

**Valutazione dell'idoneità della tecnica RT-qPCR
per la rilevazione di una possibile infezione e
dell'infettività di individui per quanto riguarda il
SARS-CoV-2**

Opinione degli esperti

Ciambellano, Ulrike

Prefisso

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è un fantastico metodo molecolare con cui è possibile rilevare in laboratorio le più piccole tracce di un acido nucleico ricercato (DNA o RNA, a seconda della variante della PCR). Ciò rende la tecnica un valido aiuto per l'analisi dei pattern genici nei campioni più piccoli nella ricerca, ma anche nella diagnostica di routine, ad esempio nelle prove forensi, nel monitoraggio della contaminazione di grandi lotti di alimenti e bevande, nella ricerca di tracce di specie animali non autorizzate, ad esempio nei prodotti a base di carne e insaccati (parola chiave carne di cavallo nella carne macinata) o nel monitoraggio dei prodotti ematici per la ricerca di genomi virali di HIV e virus dell'epatite.

Tuttavia, questa estrema sensibilità rende la tecnica molto suscettibile di contaminazione (vedi "Fantasma di Heilbronn" al punto 3.5) o di sovrainterpretazione dei risultati se la PCR viene utilizzata come unico criterio senza un ulteriore contesto. Ad esempio, la firma genetica di un ricercato rinvenuta sulla scena di un crimine può essere considerata solo un'indicazione e quindi non può provare con certezza né che la persona fosse personalmente presente in quel luogo, né se la traccia genetica rinvenuta provenga da una persona viva o morta. Per fare un paragone: la rilevazione dei geni mediante PCR è sensibile come se un etilometro potesse ancora rilevare lo 0,0000000008- per mille di alcol nel sangue e farlo passare per "intossicato" e quindi far finire nei guai un automobilista durante un controllo, anche se non ha consumato una goccia di alcol e non ha nemmeno segni di consumo di alcol.

La tecnica della PCR (anche RT-PCR o RT-qPCR), tuttavia, può sempre e solo amplificare e rilevare il frammento genico ricercato, indipendentemente dall'estrema sensibilità, ma non può chiarire se questo provenga da un organismo vitale o in riproduzione.

La reazione a catena della polimerasi quantitativa con trascrittasi inversa (**RT-qPCR**) utilizzata nella ricerca dei casi di SARS-CoV-2 è una variante della PCR in cui l'RNA del materiale di partenza viene prima trascritto in DNA e poi amplificato nella PCR in modo tale che i segnali luminosi in ogni ciclo di copiatura forniscano un'indicazione della quantità di genomi duplicati.

Come unico strumento per diagnosticare l'infezione attiva o addirittura l'infettività da SARS-CoV-2, questa tecnica molecolare non è adatta a test di massa per numerose ragioni. Tuttavia, la tecnica della PCR può essere utilizzata per supportare una diagnosi differenziale in presenza di sintomi, rilevando la firma genica di un possibile agente patogeno, che può quindi essere correlata dal medico ai sintomi del paziente. Tuttavia, la PCR non deve e non può mai essere l'unico strumento diagnostico per una possibile malattia.

Nella discussione sull'idoneità della RT-qPCR per l'identificazione dei pazienti affetti da Covid 19, un test PCR positivo in una persona sana asintomatica viene spesso utilizzato per riferirsi a questa persona come "paziente asintomatico". Tuttavia, secondo le definizioni generalmente accettate, una persona priva di sintomi clinici ("asintomatica") non è né infetta né malata, cfr. ALLEGATO 1.

(definizioni dei termini) e punti 1.5 e 1.6.

Schema:

1. Definizione di termini importanti

1 1. reazione a catena della polimerasi (PCR) *Pagina 4*

1.2 PCR quantitativa (qPCR) *Pagina 5*

1 3. reazione di trascrittasi inversa (RT) *Pagina 6*

1 4. sensibilità e specificità *pagina 6*

1 5. infezione *pagina 6*

Paziente *pagina 7*

2. Informazioni di base sul significato diagnostico in relazione alla questione della "contagiosità".

2.1. Dichiarazioni ufficiali di importanti istituzioni ufficiali/esperti sull'inutilità della PCR come unico test diagnostico per il rilevamento dell'infettività o del rischio di infezione *Pagina 8*

- A) Ufficio svizzero della protezione civile (Laboratorio Spiez) *Pagina 8*
- B) Antony Fauci (consigliere medico capo del presidente degli Stati Uniti, capo dell'Istituto nazionale statunitense per le allergie e le malattie infettive (NIAID)) *Pagina 8*
- C) Prof. Marion Koopmanns (Capo dell'Istituto di virologia dell'Università Erasmus e consulente dell'OMS) *Pagina 9*
- D) Ministero della Salute svedese *Pagina 10*
- E) Centro nazionale per le malattie infettive di Singapore *Pagina 11*
- F) Pubblicazioni sulla natura Wölfel R sui primi casi in Germania *Pagina 11*
- G) Articolo di Nature Reviews di Isabella Eckerle (Ginevra) *pag. 12*

2.2. **La preparazione del campione esclude la rilevazione di virus in grado di replicarsi.**
Pagina 13

2 3. conclusione intermedia *pagina 14*

2.4 Figura che mostra una panoramica dei metodi diagnostici RT-qPCR, test rapido dell'antigene e isolamento del virus in coltura cellulare *Pagina 16*

3. Fattori che influenzano l'affidabilità del test PCR *Pagina 20*

3.1. Progettazione e specificità della PCR *Pagina 17*

3.2. Numero di geni target indipendenti ("target") *Pagina 18*

3.3. Numero di cicli eseguiti (valore CT) *Pagina 20*

3.3.1 Significato del valore CT

3.3.2 Prove della rilevanza del valore della TC

3.3.3 Conclusione provvisoria

3.4. Controlli adeguati *Pagina 29*

3.4.1 Predisposizione di controlli adeguati *Pagina 30*

3.4.2 Confronti interlaboratorio: anomalie nel primo lotto *Pagina 31*

3.5. Esclusione della contaminazione dei reagenti e dei "problemi nel corso dell'azione". *Pagina 32*

3.5.1 Contaminazione all'interno del laboratorio dovuta a errori di esecuzione *Pagina 32*

3.5.2 Contaminazione di materiali/reagenti da parte del produttore *Pagina 34*

3.5.3 Conclusione provvisoria *Pagina 34*

3.6. Kit di test PCR commerciali *Pagina 34*

4. Relazione tra la positività della rilevazione degli acidi nucleici nella RT-qPCR e la malattia e l'infettività *Pagina 36*

5. Conclusioni e sintesi *Pagina 39*

6. Allegati

ALLEGATO 1: Definizione di "infezione" e "paziente"

ALLEGATO 2: Descrizione della PCR dell'Ufficio svizzero della protezione civile (Laboratorio Spiez)

ALLEGATO 3: Rappresentazione grafica dei valori di CT in relazione al numero di genomi iniziali utilizzando come esempio il kit di test Viasure.

ALLEGATO 4: Revisione altamente pubblicata sulla valutazione di diversi metodi diagnostici di Isabella Eckerle, Nature Reviews Microbiology, 02.12.2022, con evidenziazioni in giallo.

ALLEGATO 5: Lettera di ritrattazione Scienza

1. Definizione e descrizione di termini importanti

1.1. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

In una **reazione a catena della polimerasi (PCR)**, un breve pezzo definito (di solito 100-1000 basi) di acido desossiribonucleico (DNA) viene amplificato con l'aiuto dell'enzima polimerasi. Il pezzo di DNA da amplificare viene ristretto con l'aiuto di due brevissimi segmenti di DNA a singolo filamento, i "primer".

Questi **primer** sono solitamente costituiti da una sequenza definita di 18-25 basi di acido nucleico (la sequenza del primer) che corrispondono specificamente alle regioni del DNA che fiancheggiano la sezione da amplificare. Per garantire la specificità della PCR, questi primer devono corrispondere esplicitamente solo a questa regione fiancheggiante e a nessun'altra regione del DNA. Con l'aiuto di grandi banche dati di geni e di corrispondenti programmi software (ad es. [Primer-Blast](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), questi primer possono essere progettati in modo altamente specifico per la PCR. Aziende specializzate sintetizzano quindi le catene molecolari a partire dalle sequenze di primer inviate e le consegnano al laboratorio di PCR o al produttore di kit di PCR. Questi primer devono essere testati con controlli positivi e negativi validi in un'ampia varietà di condizioni sperimentali e ottimizzati nell'uso. Ciò garantisce che solo il DNA da ricercare venga riconosciuto e amplificato con la coppia di primer utilizzata, ma non altri segmenti di DNA simili.

