 0,05$.

Le analisi dei dati sono state eseguite con il pacchetto statistico di Python 3.8.8 (*Python Software Foundation, Fredericksburg, TX, USA*). Le

regressioni logistiche multilivello sono state condotte usando R 4.2.2 (R Core Team, Vienna, Austria).

3.3 Profilo clinico dei pazienti inclusi

I pazienti inclusi nello studio avevano un'età minima di 20 anni e almeno una delle condizioni cliniche predisponenti allo sviluppo della malattia severa da COVID-19. Nessuno di loro è stato ospedalizzato o ha ricevuto ossigenoterapia per COVID-19. La terapia è stata somministrata ai pazienti fragili non più tardi del settimo giorno dall'inizio dei sintomi, mentre i soggetti immunocompromessi potevano essere arruolati in caso di positività insorta non più di 28 giorni prima in caso di peggioramento tardivo del loro status clinico.

I pazienti presentavano almeno una delle seguenti condizioni: età sopra i 65 anni, BMI sopra i 35 kg/m² o sopra l'ottantacinquesimo percentile, nefropatia, diabete, malattia respiratoria cronica, patologia cardiovascolare, immunodeficienza o immunosoppressione, dipendenza da *device* assistenziali, disordini neurologici, emoglobinopatie.

I pazienti sono stati segnalati dal medico curante o da uno specialista ospedaliero. Il personale medico del reparto di Malattie infettive ha poi eseguito una prima visita in telemedicina a tutti i pazienti segnalati in modo da decidere la terapia più appropriata ove indicata.

Durante lo studio, i partecipanti sono stati suddivisi in due gruppi, pazienti sintomatici e pazienti paucisintomatici. Un individuo è stato definito come sintomatico nel momento in cui ha sviluppato febbre, dispnea o almeno due dei seguenti sintomi: disgeusia, anosmia, mal di gola, mialgia, gastroenteriti, tachipnea, tosse, raffreddore, astenia e mal di testa. Viceversa, abbiamo definito come paucisintomatico il soggetto che non presentava né febbre né dispnea, e che aveva al massimo due dei sintomi secondari sopraelencati.

4 RISULTATI

4.1 Popolazione oggetto dello studio

266 individui sono stati consecutivamente testati per SARS-CoV-2 sia tramite RT-PCR sia con tampone antigenico di terza generazione LumiraDx™ nel reparto di Malattie Infettive e Tropicali dell'ospedale universitario di Padova.

Ciascun soggetto è stato testato una media di 2,3 ($\pm 1,4$) volte. Vi erano 198 pazienti sintomatici (74,4%) e 68 pazienti paucisintomatici (25,6%). In particolare, sono stati eseguiti 159 test su soggetti paucisintomatici (26,5%), e i rimanenti 442 test su soggetti sintomatici (73,5%). L'età media era di 65,5 ($\pm 14,7$) anni e la popolazione testata era principalmente di sesso maschile (59,8%). Nella *Tabella 1* è rappresentata la distribuzione dei soggetti per tipologia di variante.

Tabella 1. Variabili cliniche del campione di studio

	n soggetti	%	n test	%
Genere				
Uomo	159	59,8	372	61,9
Donna	107	40,2	229	38,1
Sintomi				
Sintomatico	198	74,4	442	73,5
Paucisintomatico	68	25,6	159	26,5
Fasce d'età				
21-40	15	5,6	31	5,2
41-60	73	27,4	174	28,9

61-80	140	52,6	325	54,1
81-100	38	14,3	71	11,8
Giorni trascorsi dall'inizio dei sintomi al momento del test				
0-6	245	-	382	63,6
7-13	157	-	199	33,1
14-20	13	-	18	3
21-27	2	-	2	0,3
Varianti COVID-19				
BA.4/BA.5	156	-	344	57,2
BA.4	2	-	4	0,7
BA.5	4	-	14	2,3
BQ1.1	27	-	54	9
BA.2	8	-	15	2,5

Nella *Tabella 2* sono rappresentate la relazione tra l'analisi del test e le variabili cliniche evidenziando i falsi negativi e falsi positivi in numero assoluto e percentuale per singola variabile. Non si sono rilevate significative associazioni tra il genere del paziente e gli esiti falsi negativi ($p=0,58$), mentre è stata riscontrata una differenza rilevante associata al sesso per i tamponi falsi positivi ($p<0,001$). In aggiunta abbiamo registrato risultati associati ai sintomi molto contrastanti sia per i test falsi negativi ($p=0,001$), che per i falsi positivi ($p=0,012$).

Come mostrato nella *Tabella 3*, il test LumiraDx™, nel complesso, presenta una sensibilità del 93,1% (90,6, 95), una specificità del 79,7% (70, 87,1), un VPP di 96,81% (94,89, 98), un VPN di 63,64% (53,8, 71,4), e accuratezza del 91,3% (88,8, 93,3).

Tabella 2. Relazione tra l'analisi del test e le variabili cliniche

	+	-	+	-	FN	FP
	III gen n (%)	III gen n (%)	RT-PCR n (%)	RT-PCR n (%)	n (%)	n (%)
Sesso						
Uomini	316 (62,9)	56 (56,6)	330 (63,2)	42 (53,2)	19 (52,7)	5 (31,2)
Donne	186 (37,1)	43 (43,4)	192 (36,8)	37 (46,8)	17 (47,2)	11 (68,7)
Sintomi						
Sintomatici	377 (75,1)	65 (65,7)	397 (76,0)	45 (56,9)	30 (83,3)	10 (62,5)
Paucisintomatici	125 (24,9)	34 (34,3)	125 (24,9)	34 (43,0)	6 (16,7)	6 (37,5)
Fasce d'età						
21-40	26 (5,2)	5 (5,1)	23 (4,4)	8 (10,1)	0 (0,0)	3 (18,7)
41-60	142 (28,3)	32 (32,3)	149 (28,5)	25 (31,6)	10 (27,8)	3 (18,7)
61-80	270 (53,8)	55 (55,6)	286 (54,8)	39 (49,4)	24 (66,7)	8 (50,0)
81-100	64 (12,7)	7 (7,07)	64 (12,3)	7 (8,9)	2 (5,6)	2 (12,5)
Giorni trascorsi dall'inizio dei sintomi al momento del test						
0-6	361 (71,9)	21 (21,2)	361 (69,2)	26 (26,6)	8 (22,2)	8 (50,0)
7-13	131 (26,1)	68 (68,7)	151 (28,9)	48 (60,8)	26 (72,2)	6 (36,5)
14-20	8 (1,6)	10 (10,1)	9 (1,7)	9 (11,4)	2 (5,6)	1 (6,2)
21-27	2 (0,4)	0 (0,0)	1 (0,2)	1 (1,3)	0 (0,0)	1 (6,2)

Varianti COVID-19						
BA.4/BA.5	309 (61,5)	35 (35,3)	317 (60,7)	27 (34,2)	14 (38,8)	6 (37,5)
BA.4	4 (0,8)	0 (0,0)	4 (0,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
BA.5	13 (2,6)	1 (1,01)	13 (2,5)	0 (0,0)	1 (2,8)	0 (0,0)
BQ1.1	50 (9,9)	4 (4,0)	53 (10,1)	1 (1,3)	3 (8,3)	0 (0,0)
BA.2	12 (2,4)	3 (3,0)	13 (2,5)	2 (2,5)	1 (2,8)	0 (0,0)
B.1.1.529	1 (0,2)	0 (0,0)	1 (0,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Bassa carica virale	113 (22,5)	56 (56,6)	120 (22,99)	49 (62,0)	17 (47,2)	10 (62,5)
Totale	502	99	522	79	36	16

Legenda A. (+): positivo; (-): negativo; (n): numero di test; (FN): falsi negativi; (FP): falsi positivi

Tabella 3. Indicatori di valutazione del test LumiraDx™

	Sensibilità (CI)	Specificità (CI)	PPV (CI)	NPV (CI)	Accuratezza (CI)
Sesso					
Uomini	94,2 (91,2, 96,3)	88,1 (75,0, 94,8)	98,4 (96,3, 99,3)	66,1 (53,0, 77,1)	93,5 (90,6, 95,6)
Donne	91,1 (86,3, 94,4)	70,3 (54,2, 82,5)	94,1 (89,7, 96,7)	60,5 (45,6, 73,6)	87,8 (82,9, 91,4)
Sintomi					
Sintomatici	92,4 (89,4, 94,7)	77,8 (63,7, 87,5)	97,3 (95,2, 98,5)	53,8 (41,8, 65,4)	90,9 (87,9, 93,3)

Paucisintomatici	95,2 (89,9, 97,8)	82,3 (66,5, 91,6)	95,2 (89,9, 97,8)	82,3 (66,5, 91,6)	92,4 (87,3, 95,6)
Fasce d'età					
21-40	100,0 (85,7, 100,0)	62,5 (30,6, 86,3)	88,5 (71,0, 96,0)	100,0 (56,5, 100,0)	90,3 (75,1, 96,6)
41-60	93,3 (88,1, 96,3)	88,0 (70,0, 95,8)	97,9 (94,0, 99,3)	68,7 (51,4, 82,0)	92,5 (87,6, 95,6)
61-80	91,6 (87,8, 94,3)	79,5 (64,5, 89,2)	97,0 (94,3, 98,5)	56,4 (43,3, 68,6)	90,1 (86,4, 92,9)
81-100	96,9 (89,3, 99,1)	71,4 (35,9, 91,8)	96,9 (89,3, 99,1)	71,4 (35,9, 91,78)	94,4 (86,4, 97,8)
Giorni trascorsi dall'inizio dei sintomi al momento del test					
0-6	97,8 (95,7, 98,9)	61,9 (40,9, 79,2)	97,8 (95,7, 98,9)	61,9 (40,9, 79,2)	95,8 (93,3, 97,4)
7-13	82,8 (76,0, 88,0)	87,5 (75,3, 94,1)	95,4 (90,4, 97,9)	61,8 (49,9, 72,4)	83,9 (78,2, 88,4)
14-20	77,8 (45,3, 93,7)	88,9 (56,5, 98,0)	87,5 (52,9, 97,8)	80,0 (49,0, 94,3)	83,3 (60,8, 94,2)
21-27	100,0 (20,6, 100,0)	0,0 (0,0, 79,3)	50,0 (9,4, 90,5)	-	50,0 (9,4, 90,5)
Varianti COVID-19					
BA.4/BA.5	95,6 (92,7, 97,3)	77,8 (59,2, 89,4)	98,1 (95,8, 99,1)	60,0 (43,6, 74,4)	94,2 (91,2, 96,2)
BA.4	100,0 (51,0, 100,0)	-	100,0 (51,0, 100,0)	-	100,0 (51,0, 100,0)