Una volta individuati i primer e la loro specificità, il DNA da amplificare può essere mescolato con la coppia di primer, varie sostanze chimiche ausiliarie e l'enzima polimerasi in un lotto di reazione e la reazione a catena può essere avviata.

Procedura **PCR**: si svolge in ripetizioni cicliche delle seguenti singole fasi:

1. La miscela viene bollita (denaturata) a più di 90°C. In questo modo i filamenti di DNA, solitamente presenti come doppio filamento, vengono separati in filamenti singoli. In questo modo si separano i filamenti di DNA, solitamente presenti come doppio filamento, in filamenti singoli per consentire il successivo fissaggio dei primer.

2. Durante il successivo raffreddamento alla cosiddetta "**temperatura di annealing**", i primer possono attaccarsi alle regioni corrispondenti sui filamenti di DNA separati. Il legame dei primer, l'annealing, avviene solo in un intervallo di temperatura strettamente limitato, la cosiddetta temperatura di fusione. Ciò dipende principalmente dalla composizione delle basi dei primer e quindi la loro sequenza sarà idealmente sempre scelta in modo che entrambi i primer abbiano la stessa temperatura di fusione di circa 60°C. I primer attaccati formano i filamenti di DNA. I primer attaccati costituiscono il punto di partenza per la polimerasi.

3. Partendo dai primer, questa polimerasi completa il DNA a singolo filamento, presente a causa del riscaldamento, riportandolo a un doppio filamento corrispondente (**allungamento**) di solito a circa 72°C.

A causa della posizione dei due primer sui lati laterali della sezione di DNA ricercata, le reazioni di allungamento sui singoli filamenti avvengono in direzioni opposte, poiché la polimerasi lavora solo in una direzione alla volta. Al termine di questa fase, da un DNA originale a doppio filamento sono state create due molecole di DNA identiche, che vengono nuovamente separate per ebollizione, quindi duplicate in quattro molecole di DNA identiche con l'aiuto dell'aggiunta di primer e della polimerasi, e così via.

Ogni ciclo di PCR costituito da bollitura-riscaldamento-allungamento provoca un raddoppio della sezione di DNA ricercata, in modo che l'amplificazione avvenga nel logaritmo di 2 e quindi sia disponibile molto rapidamente un numero estremamente elevato di copie del materiale di partenza originale.

Così, dopo 10 cicli di PCR, un filamento di DNA diventa già $2^{10} = 1.024$ copie di DNA, dopo 20 cicli già più di 1 milione (1.048.576) e dopo 30 cicli più di 1 miliardo (1.073.741.824) di copie.

1.2. PCR quantitativa (qPCR)

Nella tecnica della **PCR quantitativa (qPCR)**, attualmente utilizzata principalmente in tutto il mondo per rilevare l'RNA genomico del SARS-CoV-2, viene utilizzato un terzo breve pezzo di DNA, simile ai due primer, che può legarsi in modo appropriato al centro della sezione di DNA ricercata, la "**sonda**". A differenza dei due primer, questa sonda è ancora collegata a due molecole, un colorante fluorescente a un'estremità e un'altra molecola (quencher), che può impedire l'emissione di fluorescenza purché entrambe si trovino contemporaneamente sul campione (cioè in prossimità l'una dell'altra). Durante la fase di allungamento, la polimerasi degrada la sonda. Questo separa il quencher e la molecola di fluorescenza può ora emettere il suo segnale di colore. Questo segnale cromatico viene rilevato e misurato nel dispositivo che esegue la PCR (termociclatore). Ad ogni ciclo di PCR, vengono rilasciati sempre più segnali di fluorescenza in base al numero crescente di copie, la sonda si "illumina" sempre di più. La curva dell'intensità del segnale cromatico aumenta ad ogni ciclo. A un certo valore, la curva supera il rumore di fondo (valore di soglia) e viene valutata come positiva. Il numero di cicli in cui il valore di soglia viene superato è chiamato **valore CT** (CT sta per "cycle threshold").

Quanto più velocemente la fluorescenza sale al di sopra del valore soglia impostato (CT basso), tanto più copie iniziali del DNA ricercato erano presenti nell'approccio PCR. Poiché né i primer né l'enzima polimerasi funzionano sempre in modo specifico al 100%, in ogni PCR-

Anche in questo caso viene copiata una frazione di DNA non specifico. E più sono i cicli della PCR, maggiore è il rischio che anche queste poche reazioni aspecifiche superino il valore di soglia. Da un valore di CT pari a 40, è quindi molto probabile ipotizzare un segnale falso positivo dovuto a materiali di partenza non specifici. Una PCR affidabile non dovrebbe quindi richiedere più di 30-35 cicli per generare un chiaro segnale "positivo"; nel caso di infezioni attive con virus ricercati, si può ipotizzare un numero sufficiente di 25-30 cicli (si veda anche il punto 3.2.).

1.3. Reazione di trascrittasi inversa (RT)

La **reazione di trascrittasi inversa (RT)** è necessaria se l'acido nucleico di partenza da amplificare non è presente come DNA ma come acido ribonucleico (RNA), come nel caso del SARS-CoV-2 che è un virus a RNA. Poiché solo il DNA può essere amplificato nella PCR, l'RNA deve essere prima convertito in DNA. Ciò avviene con l'aiuto dell'enzima "Trascrittasi inversa", che crea dall'RNA un filamento di DNA complementare, che serve poi come materiale di partenza per la PCR.

Per valutare l'affidabilità di un risultato ottenuto mediante RT-qPCR o anche PCR, la sensibilità e la specificità del sistema di analisi utilizzato vengono valutate con l'ausilio di campioni definiti di geni target corretti diluiti (ad esempio, l'RNA del virus ricercato) e di geni target molto simili ma non ricercati (ad esempio, virus strettamente correlati).

1.4. Sensibilità e specificità

Nel caso della PCR (in tutte le sue varianti), la sensibilità indica la capacità del test di rilevare anche quantità minime del gene target ricercato, mentre la **specificità** descrive l'affidabilità con cui il test esclude la possibilità che anche altri geni strettamente correlati diano un risultato positivo (**falso positivo**). Maggiore è la specificità, maggiore è la certezza che il sistema PCR stesso non produca risultati falsi positivi.

Tuttavia, ciò non esclude gli **eventi falsi positivi**, che possono essere causati dalla **contaminazione del laboratorio** con i geni target, dalla contaminazione **delle sostanze chimiche del test** e dalla **contaminazione diretta durante la raccolta del campione**. Questi risultati falsi positivi legati alla contaminazione possono essere esclusi o almeno ridotti al minimo grazie a una rigorosa garanzia di qualità e a "procedure operative standard" (SOP), all'uso di personale appositamente formato e a un controllo esterno permanente sotto forma di test interlaboratorio.

1.5. Infezione

Un'infezione è definita come una situazione in cui si verificano almeno i tre aspetti seguenti:

- Penetrazione di microrganismi (germi) come batteri o virus nell'organismo
- Questi microrganismi invasivi si moltiplicano nell'organismo
- E il corpo reagisce ad essi (sintomi)

Secondo il CDC, i sintomi dell'infezione da virus SARS-CoV-2 comprendono (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>)

- Febbre o brividi
- Tosse
- Respiro corto o difficoltà respiratorie
- Stanchezza
- Dolori muscolari o del corpo
- Mal di testa
- Nuova perdita del gusto o dell'olfatto
- Mal di gola
- Naso chiuso o che cola
- Nausea e/o vomito
- Diarrea

Per ulteriori descrizioni delle fonti per la definizione generalmente applicabile del termine "infezione", vedere **ALLEGATO 1**.

1.6. Paziente

Un paziente è, per definizione, una persona sottoposta alle cure di un operatore sanitario professionale che presenta sintomi di malattia o lesione o che mostra altre limitazioni alla piena salute.

Pertanto, secondo la definizione, una persona sana "senza sintomi" e senza problemi medici non può essere definita "paziente". Per ulteriori descrizioni delle fonti di questa definizione generalmente valida del termine "paziente", si veda l'**ALLEGATO 1**.

2. Informazioni di base sul significato diagnostico in relazione alla questione della "contagiosità".

L'inventore del test PCR, il premio Nobel Kary Mullis, deceduto nell'agosto 2019, ha più volte sottolineato che il suo test è adatto solo a rendere visibile, tramite amplificazione, una molecola (acido desossiribonucleico, DNA) o un frammento di DNA, altrimenti invisibile all'occhio umano. Ma non è adatto a stabilire se ciò che è stato reso visibile è pericoloso o causa di malattie.

In particolare, un test PCR - anche se eseguito correttamente - non può fornire alcuna informazione sul fatto che una persona sia infetta o meno da un patogeno attivo. Questo perché il test non è in grado di distinguere tra materia "morta"*, come un frammento di genoma completamente innocuo, residuo della lotta del sistema immunitario dell'organismo contro un raffreddore o un'influenza (tali frammenti di genoma possono essere trovati anche molti mesi dopo che il sistema immunitario ha "affrontato" il problema), e materia "viva", cioè un virus "fresco" e riproducibile.

* La PCR viene utilizzata anche in ambito forense, ad esempio per amplificare il DNA residuo da resti di capelli o da altri materiali in traccia, in modo tale da poter identificare l'origine genetica dell'autore o degli autori del reato ("impronta genetica").

2.1. Dichiarazioni ufficiali di importanti istituzioni/esperti sull'inutilità della PCR come unico test diagnostico per il rilevamento dell'infettività o del rischio di infezione.

A) La scheda informativa del Laboratorio di Spiez dell'Ufficio federale della protezione civile UFPP elenca esplicitamente gli svantaggi della PCR come segue: *"È possibile rilevare solo gli agenti patogeni di cui si conosce la sequenza genica. Il fatto che un agente patogeno sia infettivo (virulento, "vivo") o meno rimane sconosciuto.*

Il sito originale è nel frattempo non di più reperibile, ma nel archivio web (https://web.archive.org/web/20210706132230/https://www.labor-spiez.ch//pdf/en/dok/pos/88_021_Plate_PCR_e.pdf).

Il documento è riportato nell'**ALLEGATO 2**.

B) Una dichiarazione cruciale sull'idoneità del test PCR come parametro per il rischio di trasmissione delle malattie infettive è stata fatta da Antony Fauci, principale "esperto di malattie e consulente governativo" negli Stati Uniti, in una trasmissione della MSNBC del 30 dicembre 2021 (il Rachel Maddow Show) (Washington DC 9:04 PM; <https://www.youtube.com/watch?v=bAICMQ1D5F8>; Dal minuto 6:35)

Domanda del giornalista:

"... un test PCR non è nemmeno un buon parametro per la trasmissibilità e l'isolamento? Come si fa a capire se si è infettivi nel ciclo in cui si ha la covid? Come si può misurare, se non con un test PCR o un test dell'antigene? "

Dott. Fauci

"Sì, questa è un'ottima domanda, **perché la PCR non misura il virus replicabile**, ma le particelle del virus, l'acido nucleico. In altre parole: **Potrei** essere infettato, avere il virus compatibile con la replicazione eliminato, ma **essere ancora positivo alla PCR per diversi giorni dopo la guarigione e non essere affatto trasmissibile**. Quindi la PCR è buona per determinare se si è infetti - se sono infetto, sì, sono infetto, ma il fatto che sia positiva - il direttore del CDC ha detto che diversi giorni e persino settimane dopo **non dà alcuna indicazione sulla trasmissibilità o meno**. E credo che questa sia la comprensibile confusione che le persone hanno sui test. I test dicono se si è infetti o meno, non se si è infetti e trasmissibili. **L'unico modo per stabilire se un'infezione è trasmissibile è dimostrare che il virus vive e si moltiplica all'interno dell'organismo, e il test non lo misura.** (7:38) Misura la presenza o l'assenza del virus, che può essere un virus morto, inattivo e non trasmissibile".

Nell'originale:

Domanda del giornalista:

"Il test PCR non è un buon parametro né per la trasmissibilità né per l'isolamento? Come si fa a capire se si è contagiosi durante il ciclo di covidosi? Come si fa a misurarlo se non con un test PCR o un test dell'antigene? "

Dott. Fauci

"Sì, questa è un'ottima domanda **perché la PCR non misura la replicazione del virus competente**, ma le particelle virali, l'acido nucleico. In altre parole, potrei essere infetto, aver eliminato il virus competente per la replicazione, ma **continuare a essere positivo alla PCR per diversi giorni dopo la guarigione e non essere affatto trasmissibile**. Quindi la PCR è buona per dire se si è infetti - se sono infetto sì, sono infetto - ma il fatto stesso che sia positiva - il direttore del CDC ha detto che **per diversi giorni e anche settimane dopo non dà alcuna indicazione sulla trasmissibilità o meno**.

E credo che questa sia la comprensibile confusione che le persone hanno sui test. I test dicono se si è infetti o meno e se si è infetti e trasmissibili.

L'unico modo per capire se è trasmissibile è dimostrare che c'è davvero un virus in grado di replicarsi e i test non misurano questo (7:38) Misurano la presenza o l'assenza del virus e il virus può essere un virus morto e inattivo che non si trasmette".

C) Marion Koopmanns, direttrice del Dipartimento di Scienze Virali dell'Università Erasmus e consulente esperta dell'OMS, quindi una delle virologhe centrali della questione corona e allo stesso tempo co-autrice della pubblicazione RT-qPCR di Corman/Drosten in Eurosurveillance, conferma anche in un'intervista a NPO Radio 1 (26.11.2020 nell'ambito del suo podcast "[Virusfeiten](https://www.nporadio1.nl/podcasts/virusfeiten/46542/4-blijvend-moe-na-corona-misschien-helpt-een-aspirientje)" <https://www.nporadio1.nl/podcasts/virusfeiten/46542/4-blijvend-moe-na-corona-misschien-helpt-een-aspirientje>) **che la PCR non è adatta per conoscere lo strato infettività a infettività.** (minuto 0:09 in <https://www.youtube.com/watch?v=flsF7trvq2c>)

Esplicito il passaggio decisivo dell'intervista con Marion Koopmanns (MK):

"MK: ... ci sono alcune storie che circolano dicendo che il test PCR non è buono.

Intervistatore: Almeno non dimostra necessariamente di essere contagioso.

*MK: Sì, esattamente. E anche questo è vero. Perché la PCR mostra la presenza dell'RNA virale. Questo è letteralmente ciò che fa la PCR. E se quell'RNA si trova in una particella virale ancora intatta e infettiva. O se si tratta solo di resti di RNA che possono essere rilevati molto tempo dopo un'infezione. Non è possibile distinguere tra i due. Potete farvi un'idea cercando "Quanto c'è?". Ma la differenza non si nota molto bene. Cioè: questo test è ottimo per dire "l'avete avuta", **ma è meno adatto per dire "a questo punto siete ancora contagiosi"**.*

Intervistatore: Sta parlando del test PCR, vero? MK: Sì.

Nell'originale:

"MK: ...er circuleren wat verhalen waarin gezegd wordt, nou ja, de PCR test ist niet goed".

Intervistatore: Althans die toont niet persee aan dat je besmettelijk bent.

MK: Sì, moltissimo. E dat klopt ook. Si vuole che la PCR dia il via alla ricerca dell'RNA del virus. Questo è ciò che fa il PCR. E se l'RNA in un virus è intatto, è anche un virus che non si può modificare. Se si desidera che la zona di riposo sia di nuova generazione, e che non ci sia un periodo di tempo sufficiente per evitare che qualcuno si infetti, si deve tenere conto del fatto che l'onderscheid non è un problema. È possibile chiedere a un bambino di fare una domanda: "Che cos'è?". Ma dat verschil is niet goed te maken. Ciò significa che il test è prima di tutto "je hebt het gehad", ma anche che il test è meno efficace per dire "op dit moment ben je nog besmettelijk".

Intervistatore: Il test della PCR è stato fatto, eh?

MK: sì"

D) Il Ministero della Salute svedese dichiara sul suo sito web ufficiale

[\(https://www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/publikationsarkiv/v/vagledning-om-kriterier-for-bedomning-av-smittfrihet-vid-covid-19/\)](https://www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/publikationsarkiv/v/vagledning-om-kriterier-for-bedomning-av-smittfrihet-vid-covid-19/): "La tecnologia PCR utilizzata nei test

utilizzati per rilevare i virus non sono in grado di distinguere tra i virus che sono in grado di infettare le cellule e quelli che sono stati resi innocui dal sistema immunitario, e quindi questi test non possono essere utilizzati per determinare se una persona è infettiva o meno. L'RNA dei virus può spesso essere rilevato settimane (a volte mesi) dopo l'infezione, ma non significa che una persona sia ancora infettiva".