BA.5	92,9 (68,5, 98,7)	-	100,0 (77,2, 100,0)	0,0 (0,0, 79,3)	92,9 (68,5, 98,7)
BQ1.1	94,3 (84,6, 98,1)	100,0 (20,6, 100,0)	100,0 (92,9, 100,0)	25,0 (4,6, 69,9)	94,4 (84,9, 98,1)
BA.2	92,3 (66,7, 98,6)	100,0 (34,2, 100,0)	100,0 (75,7, 100,0)	66,7 (20,8, 93,85)	93,3 (70,2, 98,8)
B.1.1.529	100,0 (20,6, 100,0)	-	100,0 (20,6, 100,0)	-	100,0 (20,6, 100,0)
Bassa carica virale	85,8 (78,5, 91,0)	79,6 (63,0, 87,2)	91,1 (84,5, 95,1)	69,6 (53,0, 78,0)	84,0 (77,1, 88,4)
Totale	93,1 (90,6, 94,98)	79,75 (69,6, 87,13)	96,8 (94,89, 98,03)	63,64 (53,82, 72,44)	91,35 (88,83, 93,34)

Legenda B. (CI): intervallo di confidenza; (PPV): valore predittivo positivo; (NPV): valore predittivo negativo

Nella *Tabella 4* si analizza il primo tampone eseguito su ciascun paziente per rilevare con quale variante erano stati infettati. Dal sequenziamento è emerso che BA.4/BA.5 è stata la variante maggiormente presente, con un Ct medio di 21, rivelatosi inferiore rispetto al valore medio complessivo. La maggior carica virale è stata individuata in un soggetto infetto con B.1.1.529, ma essendo l'unico riscontro di tale variante, non è stato possibile effettuare ulteriori valutazioni. In ogni caso non si è rilevata una differenza significativa tra i valori medi del Ct delle singole varianti.

In *Tabella 5* sono riportati l'andamento dei test per singolo soggetto seguito nel tempo, evidenziando la variazione dei parametri in funzione del tempo trascorso dalla comparsa dei sintomi.

Nella *Tabella 6* abbiamo calcolato alcuni parametri per valutare l'affidabilità del test antigenico rapido LumiraDx™, prendendo in considerazione l'evoluzione temporale dell'infezione nel singolo individuo.

La sensibilità varia tra l'85,71% e il 97,63%, valori ottenuti per i quarti e i primi test eseguiti.

Tabella 4. I valori del Ct per le varianti di Covid-19

Varianti COVID-19	n	Valore medio Ct (CI)
BA.4/BA.5	155	21,0 (20,5, 21,5)
BA.4	2	23,0 (23,0, 23,0)
BA.5	4	22,5 (16,1, 28,8)
BQ1.1	25	20,38 (19,0, 21,7)
BA.2	7	20,86 (16,9, 24,8)
B.1.1.529	1	17,0 (-, -)
Low viral load	72	27,33 (26,4, 28,0)
Totale	266	22,39 (21,9, 22,9)

Legenda C. (n): numero di tamponi; (CI): intervallo di confidenza

Tabella 5. test per singolo soggetto con variazione dei parametri in funzione del tempo trascorso dalla comparsa dei sintomi.

	Giorni trascorsi dalla comparsa dei sintomi	Giorni dal test precedente (std)	Ct (std)	Unità Ct dal test precedente (std)	Numero di test (%)	+ real time RT-PCR (%)	+ Lumira DxTM (%)
I test	3,79 (± 2,3)	-	22,4 (±4,2)	-	266 (44,3)	253 (95,1)	251 (94,4)
II test	7,01 (±3,6)	3,5 (± 3,0)	25,29 (±4,3)	3,43 (4,8)	173 (28,8)	153 (88,4)	139 (80,3)
III test	6,7 (±3,3)	1,88 (± 2,3)	26,32 (±4,1)	1,98 (3,6)	92 (15,3)	73 (79,3)	71 (77,2)
IV test	10,42 (±2,3)	4,96 (± 1,3)	26,69 (±4,1)	0,31 (4,4)	53 (8,8)	35 (66,0)	33 (62,3)

Tabella 6. Affidabilità del test antigenico rapido LumiraDxTM, considerando l'evoluzione temporale dell'infezione nel singolo individuo

	Sensibilità (CI)	Specificità (CI)	PPV (CI)	NPV (CI)	Accuratezza (CI)
I test	97,6 (94,9, 98,9)	69,23 (42,4, 87,3)	98,4 (96,0, 99,4)	60,0 (35,7, 80,2)	96,2 (93,2, 97,9)
II test	88,2 (83,2, 96,2)	80,0 (58,4, 91,9)	97,1 (82,8, 98,9)	47,1 (31,4, 63,3)	87,3 (81,5, 91,4)
III test	91,8 (83,2, 96,2)	78,9 (56,7, 91,5)	94,4 (86,4, 97,8)	71,4 (50,0, 86,1)	89,1 (81,1, 94,0)
IV test	85,7 (70,6, 93,7)	83,3 (60,8, 94,2)	90,9 (76,4, 96,9)	75,0 (53,1, 88,8)	84,9 (72,9, 92,1)

4.2 L'impatto dei valori del Ct e dei giorni dall'insorgenza dei sintomi sulla sensibilità del LumiraDx™

I Valori del Ct sono stati registrati per 478 *assay* RT-PCR. Il valore minimo del Ct è 12, il massimo è 36 mentre il valore medio è 25 ($\pm 4,5$).