Nell'originale

"La PCR-tekniken che viene anvata nel test per valutare il virus può essere in grado di individuare il virus con la possibilità di infettare le cellule o il virus con l'immunodepressione e può essere in grado di analizzare il test per verificare se un individuo sia o meno smittsam o meno. L'RNA di un virus può essere utilizzato per la produzione di vettori (ibland mñader) dopo l'insjuknandet, ma non è necessario che l'uomo lo fortifichi." Questa valutazione è stata confermata il 19.04.2021.

E) Già nel maggio 2020, il National Centre for Infectious Disease di Singapore ha pubblicato un documento di posizione in cui, al punto 5, si afferma che è importante sottolineare che il rilevamento dell'RNA virale mediante PCR non è associato all'infettività. o praticabile virus virus vitale
(<https://www.ncid.sg/Documents/Period%20of%20Infectivity%20Position%20Statement2.pdf>).

Nell'originale:

"... è importante notare che il rilevamento dell'RNA virale mediante PCR non equivale a infettività o virus vitale".

F) In una pubblicazione su Nature che descrive l'analisi dei primi casi di Covid 19 in Germania (<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>), gli autori (tra cui R. Wölfel, C. Drosten e V. Corman) hanno identificato i casi positivi al SARS-CoV-2 mediante TIB-Molbiol/Roche-PCR per la rilevazione del gene E- e RdRp e hanno confrontato i risultati della PRC con il gold standard: l'isolamento del virus in coltura cellulare".

Per quanto riguarda la PCR, gli autori stabiliscono il proprio sistema di rilevamento sulla base della RT-PCR:

"Per dimostrare la presenza di una replicazione virale attiva in assenza di istopatologia, abbiamo eseguito saggi di RT-PCR per identificare l'RNA subgenomico virale direttamente nei campioni clinici. (...) L'mRNA virale subgenomico viene trascritto solo nelle cellule infette e non viene impacchettato nei virioni; pertanto, indica la presenza di cellule attivamente infette nei campioni".

Nell'originale:

"Per ottenere la prova della replicazione attiva del virus in assenza di istopatologia, abbiamo condotto test RT-PCR per identificare gli RNA subgenomici virali direttamente nei campioni clinici. (...) L'mRNA virale subgenomico è trascritto solo nelle cellule infette e non è impacchettato in virioni, e quindi indica la presenza di cellule attivamente infette nei campioni".

Ciò significa che era noto e pubblicato molto presto che **le normali RT-qPCR che rilevano l'RNA genomico del SARS-CoV-2 non consentono di decidere se un virus in attiva replicazione sia eventualmente presente nel campione**. A questo punto, al più tardi, tutte le raccomandazioni dell'OMS in materia di PCR dovrebbero essere modificate per la rilevazione dell'RNA subgenomico, che sarebbe significativamente migliore rispetto alla rilevazione genomica, ma indica comunque solo la probabilità di replicazione del virus a livello di RNA e non è una prova definitiva di un virus infettivo.

G) In un articolo di revisione pubblicato il 02.12.2022 su Nature Reviews Microbiology (<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>), viene esplicitamente sottolineato in più punti che la RT-PCR non è adatta né per rilevare i virus infettivi né per diagnosticare in modo affidabile le persone infette (contagiose). L'aspetto notevole di questa pubblicazione è che, con Isabella Eckerle come autrice principale, si tratta della responsabilità di una stretta collaboratrice di Christian Drosten.

Citazioni in dettaglio:

Introduzione, primo paragrafo:

"La rilevazione dell'RNA virale nei campioni respiratori mediante RT-PCR, pur essendo altamente sensibile e specifica, non distingue tra virus replicabile e RNA residuo".
"Questo perché l'RNA virale (che verrebbe rilevato con la RT-PCR) rimane rilevabile in assenza di virus infettivo, mentre la positività degli Ag-RDT si correla meglio con la presenza di virus infettivo."

Nell'originale:

"Sebbene la rilevazione dell'RNA virale nei campioni respiratori mediante RT-PCR sia altamente sensibile e specifica, non distingue tra virus compatibile con la replicazione e RNA residuo". "Questo perché l'RNA virale (che verrebbe rilevato dalla RT-PCR) rimane rilevabile in assenza di virus infettivo, mentre la positività degli Ag-RDT si correla meglio con la presenza del virus infettivo".

Sotto il titolo: "Rilevamento della carica virale di RNA".

"Sebbene la RT-PCR non possa determinare direttamente l'infettività perché non è in grado di distinguere tra il virus replicabile (infettivo) e l'RNA virale residuo (non infettivo), si è cercata una correlazione tra la carica virale di RNA e la presenza di virus infettivo. "

Nell'originale:

"Sebbene la RT-PCR non sia in grado di determinare direttamente l'infettività a causa della sua incapacità di differenziare tra il virus compatibile con la replicazione (infettivo) e l'RNA virale residuo (non infettivo), è stata cercata una correlazione tra la carica virale di RNA e la presenza di virus infettivo."

Sotto il titolo: "Diagnostica della SARS-CoV-2 nella sanità pubblica":

"Purtroppo, attualmente non esiste un test diagnostico point-of-care per determinare l'infettività del SARS-CoV-2 in un campione di paziente, e la coltura virale descritta sopra non è adatta a scopi diagnostici". Pertanto, sono stati proposti diversi approcci per trovare un valore approssimativo dell'infettività che detti i periodi di isolamento".

Nell'originale:

"Purtroppo, attualmente non esiste un test diagnostico point-of-care per determinare la presenza di SARS-CoV-2 infettivo in un campione di paziente, e la coltura del virus descritta in precedenza non è adatta a scopi diagnostici". Per questo motivo, sono stati suggeriti diversi approcci per trovare una proxy della contagiosità per guidare i periodi di isolamento".

Nota: si noti che questa dichiarazione risale al dicembre 2022, quasi 3 anni dopo l'introduzione della RT-qPCR per il test diretto (point of care) di individui presumibilmente infettivi nei centri di analisi e come base di incidenze, valori R e misure risultanti!!!! Questa affermazione viene addirittura ribadita in modo esplicito nella conclusione di questa recensione:

Nella sezione Conclusioni:

"Sebbene siano stati fatti molti progressi nel campo della diagnostica durante la pandemia, non esistono ancora test diagnostici che rilevino in modo affidabile la presenza di un virus infettivo".

Nell'originale:

"Sebbene durante la pandemia siano stati fatti molti progressi nel campo della diagnostica, ad oggi non esistono test diagnostici che determinino in modo affidabile la presenza del virus infettivo".

2.2. La preparazione del campione esclude la rilevazione di virus in grado di replicarsi.

Un altro aspetto importante per valutare se un test RT-qPCR si riferisce a un'affermazione sull'infettività di una persona che è risultata positiva al test, cioè la misura in cui il risultato positivo della RT-qPCR indica la presenza di virus replicabili, è la preparazione del campione per la RT-qPCR.

L'RNA del gene ricercato (in questo caso: genoma del virus SARS-CoV-2) deve essere isolato dal materiale dello striscio per poter essere utilizzato per la rilevazione del gene nella RT-qPCR. Un passo decisivo è la denaturazione completa di tutto il materiale biologico e la separazione dei componenti principali, proteine, lipidi e acidi nucleici, per avere finalmente a disposizione l'RNA come base di partenza per la RT-qPCR. Il protocollo originale di Chomzynski e Sacci del 1987 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2440339/>),

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406285/>) è ancora un componente di quasi tutti i protocolli per la purificazione di materiale biologico per l'isolamento dell'RNA, sia prodotto in laboratorio che in "kit di estrazione" acquistati. I componenti della soluzione di estrazione originale sono il fenolo/cloroformio e l'alcol isoamilico; in varie soluzioni commerciali modificate sono presenti anche sostanze dall'azione simile ma meno tossiche. Tutti hanno in comune il fatto di distruggere completamente qualsiasi struttura biologica vivente o riproducibile.