La distribuzione è quasi normale; più precisamente Q1 (primo quartile) è 21, Q2 (la mediana) è 24 e Q3 (terzo quartile) è 27.

C'è una significativa differenza nella distribuzione del Ct per genere ($p=0,06$). Al contrario non è stata rilevata alcuna differenza significativa confrontando gruppi con età differenti e la gravità dei sintomi.

La sensibilità del test antigenico LumiraDx™ decresce al progressivo incremento del Ct. Nello specifico, selezionando solo i tamponi con Ct inferiore a 25, la sensibilità è uguale al 100% (262 test). Considerando tutti i test con un valore di Ct sotto i 30, ovvero includendo l'87,4% di tutti i test abbiamo registrato 9 test falsi negativi con una sensibilità del 97,8%. Includendo tutti i tamponi con Ct pari o inferiore a 33, la sensibilità decresce al 94,9%.

4.3 Sensibilità e giorni trascorsi dall'inizio dei sintomi

Per 601 test è stata raccolta la tempistica di insorgenza della sintomatologia. Il valore minimo tra insorgenza dei sintomi e primo tampone è di 0 giorni mentre il massimo è di 25 giorni. Il valore medio è di $6,1 \pm 3,9$ giorni. La distribuzione di questi valori è caratterizzata dal primo quartile Q1 circa a 3, il secondo quartile Q2 è 5 e il terzo quartile Q3 è 9.

I soggetti testati con meno di 7 giorni dall'insorgenza dei sintomi sono 382 (63,6%). Tra questi, 8 non sono stati rilevati correttamente dal LumiraDx™, quindi la sensibilità in questo range è del 97,8%. I soggetti che hanno presentato sintomi per almeno 13 giorni sono 581 (96,7%). Tra questi, 34 sono test falsi negativi e la sensibilità decresce al 93,4%. Infine, per quanto riguarda i pazienti che hanno presentato sintomi per meno di 21 giorni,

includiamo 599 soggetti (99,7%), con una sensibilità del 93,1%, avendo ottenuto 36 test falsi negativi.

Il numero dei giorni trascorsi dall'insorgenza della sintomatologia ha mostrato una relazione positiva con il valore del Ct (il coefficiente di Spearman è $p=0,47$ con un $pvalue<0,05$). Questo significa che vi è una relazione monotonica moderatamente crescente tra le due variabili.

I boxplot orizzontali nella Figura 1 rappresentano le distribuzioni dei giorni che son trascorsi dall'insorgenza dei sintomi per i test falsi negativi e veri positivi (in blu e in rosso rispettivamente). Nella stessa figura, sulla destra, possiamo trovare due boxplot verticali che rappresentano la distribuzione del valore del Ct per i test falsi negativi e i veri positivi (in blu e in rosso rispettivamente). I test falsi negativi erano caratterizzati sia da un più alto numero di giorni ($Q2=9$ vs. $Q2=4$) sia da un più alto valore del Ct ($Q2=31$ vs $Q2=23$) se comparati con i test veri positivi ($p<0,001$ in entrambi i casi).

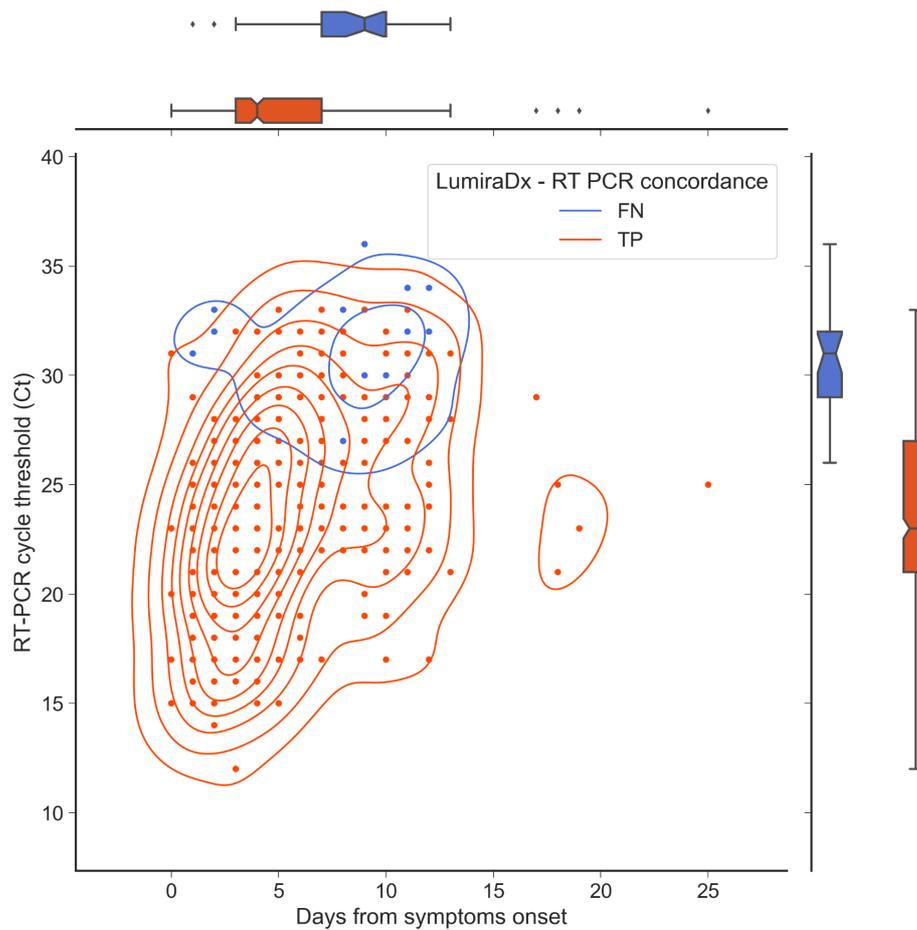


Figura 1. Coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman (correlazione=0,47, pvalue<0.001)

La *Figura 1* mostra una stima di densità multivariata. Le linee di contorno che sono più vicine tra di loro indicano una maggior concentrazione di probabilità in quella regione, mentre le linee di contorno che sono più distanti, indicano una più bassa concentrazione di probabilità. La curva più esterna può essere vista come il contorno della nostra distribuzione, ovvero come una curva all'interno della quale sono collocati la maggior parte dei nostri dati. Come possiamo osservare dal grafico, la densità di probabilità relazionata ai falsi negativi è concentrata sui valori del Ct e sui giorni trascorsi dall'insorgenza dei sintomi in modo molto più significativo rispetto ai valori assunti dai veri positivi.

La *Figura 2* mostra la sensibilità del test rapido LumiraDx™, in modo dipendente ai valori assunti dal Ct e ai giorni trascorsi dall'inizio dei

sintomi. Il grafico riporta una sensibilità riga per riga e colonna per colonna, inferiori sempre rispetto alla precedente. Ciò implica che, più alto è il valore del Ct (quindi più bassa è la carica virale), più bassa è la sensibilità; maggiore è il numero dei giorni trascorsi dall'inizio dei sintomi, minore è la sensibilità. Il risultato più alto, rappresentato con una tonalità di blu più scuro, è infatti stato raggiunto per i valori prossimi all'origine degli assi.

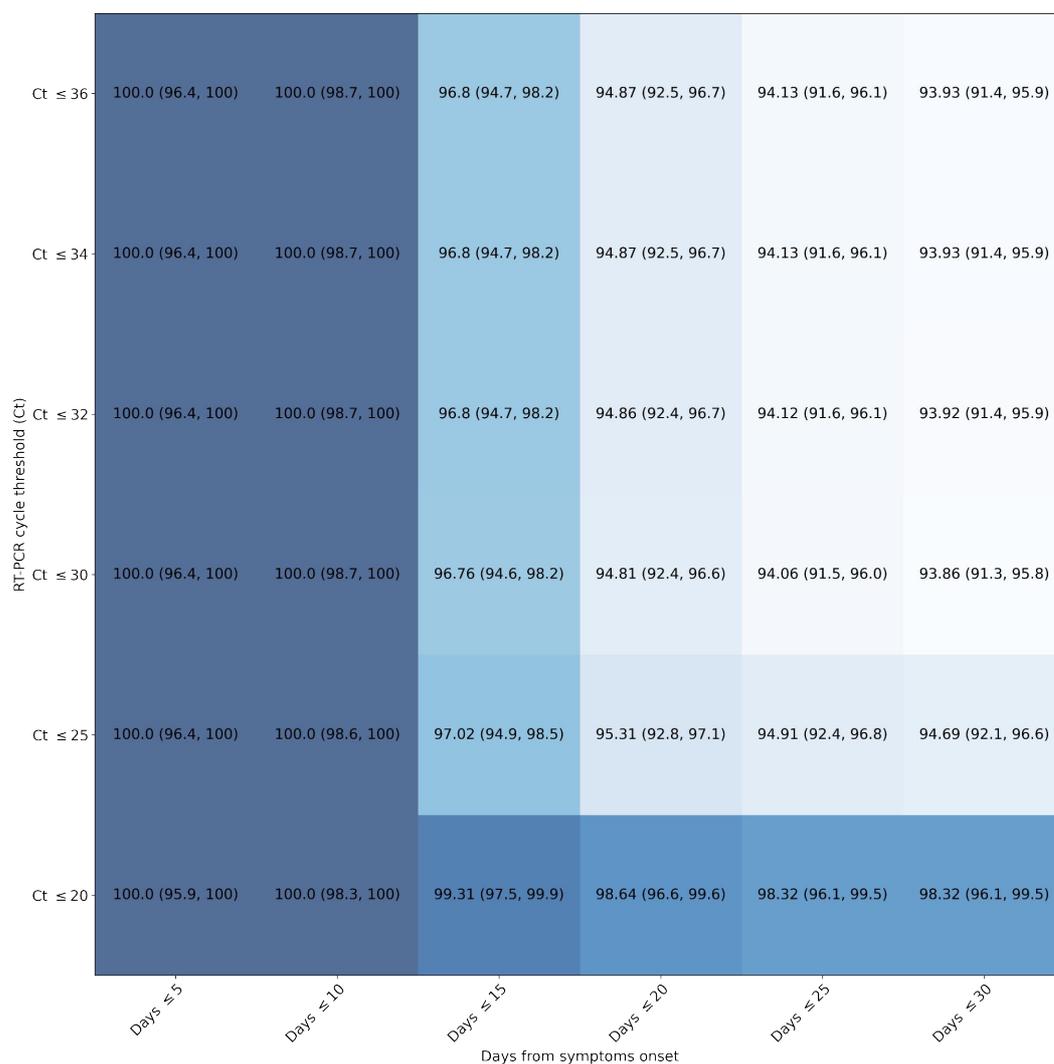


Figura 2. Mappa di calore che mostra la sensibilità in relazione ai valori del Ct e ai giorni trascorsi dall'inizio dei sintomi. Più scuro è il colore, maggiore è la sensibilità del test LumiraDx™ se messo a confronto con la RT-PCR standard

I risultati delle regressioni logistiche multilivello sono mostrate nella *Tabella 7*. L'unica variabile indipendente che si è dimostrata essere associata in modo significativo alla concordanza è il valore del Ct (p -value<0,001). L'odd ratio corrispondente è 0,56, sottintendendo che ogni volta che il valore del Ct aumenta di una unità, la probabilità di ottenere lo stesso output per il LumiraDx™ e per la RT-PCR decresce del 44%.