Ciò significa che **nel processo di laboratorio di preparazione di un campione di striscio, obbligatorio a monte della RT-qPCR, qualsiasi materiale biologico, sia esso una cellula vitale, un virus replicabile o anche solo detriti cellulari e residui genici, viene denaturato in modo tale che non è più possibile dire se il materiale proviene da un organismo intatto o addirittura replicabile o da campioni già danneggiati o distrutti.** A causa di questo processo di estrazione e preparazione, non è possibile in nessun caso concludere da una RT-qPCR positiva, che rileva frammenti di genoma, che nel campione di striscio siano presenti virus in grado di replicarsi; solo l'RNA isolato può essere rilevato, indipendentemente dalla fonte.

2.3. Conclusione provvisoria:

Quindi, anche se tutto è stato fatto nella PCR, comprese tutte le fasi preparatorie (progettazione e creazione della PCR, raccolta del campione, preparazione ed esecuzione della PCR), la PCR verrà comunque eseguita.

è fatto "correttamente" e il test è positivo, cioè rileva una sequenza genomica che può esistere anche in uno o addirittura nello specifico virus "corona" (SARS-CoV-2), **questa tecnica non può in nessun caso provare che la persona che è risultata positiva al test possa essere infettata da un SARS-CoV-2 replicante e quindi essere infettiva = pericolosa per altre persone.**

Una migliore plausibilità di un risultato positivo della PCR rispetto a un'infezione virale e, soprattutto, a un virus che si replica nel tessuto sarebbe stata la rilevazione dell'RNA subgenomico già descritto nella pubblicazione citata al punto 2.1.F. Questo non è una prova di un'infezione virale attiva. **Poiché questo sgRNA si verifica solo durante la formazione di nuovi virus in una cellula infetta, può essere utilizzato almeno come indicazione (indicatore) se non come prova di un'infezione virale attiva.** La pubblicazione elencata al punto 2.1.G fornisce ottime informazioni a questo proposito al punto "Diagnostica della SARS-CoV-2 nella sanità pubblica":

"Un esempio è il rilevamento dei trascritti sgRNA, che vengono prodotti durante la replicazione del virus e in particolare durante la sintesi di RNA a filamento negativo. Sebbene gli sgRNA siano trascritti nelle cellule infette, non sono impacchettati nei virioni e possono quindi servire come indicatore di replicazione attiva e quindi di virus infettivi. Sono stati sviluppati saggi RT-PCR specifici per rilevare gli sgRNA in aggiunta al rilevamento diagnostico

di

genomico del SARS-CoV-2 RNA, ma questi test non sono stati ampiamente accettati per l'uso diagnostico di routine a causa della loro minore sensibilità rispetto ai test RT-PCR convenzionali.

[....]

Pertanto, sebbene l'assenza di sgRNA indichi una mancanza di replicazione virale, la presenza di sgRNA non è necessariamente indicativa di infettività".

Nell'originale:

"Un esempio è il rilevamento dei trascritti sgRNA, che vengono generati durante la replicazione del virus e, in particolare, la sintesi di RNA a filamento negativo. Sebbene gli sgRNA siano trascritti nelle cellule infette, non sono impacchettati nei virioni e possono quindi servire come indicatore di replicazione attiva e quindi di virus infettivo. Sono stati sviluppati specifici saggi RT-PCR per rilevare gli sgRNA in aggiunta al rilevamento diagnostico dell'RNA genomico del SARS-CoV-2, ma tali saggi non sono entrati nell'uso diagnostico di routine a causa della loro minore sensibilità rispetto ai saggi RT-PCR convenzionali.

[...]

Pertanto, sebbene l'assenza di sgRNA indichi l'assenza di replicazione virale, la presenza di sgRNA non indica necessariamente l'infettività".

In generale, per individuare un'infezione attiva e valutare se una persona "produce" ed emette virus infettivi, oltre alla valutazione dei sintomi clinici (gold standard) è necessario utilizzare ulteriori metodi diagnostici concreti, come l'isolamento di virus interrogabili. La seguente affermazione corretta si trova sotto il titolo "Detection of infectious virus" nella pubblicazione elencata al punto 2.1.G:

"Il gold standard per l'individuazione di virus infettivi (cioè replicabili) in campioni respiratori è il recupero dei virus in colture cellulari, una procedura comunemente chiamata isolamento del virus".

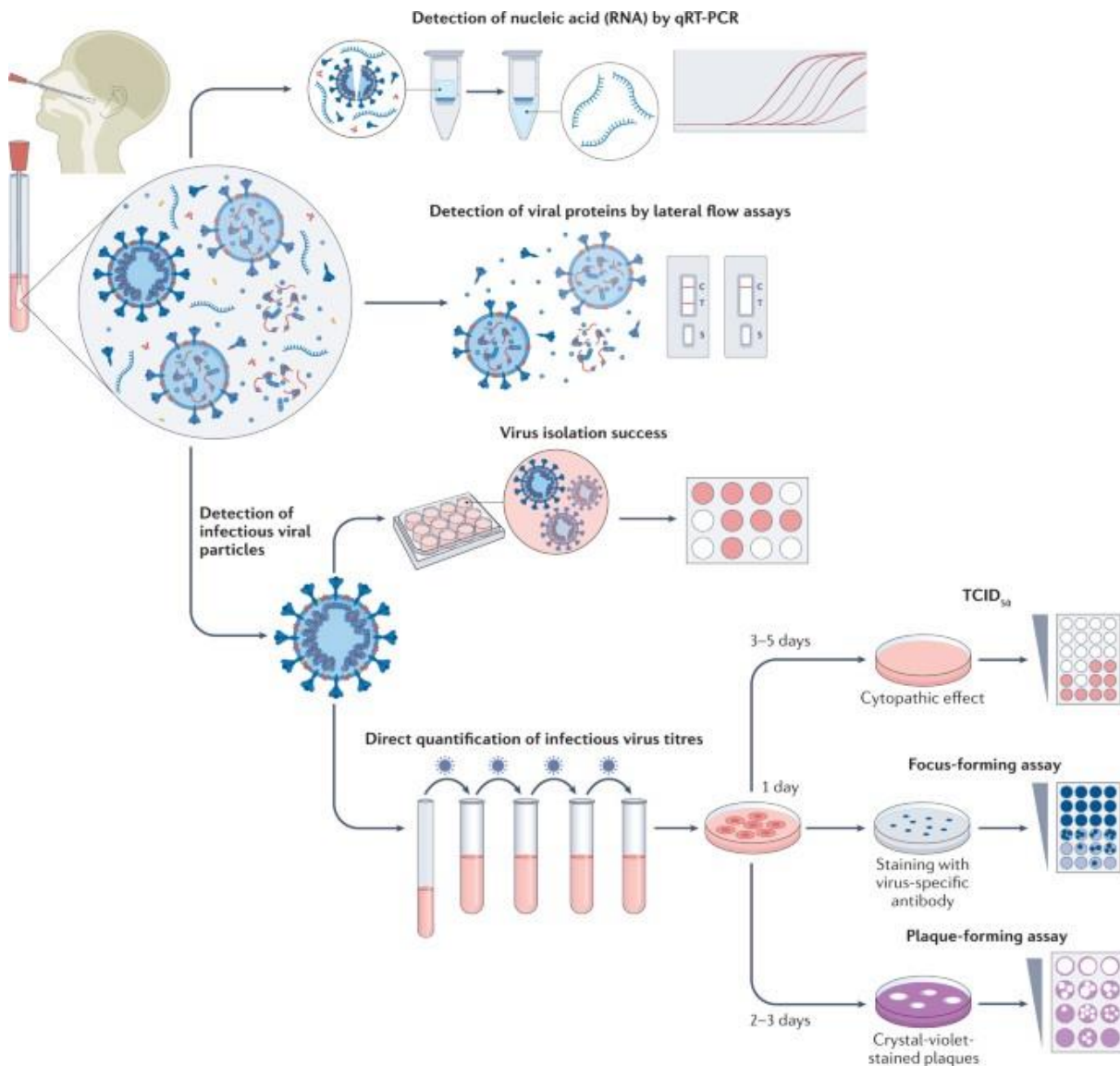
Nell'originale:

"Il gold standard per determinare la presenza di virus infettivi (cioè competenti per la replicazione) nei campioni respiratori è il recupero del virus in coltura cellulare, una procedura che viene comunemente definita isolamento del virus".

2.4. Figura

Per una migliore visione d'insieme, la Figura 1 è tratta da questo lavoro (<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>), in cui sono mostrati visivamente i vari metodi di rilevamento. Il rilevamento dell'acido nucleico virale (RNA) mediante RT-qPCR (qui chiamato qRT-PCR), il rilevamento dei componenti proteici virali mediante un test rapido dell'antigene e il rilevamento dei componenti proteici virali mediante un test rapido

(flusso laterale dosaggio) e il rilevamento infettivo virus per mezzo di metodi di isolamento in coltura cellulare.



Legenda della figura:

I campioni di tampone prelevati dalla rinofaringe o dall'orofaringe sono utilizzati per rilevare la carica virale del SARS-CoV-2. La rilevazione degli acidi nucleici virali (RNA) avviene mediante PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR). L'RNA virale viene estratto dal virus lisato, trascritto inversamente e amplificato mediante qPCR utilizzando primer specifici per una o più regioni target del genoma virale. Il ciclo di amplificazione in cui i campioni superano la soglia (soglia di ciclo) determina la quantità di RNA virale. La carica virale di RNA può essere espressa come numero di copie di RNA virale per millilitro o dalla soglia di ciclo arbitraria specifica del test. I saggi a flusso laterale rilevano la presenza di specifiche proteine virali nelle particelle virali lisate. Il nucleocapside del SARS-CoV-2 è utilizzato nella maggior parte dei test diagnostici rapidi (antigen-detecting). **La presenza di virus infettivi (replicabili) nei campioni respiratori può essere rilevata solo recuperando il virus in coltura cellulare mediante isolamento o quantificando i titoli virali infettivi utilizzando la dose infettiva del 50% in coltura tissutale (TCID₅₀), i saggi di formazione di focolai o i saggi di formazione di placche.** L'isolamento del virus viene effettuato applicando il terreno infettivo al monostrato di cellule; il successo dell'isolamento è determinato dalla comparsa di un effetto citopatico circa 3-5 giorni dopo l'infezione. Il colore bianco indica la presenza di un effetto citopatico nelle cellule. Le diluizioni seriali dei campioni respiratori vengono eseguite per quantificare il titolo virale infettivo e utilizzate per inoculare sul monostrato di cellule. In TCID₅₀, 3-5 giorni dopo l'infezione, l'effetto citopatico indotto dal virus è classicamente determinato dalla microscopia. Nei saggi focali, le cellule vengono fissate 1 giorno dopo l'infezione e l'immunocolorazione viene eseguita con

anticorpi specifici per il virus per individuare gruppi di cellule infette (focolai). I focolai che indicano la presenza di virus infettivi sono indicati in blu. Nella formazione delle placche, le piastre vengono fissate 2-3 giorni dopo l'infezione e colorate con cristalvioletto; i pozzetti con le singole placche vengono utilizzati per determinare il titolo del virus. Le placche che indicano la presenza del virus infettivo sono indicate in bianco.

3. Fattori che influenzano l'affidabilità del test PCR

In realtà, però, i risultati di un test PCR dipendono da una serie di parametri che, da un lato, causano notevoli incertezze e, dall'altro, possono essere influenzati in modo tale da ottenere molti o pochi risultati (apparentemente) positivi.

3.1. Progettazione e specificità della PCR

Una PCR può essere progettata molto comodamente con l'aiuto di banche dati (ad esempio Genbank, GISAID) e di software consolidati (i cosiddetti programmi di ricerca dei primer). L'obiettivo (cosa deve essere rilevato e con quale precisione) determina i requisiti della regione target utilizzata e l'accuratezza dei primer.

Se si vuole effettuare una ricerca approssimativa dei rappresentanti di un grande gruppo di virus simili (ad esempio, tutti i coronavirus), i primer vengono posizionati nelle cosiddette regioni conservate specifiche del gruppo. È come dire al software di riconoscere in modo affidabile tutte le auto rosse in un parcheggio (ma non i camion, le moto o altri colori). Questo può essere utilizzato per cercare in un campione tracce di geni di un rappresentante del gruppo di virus ricercato (ad esempio, coronavirus).

Se si vuole trovare solo un sottogruppo (ad esempio, i sarbecovirus all'interno dei coronavirus), corrispondente a una marca di auto all'interno del gruppo di tutte le auto rosse (nell'esempio), i primer possono essere progettati in modo specifico per il sottogruppo.

Questo è stato utilizzato nel caso della PCR raccomandata dall'OMS di Charité per il cosiddetto "gene E", ma anche per la RdRp di Corman/Drosten per il gruppo dei virus Sarbeco, a cui appartiene il SARS-coV-2. Tuttavia, è anche possibile (non sempre, ma spesso) progettare una PCR altamente specifica che rilevi e amplifichi SOLO il gene specificamente ricercato (in questo caso, il gene virale del SARS-coV-2). Analogamente a questo sarebbe il rilevamento di un modello specifico all'interno del gruppo di auto rosse di un marchio nell'esempio. A tal fine, il progetto deve prevedere che la regione utilizzata non presenti omologie con virus strettamente correlati (ad esempio, SARS1 o virus dei pipistrelli con SARS-CoV-2) o con altre firme geniche già note (genoma umano, altri organismi).

I programmi di ricerca possono renderlo possibile in modo molto affidabile. Nel caso della qPCR, viene aggiunto un terzo pezzo del gene, che può reagire in modo specifico solo con la regione del gene che si sta cercando, questo è il "campione".

A questo proposito: un buon progetto di PCR comprende due primer/sonde altamente specifiche per la PCR normale e tre primer/sonde altamente specifiche per la qPCR che riconoscono solo la sequenza target desiderata e possono quindi rilevare solo il gene target desiderato in modo altamente specifico.

Una PCR così specifica sarebbe stata possibile anche per il SARS-CoV-2, ma è stata omessa dai protocolli originali e autorevoli dell'OMS.

Dopo la progettazione, è **obbligatorio verificare la coppia di primer e la sonda su campioni reali in laboratorio**. A tal fine, è necessario disporre di campioni sicuri con il materiale genetico da identificare (qui: Sono necessari campioni di persone infettate in modo affidabile con il SARS-CoV-2 o anche un isolato virale completamente caratterizzato), nonché un ampio spettro di virus e altri agenti patogeni che possono in linea di principio scatenare sintomi simili nei pazienti e che non devono dare alcun segnale con la PCR utilizzata.

Se tutte queste condizioni sono soddisfatte: Se la PCR trova esattamente il gene target a cui mirava il progettista, sia che si tratti di un gruppo che di un singolo agente patogeno, e se questo viene dimostrato sperimentalmente e senza ombra di dubbio con controlli positivi e negativi completi in laboratorio, il progetto può essere utilizzato in modo affidabile come protocollo specifico a supporto di una diagnosi clinica.

3.2. Numero di geni bersaglio indipendenti ("target")

Il protocollo "*Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time PCR*"

(<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf>), pubblicato originariamente dall'OMS il 13.01.2020, descrive la sequenza dei rilevamenti PCR di tre geni parziali indipendenti del virus poi rinominato SARS-CoV-2. La sequenza si riferiva al gene E, al gene RdRp e quindi al gene N. Già il 17.01.2020, un cambiamento seguito dall'OMS con il protocollo "*Diagnostica*

rilevamento del 2019-nCoVda reale tempo PCR" (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2) in cui il gene N è stato rimosso come rilevamento e quindi sono stati raccomandati solo 2 segmenti genici invece delle 3 regioni target originali. Il 02.03.2020, un nuovo protocollo di test aggiornato dell'OMS "*Test di laboratorio per i coronavirus*

malattia 2019 (COVID-19) in sospettato umano casi" (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331329/WHO-COVID-19-laboratory-2020.4-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>) ha sottolineato che "... Nelle aree in cui il virus COVID-19 è diffuso, si potrebbe applicare un algoritmo più semplice, in cui, ad esempio, lo screening mediante RT-PCR di **un singolo target discriminante** è considerato sufficiente....

Nell'originale: ". Nelle aree in cui il virus COVID-19 è ampiamente diffuso si potrebbe adottare un algoritmo più semplice in cui, ad esempio, lo screening mediante RT-

PCR di un singolo target discriminatorio sia considerato sufficiente....." (pag. 3 in basso), in base al quale i laboratori

sono passati all'analisi di un solo gene target **e si sono specializzati solo nel gene E specifico del gruppo come PCR valida**, come descritto esplicitamente dal laboratorio di Augsburg il 3 aprile (disponibile solo nell'archivio Internet: <https://www.oder-spree-piraten.de/wp-content/uploads/2020/05/Ge%C3%A4ndertes-Befundlayout-der-SARS-CoV2-PCR-Ergebnisse-Labor-Augsburg-MVZ-GmbH.pdf>).