Tabella 7. Riepilogo della regressione logistica multilivello

Dependent variable Concordance (1 = Yes, TP; 0 = No, FN)						
Independent variable	Univariate model			Multivariable model		
	OR	95% CI*	p-value	OR	95% CI*	p-value
Male (reference Female)	1,48	(0,7, 3,2)	308	1,80	(0,6, 5,3)	291
Age	0,99	(1,0, 1,0)	624	0,99	(0,9, 1,0)	606
Ct value	0,57	(0,4, 0,7)	<0,001	0,56	(0,4, 0,7)	<0,001
Days from symptoms onset	0,56	(0,4, 0,7)	<0,001	0,88	(0,7, 1,03)	113
Symptomatic (reference Paucisymptomatic)	814	(0,3, 2,0)	662	0,84	(0,2, 2,9)	782
COVID-19 variant (reference BQ1.1)						
BA.2 Omicron	0,8	(0,1, 8,0)	824	0,17	(0,006, 4,9)	299
BA.4 Omicron	-	-	1,00	>10,000	(-, -)	997
BA.4/BA.5 Omicron	1,5	(0,4, 5,5)	549	1,12	(0,1, 8,2)	913

BA.5 Omicron	0,7	(0,1, 7,4)	769	0,77	(0,0, 21,7)	878
B.1.1.529 Omicron	-	-	1,00	1,55	(-, -)	998
Not specified/applicable	0,5	(0,1, 1,9)	308	0.96	(0,1, 7,4)	971

In *Tabella 8* sono riportati i valori riassuntivi delle quantità di microfluorescenza rilevate dai dispositivi. Tra i test con esito positivo, il fondo scala dei *device* (10000) è stato raggiunto già al primo quartile Q1.

Tabella 8. Distribuzioni valori medi di Lumira (-: test negativi, +: test positivi)

	Totale	Lumira-	Lumira+
conteggio	601	99	502
media	8695	3118	9794
standard	2608	810	814
min	1922	1922	5052
25%	10000	2440	10000
50%	10000	2899	10000
75%	10000	3776	10000
max	10000	5000	10000

In *Figura 3 e 4* sono infine state rappresentate le regressioni lineari tra i valori medi delle quantità di fluorescenza rilevate in confronto ai Ct dei corrispettivi tamponi molecolari. Nel primo dei due grafici sono stati rappresentati tutti i test molecolari con esito positivo, mentre nel secondo sono stati considerati solo i tamponi con valore medio della fluorescenza inferiore a 10000. In entrambi i casi è stato calcolato il coefficiente

di regressione, rispettivamente $-165,5$ (95%CI $-195,6, -135,4$) e $-185,7$ (95%CI $-417,7, 46,2$), ma l'associazione negativa è statisticamente significativa ($p\text{-value} < 0.001$) solo nel primo caso.

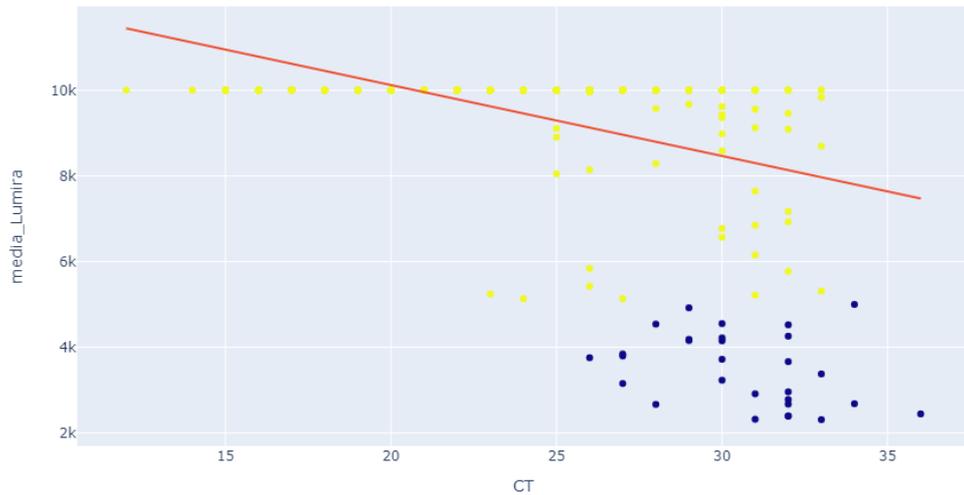


Figura 3. Regressione Lineare tra media risultati Lumira e valori CT (tutti i test molecolari positivi). In blu i Falsi Negativi, in giallo i Veri Positivi.