La straordinaria importanza del numero di geni target indipendenti analizzati mediante PCR in test individuali non specifici, come nel protocollo Charité preferibilmente raccomandato dall'OMS (e applicato molto rapidamente in tutto il mondo tramite TIB molBiol/Roche), risulta dal seguente calcolo esemplare:

Le tre regioni target E, RdRp e N originariamente specificate nel protocollo dell'OMS per la rilevazione del SARS-CoV-2 sono state rapidamente utilizzate in molti laboratori e sistemi di analisi commerciali. Un primo test round robin dell'Institut Instant e.V. (<https://corona-ausschuss.de/wp-content/uploads/2020/07/Instand-Ringversuch-Virusgenom-Nachweis-SARS-CoV-2.pdf>) ha dato come risultato una specificità media per questi geni di:

Gene bersaglio della SARS CoV-2 Genomi	Numero di kit di analisi controllati	Specificità solo coltura cellulare (senza RNA del virus)	Specificità con i coronavirus correlati (HCoV 229E)	%	Specificità media assoluta	Tasso di errore medio (1-abs. Spec.)
E-Gen	24	99,46%	95,17%	97,31	0,9731	0,0269
Gene RdRp	13	97,80%	90,66 %	94,23	0,9423	0,0577
Gene N	21	98,20%	87,95 %	93,08	0,9308	0,0692

In una popolazione mista di 100.000 test, anche nessuna persona realmente infetta risulterebbe a causa del tasso di errore medio:

Per un test del solo gene E: $100.000 \times 0,0269 = 2690$ falsi positivi Per il
 test E e RdRp in sequenza: $100.000 \times (0,0269 \times 0,0577) = 155$ falsi positivi Per
 tutti e tre i geni (E, RdRp, N): $100.000 \times (0,0269 \times 0,0577 \times 0,0692) = 10$ falsi positivi

Ciò significa che l'obbligo imposto dall'OMS nel marzo 2020, cioè prima della dichiarazione ufficiale di pandemia, di ridurre successivamente il numero di geni bersaglio da testare, mantenendo al contempo i requisiti originali della PCR ("protocollo Corman/Drosten") della SARS-CoV-2 da 3 a 1, ha comportato un aumento del numero di persone testate falsamente positive nell'esempio di calcolo sopra riportato da 10 con 3 geni a quasi 3.000 con il solo gene E per 100.000 test effettuati.

Se i 100.000 test effettuati fossero rappresentativi di 100.000 cittadini di una città/contea nell'arco di 7 giorni, la sola questione dei geni bersaglio utilizzati comporterebbe una differenza di 10 rispetto a 155 rispetto a 2690 per quanto riguarda l'"incidenza di 7 giorni" e, in base a questa, la gravità delle restrizioni alla libertà dei cittadini adottate.

Valutazione intermedia: l'esempio di calcolo mostra come il numero di casi giornalieri possa essere influenzato dal "rispetto delle regole" per quanto riguarda i geni target da rilevare per i laboratori. In considerazione dell'enorme impatto sulle decisioni politiche, che sono determinate dal numero assoluto di test positivi e dalla "incidenza di 7 giorni" che ne deriva, le specifiche dell'OMS (e anche dell'RKI) per la riduzione dei geni bersaglio erano chiaramente adatte a gonfiare artificialmente la "pandemia" di un fattore fino a 300 attraverso specifiche errate dei test.

Si tratta di un approccio privo di prove, che da un lato comporta enormi restrizioni personali di quarantena/isolamento, che le persone falsamente "testate positivamente" devono subire, e dall'altro accetta di buon grado le enormi restrizioni e danni sociali ed economici attraverso il "dato di incidenza di 7 giorni" e, in ultima analisi, costituisce anche la base per la "necessità di vaccinazione".

Se per l'analisi PCR fosse stato utilizzato il numero corretto di tre o meglio ancora (come originariamente utilizzato in Tailandia, ad esempio) fino a 6 geni, il tasso di test positivi e quindi l'"incidenza di 7 giorni" sarebbe stato ridotto quasi completamente a zero.

3.3. Numero di cicli eseguiti (valore CT) in qPCR

"Gli individui infetti hanno di solito una carica virale di RNA $>10^6$ copie di genoma per millilitro, che corrisponde a un valore Ct di 25 nella maggior parte dei test RT-PCR".

Questa definizione di un valore significativo di CT è esplicita nel documento di revisione già citato al punto 2.1.G, pubblicato il 02.12.2022 su Nature Reviews Microbiology (<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>), nel capitolo "SARS-CoV-2 Diagnostics in public health" e riassume quindi in modo significativo gli aspetti presentati di seguito.

Nell'originale:

"Gli individui infetti hanno tipicamente cariche virali di RNA $>10^6$ copie di genoma per millilitro, che corrispondono ampiamente a un Ct di 25 nella maggior parte dei saggi RT-PCR".

3.3.1 Significato del valore CT

Oltre al numero di geni target rilevati, soprattutto nel caso di uno solo o al massimo due geni, il numero di cicli di amplificazione nella qPCR fino al punteggio "positivo" e il valore CT risultante rappresentano una vite di regolazione decisiva, indipendentemente dal design della PCR. Più **piccolo è il valore di CT di un campione in una qPCR, maggiore è la quantità iniziale di DNA nel campione.**

In condizioni standardizzate, questo dato è correlato (nel caso dei virus) alla quantità iniziale di genomi virali, la cosiddetta **carica virale**, che idealmente dovrebbe essere specificata come "numero di copie virali" per ml di campione. Nel caso della SARS-CoV-2, questa carica virale è correlata anche alla coltivabilità dei virus infettivi in coltura cellulare, come già pubblicato nel marzo 2020. (Figura 1e in Wölfel et al., <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>) **In questo caso, era necessaria una quantità minima di 10^6 copie di RNA/ml per poter coltivare i virus dal campione.**

C. Drosten dal maggio 2021, una media di 10^8 virus nel campione era addirittura necessaria per una coltura cellulare positiva. necessario (supplemento Figura S4 da <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34035154/>).

Quest'ultimo studio ha anche dimostrato che nessuna delle 25.381 persone testate aveva genomi virali per ml nel campione nel caso di una carica virale determinata inferiore a 10^5 (Tabella S1), mentre la RT-qPCR del protocollo originale (Corman V et al, <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>) può dare un risultato positivo già a circa 4 copie per campione (5µl corrispondono a circa 10^3 copie/ml), cioè un fattore di 1.000-10.000 prima rispetto a un campione con una carica virale effettivamente infettiva.

Anche i **sistemi di test PCR commerciali**, i cosiddetti kit, di cui esistono già circa 630 diversi in tutto il mondo (al maggio 2022) (<https://www.finddx.org/covid-19/test-directory>) mostrano talvolta limiti di rilevamento inferiori a 10 copie/reazione, come i kit dell'azienda TIB-Molbiolo (https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_53-0777_96_Wuhan-R-gene_V200204_09155376001%20%282%29.pdf) - Punkt 5 „Specification“. Un esempio della differenza tra capacità di rilevamento e limite di rilevamento ragionevole è riportato nell'esempio **ALLEGATO 3**.

In termini tecnici, occorre distinguere tra "contaminazione"* della gola con alcuni singoli virus che non causano infezione e una vera e propria "infezione". Quest'ultima è accompagnata da virus in grado di moltiplicarsi, il che porta a) a una malattia sintomatica e b) all'infettività, cioè alla capacità di infettare altre persone. Nota: *sul termine: "Abbiamo imparato che, a differenza dei batteri, non esiste una normale colonizzazione con i coronavirus sulla mucosa". (K. Henning nel Podcast 58 con C. Drosten)

Christian Drosten ha già descritto questo **aspetto della contaminazione rispetto alla vera infezione nel 2014** in un'intervista a Wirtschaftswoche in relazione alla MERS

<https://www.wiwo.de/technologie/forschung/virologe-drosten-im-gespraech-2014-die-who-can-only-recommend-it/9903228-2.html>):

"Sì, ma il (nota: si intende la PCR) è così sensibile da poter rilevare una singola molecola ereditaria di questo virus. Se, ad esempio, tale agente patogeno attraversa la mucosa nasale di un'infermiera per un giorno (nota: questo sarebbe il metodo sopra menzionato), il virus verrebbe rilevato. "contaminazione") senza ammalarsi o notare altro, poi improvvisamente diventa un caso di Mers. Dove prima venivano segnalati i malati terminali, ora improvvisamente vengono inclusi nelle statistiche casi lievi e persone che in realtà sono perfettamente sane". [.] "Perché Quello che interessa prima di tutto sono i casi reali (nota: questi sono gli "infetti"). **Credo che sia discutibile se gli operatori ospedalieri senza sintomi o con un'infezione lieve siano davvero portatori del virus. Ancora più discutibile è se possano trasmettere il virus ad altri**".