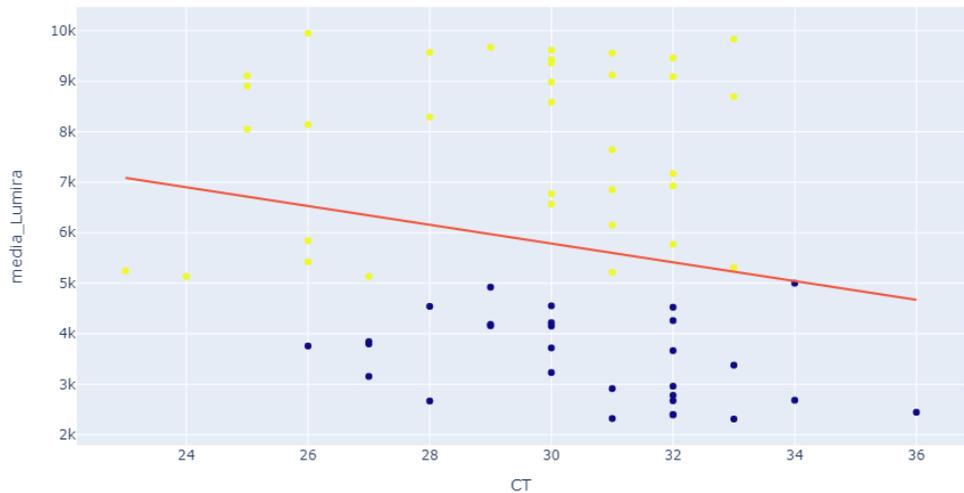


Figura 4. Regressione Lineare tra media risultati Lumira e valori CT (solo test con valore Lumira medio < 10000). In blu i Falsi Negativi, in giallo i Veri Positivi.

5 DISCUSSIONE

Nella popolazione esaminata, abbiamo identificato diversi *lineage* di Omicron: BA.2, BA.4-5 (tratto indeterminato tra la BA.4 e la BA.5), BA.5 e BQ.1. Queste varianti non erano rappresentate in modo equo nel corso del tempo, infatti, nel primo periodo dello studio (mesi di luglio, agosto e settembre), la variante dominante si è rivelata essere BA.4-5, successivamente surclassata da BA.5. Nelle ultime settimane abbiamo anche sequenziato il primo caso di BQ.1 in Italia, che sta ora rimpiazzando la BA.5.

L'esaurimento dello stato di emergenza non implica l'eradicazione di SARS-CoV2 che, con buona probabilità, superata la fase di transizione rimarrà un virus endemico. Proprio per questo, le strategie di testing devono essere evolute parimenti all'evoluzione dello scenario epidemiologico, motivo per cui oggi l'attenzione non è più incentrata a mitigare la circolazione virale, bensì è focalizzata sui pazienti fragili. Ecco, quindi, che innovare non significa introdurre nuove tecnologie o generazioni di test, ma utilizzare gli strumenti disponibili in maniera intelligente e sostenibile. Per esempio, benché sia utile introdurre un sistema di sorveglianza delle sindromi dei virus respiratori così come è stato fatto per COVID-19, questa risulta essere difficilmente proponibile per la popolazione generale. Al contrario, garantire un monitoraggio rapido, facile ed economico sui pazienti fragili può risultare un obiettivo strategico più semplice da raggiungere e non meno informativo.

Nel caso dei test antigenici, ciò non può prescindere da una periodica valutazione delle performance e nel nostro database, fortunatamente, abbiamo notato l'assenza variazioni statisticamente significative in termini di sensibilità e specificità per le diverse varianti Omicron. Questo risultato, inoltre, ci fa sperare che il test attualmente in uso possa conservarsi efficace anche in futuro per ulteriori varianti.

Analizzando gli errori diagnostici nella nostra popolazione osserviamo che questi sono occorsi in pazienti testati con un elevato numero di giorni dall'insorgenza dei sintomi (mediana = 9 versus 4 giorni rispettivamente nei

FN e nei VP) o con carica virale piuttosto bassa (Ct mediano = 31 versus 23) al punto da far risultare statisticamente significative le differenze ($p < 0,001$).

Infine, analizzando il valore predittivo negativo, che è stato calcolato essere 63,6% (53,8-72,4), dobbiamo ricordare che per definizione esso si basa sul numero di soggetti negativi presenti nella popolazione. Tuttavia, i nostri pazienti per definizione erano positivi a SARS-CoV-2, per cui un valore che potrebbe sembrare insufficiente in quanto troppo basso, è da riconsiderare in funzione del contesto. Inoltre, osserviamo che il valore predittivo negativo calcolato sui soli soggetti sintomatici risulta essere inferiore rispetto a quello dei paucisintomatici, il che significa che il medico può decidere di effettuare un secondo test di conferma in un numero limitato di casi, ovvero nei pazienti con esito negativo ma con sintomatologia suggestiva. E, proprio questi pazienti, sono quelli che possono risultare più interessanti per una logica di sorveglianza genomica per l'individuazione e monitoraggio di varianti emergenti.

Confermata la bontà della tecnologia in commercio, abbiamo provato a testare la funzione quantitativa che il *software* ci forniva. Sfortunatamente il fondo scala che i dispositivi ci restituivano era troppo basso, per cui dall'analisi statistica non è emerso nulla di rilevante essendo la gran parte dei valori schiacciati sul fondo scala stesso. In ogni caso, dall'evoluzione e miglioramento del software non escludiamo che si possano in un prossimo futuro sviluppare algoritmi diagnostici simili a quelli in uso oggi per la troponina, ovvero che si possa ipotizzare di non refertare solamente una positività o negatività, ma che si possano fornire al cittadino anche informazioni sulla propria curva di guarigione.

6 CONCLUSIONE

A seguito delle evidenze raccolte, la diagnostica antigenica di terza generazione LumiraDx™ si conferma essere uno strumento valido per l'individuazione dei casi positivi a SARS-CoV-2. Nello specifico è stato dimostrato che la circolazione di differenti varianti non ha inficiato significativamente il potere diagnostico dei kit in commercio.

Per quanto attiene al software in fase di sviluppo, riteniamo possa avere promettenti potenzialità, ma il fondoscala disponibile sui dispositivi utilizzati è risultato insufficiente per consentire ulteriori valutazioni.

7 BIBLIOGRAFIA

1. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 [Internet]. 2020. Disponibile su: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
2. Liu J, Li Y, Liu Q, Yao Q, Wang X, Zhang H, et al. SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection. *Cell Discov.* 23 marzo 2021;7(1):17.
3. Edouard Mathieu and Hannah Ritchie and Lucas Rodés-Guirao and Cameron Appel and Charlie Giattino and Joe Hasell and Bobbie Macdonald and Saloni Dattani and Diana Beltekian and Esteban Ortiz-Ospina and Max Roser. Coronavirus Pandemic (COVID-19). Disponibile su: <https://ourworldindata.org/mortality-risk-covid#citation>
4. Liu Y, Rocklöv J. The reproductive number of the Delta variant of SARS-CoV-2 is far higher compared to the ancestral SARS-CoV-2 virus. *J Travel Med.* 1 ottobre 2021;28(7):taab124.
5. Ying Liu, MS and Joacim Rocklöv. The effective reproductive number of the Omicron variant of SARS-CoV-2 is several times relative to Delta. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8992231/>
6. DECRETO DEL PRESIDENTE DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI 8 marzo 2020. Disponibile su: <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2020/03/08/20A01522/sg>
7. DECRETO-LEGGE 7 ottobre 2020, n. 125. Disponibile su: <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2020/10/07/20G00144/sg>
8. RACCOMANDAZIONE (UE) 2020/1743 DELLA COMMISSIONE del 18 novembre 2020 sull'uso di test antigenici rapidi per la diagnosi dell'infezione da SARS-CoV-2 [Internet]. Disponibile su: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020H1743&from=IT>
9. premio nobel [Internet]. Disponibile su: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/facts/>
10. Elif Yilmaz Gulec, corresponding author 1 , 2 Nevra P. Cesur, 3 , 4 Gonca Yesilyurt Fazlıoğlu, 3 , 5 and Cemal Kazezoğlu. Effect of different storage conditions on COVID-19 RT-PCR results. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8426709/#jmv27204-bib-0008>
11. Zhang Y, Garner R, Salehi S, Rocca ML, Duncan D. Molecular and antigen tests, and sample types for diagnosis of COVID-19: a review. *Future Virol.* giugno 2022;17(9):675–85.
12. Costo tampone Azienda Ospedaliera Padova [Internet]. Disponibile su: <https://aoup.myprenota.it/tamponiperviaggiatori>
13. Oliver T Mytton, 1 , 2 Noel McCarthy, 3 Jessica Watson, 4 ,

-
- 5 Penny Whiting. Interpreting a lateral flow SARS-CoV-2 antigen test. Disponibile su: <https://www.sipmel.it/notizie/118011-BMJ2021-InterpretingLatFlowTest.pdf>
14. Ludwig Czibere,a Siegfried Burggraf,a Marc Becker,a,b Jürgen Durner,a,b,1,* and Miriam E. Draenert. Verification of lateral flow antigen tests for SARS-CoV-2 by qPCR directly from the test device. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8919771/>
15. Paul C Guest 1 , Hassan Rahmoune. COVID-19 Detection Using the NHS Lateral Flow Test Kit. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35838969/>
16. Ministero della Salute. Aggiornamento della definizione di caso COVID-19 e strategie di testing [Internet]. 2021. Disponibile su: <https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2021&codLeg=78155&parte=1%20&serie=null>
17. Jiang XL, Zhang XL, Zhao XN, Li CB, Lei J, Kou ZQ, et al. Transmission Potential of Asymptomatic and Paucisymptomatic Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infections: A 3-Family Cluster Study in China. *J Infect Dis.* 11 giugno 2020;221(12):1948–52.
18. Decreto del presidente del consiglio dei ministri 17 giugno 2021 [Internet]. Disponibile su: <https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/dettaglioAtto?id=81157&articolo=1>
19. ECDC. Considerations on the use of self-tests for COVID-19 in the EU/EEA [Internet]. Disponibile su: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/considerations-use-self-tests-covid-19-eueea>
20. COVID-19 testing strategies and objectives [Internet]. Disponibile su: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/TestingStrategy_Objective-Sept-2020.pdf
21. Idrossiclorochina nella terapia dei pazienti adulti con Covid-19 [Internet]. Disponibile su: https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1123276/idrossiclorochina%20update05_22.12.2020.pdf
22. Aifa. Farmaci utilizzabili per il trattamento della malattia COVID-19 [Internet]. Disponibile su: <https://www.aifa.gov.it/aggiornamento-sui-farmaci-utilizzabili-per-il-trattamento-della-malattia-covid19>
23. Costo Remdesivir [Internet]. Disponibile su: <https://informatore.it/flash-news/economia/gilead-ufficializza-il-prezzo-del-remdesivir-390-euro-a-fiala-2340-per-la-terapia-completa/>
24. Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for COVID-19 Testing [Internet]. Disponibile su:

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>