Quest'ultima è un'affermazione fondamentale anche per quanto riguarda i virus della SARS-CoV-2, che sono strettamente correlati alla MERS.

Ma è proprio questo punto di trasmissione del virus (e quindi il motore della pandemia) che costituisce la logica delle misure di intervento come gli ordini di quarantena/isolamento, che sono

I "blocchi" e le cosiddette regole AHA.

3.3.2 Prove della rilevanza del valore della TC

A) Uno studio canadese di Jared Bullard/Guillaume Poliquin in Clinical Infectious Diseases 2020, che può essere letto al link (<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa638>), è giunto già nel maggio 2020 alla conclusione che al di sopra di un valore di CT di 24, non è stato più trovato alcun virus riproducibile - ciò significa che il tentativo di coltivare successivamente virus riproducibili da campioni di striscio, che ha portato a un test positivo solo con un valore di CT più alto, è fallito. Secondo questo studio, al di sopra di un valore di CT pari a 24, la quantità di materiale genetico virale rilevabile è così piccola che il test positivo non può più essere interpretato nel senso di un'infezione attiva. Un ampio studio di Jaffar et al. ([Doi 10.1093/cid/ciaa1491](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491)) ha fissato il limite per la coltivabilità del SARS-CoV-2 da materiale campione di pazienti a un valore di CT pari a 30.

B) In uno studio di confronto tra test dell'antigene/RT-qPCR e coltura del virus del CDC (<https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciab303/6224406>), la coltura del virus è stata descritta con successo per un intervallo di CT di 17,4-28,8), per cui solo al di sotto di un CT di 25 tutti i campioni provenienti da individui sintomatici sono stati

associati a una coltura del virus di successo e solo il 18,2% quando il CT era compreso tra 25 e 29. Nell'originale: "*Il virus è stato isolato da campioni con valori di Ct compresi tra 17,4 e 29,8; virus*

è stato isolato da tutti i campioni con un valore Ct <25 e dal 18,5% (5/27) dei campioni con un valore Ct ≥25 (centro di pagina 9). Indipendentemente da questo controllo con la coltura del virus, tuttavia, tutti i campioni positivi a due sequenze target del "gene N" con un Ct fino a 40 sono stati considerati "veri positivi".

C) Nel suo podcast NDR del 16.02.2021, C. Drosten ha esplicitamente indicato che un aumento del CT da 25-27 al di sopra del limite di 28 significa che le persone da cui questi strisci sono stati ottenuti con il CT più alto non sono più infettive. *"E ancora, si nota un passaggio di Ct da 25 a 27 circa, 27, 28. E questo è un intervallo in cui, secondo le nostre stime, l'infettività è davvero finita. Se vedete un campione di pazienti come questo e chiedete se il paziente è ancora infettivo, vi risponderò: **no, questa non è più un'area infettiva. È possibile metterli in relazione**".* Pagina 4 (colonna in alto a destra in: <https://www.ndr.de/nachrichten/info/coronaskript270.pdf>).

Con questi dati di CT, C. Drosten si riferisce presumibilmente soprattutto a uno studio sull'efficacia del vaccino in Israele, che è stato verificato mediante RT-qPCR.

Questo studio dal titolo "Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine (<https://www.nature.com/articles/s41591-021-01316-7>)" è citato anche in una lettera dell'RKI (AZ: ID3176 del 31.03.2021) al Ministero Federale della Salute. In questo studio, i test PCR dopo la vaccinazione (con BNT162b2) mostrano che nei soggetti vaccinati che sono diventati positivi per la SARS-CoV-2 nella PCR a partire dal 12° giorno dopo la prima vaccinazione, il CT per i tre geni testati (E, N, RdRp utilizzando il kit Seegene Allplex, che ha una specificità del 96-98,4% secondo lo schema Instant EQA 340) **passa da un CT medio di 25 a un CT medio di 27.**

Rispetto a una coorte non vaccinata, anch'essa positiva alla PCR per la SARS-CoV-2, **questo studio stabilisce un successo vaccinale basato su una diminuzione del TC di 1,64-2,33!!!!**

Nell'originale: *"Infine, applicato a tutte le infezioni (post-vaccinazione e non vaccinate, n=5.794), un modello di regressione lineare multivariato che tiene conto di età, sesso e vaccinazione quantifica **coefficienti di regressione Ct che vanno da 1,64 (gene N) a 2,33 (RdRp) per la vaccinazione dopo 12 giorni o più prima del campionamento dell'infezione**", che è matematicamente equivalente a una riduzione di 4 volte della carica virale nei vaccinati rispetto ai non vaccinati. Nell'originale: *"Poiché una differenza di 1 unità Ct equivale a un fattore di circa 1,94 in particelle virali per campione, queste differenze Ct rappresentano un rapporto di carica virale che va da 2,96 a 4,68".**

È inoltre degno di nota il fatto che in questo studio sono stati analizzati e valutati i valori di CT fino a 40 (Dati estesi Figura 4).

D) Di conseguenza, in una raccomandazione del 16.04.2021, il CDC affronta anche il CT nella PCR della SARS-CoV-2, affermando che dovrebbe avere un valore non superiore a 28, al fine di evitare prodotti PCR provenienti da "vaccine breakthroughs" (cioè persone positive alla

vaccinazione) al laboratorio per il sequenziamento (<https://www.cdc.gov/vaccines/covid-19/downloads/Information-for-laboratories-COVID-vaccine-breakthrough-case-investigation.pdf>).

E) Uno studio della Corea del Sud indica un CT di ≤ 25 come limite superiore di rilevanza clinica. "positivo" e utilizza questo valore per il confronto con la qualità dei test antigenici. Citazione originale: " [...] **basato su un valore Ct clinicamente significativo di ≤ 25** (....)". (p. 3 in <https://jkms.org/DOLx.php?id=10.3346/jkms.2021.36.e101>)

F) L'opinione scientifica unanime (compresa quella del Dr. Fauci del CDC statunitense, ma anche di alcuni scienziati citati dal New York Times nell'agosto 2020, <https://www.nytimes.com/2020/08/29/health/coronavirus-testing.html>) è **che tutti i risultati "positivi", che vengono rilevati solo a partire da un ciclo di 35, non hanno alcuna base scientifica (cioè non sono basati su prove)**. Il test RT-qPCR per la rilevazione del SARS-CoV-2, invece, che è stato diffuso in tutto il mondo con l'aiuto dell'OMS, è stato (e in seguito tutti gli altri test basati su di esso come modello) impostato su 45 cicli senza definire un valore di CT per "positivo".

G) Già nel maggio del 2020, il Centro nazionale per le malattie infettive di Singapore a documento di posizione (<https://www.ncid.sg/Documents/Period%20of%20Infectivity%20Position%20Statementv2.pdf>), che evidenzia che la

1. È importante *notare che il* rilevamento dell'RNA virale mediante PCR *non equivale all'infettività o alla vitalità* del virus.
2. Il valore soglia del ciclo (CT) della PCR, come **marker surrogato** per il contenuto di RNA virale, rileva l'RNA virale già a partire da un **CT di 30**, ma non la presenza di virus replicabili e le persone colpite non sono infettive.

Estratto del testo originale:

*"Un indicatore surrogato della 'carica virale' con la PCR è il valore soglia del ciclo (Ct). Un valore Ct basso indica un'elevata quantità di RNA virale e viceversa. Come già detto, il **rilevamento dell'RNA virale non significa necessariamente la presenza di un virus infettivo o vitale**. In uno studio locale di una coorte multicentrica di 73 pazienti COVID-19, quando il valore Ct era pari o superiore a 30 (cioè quando la carica virale è bassa), non è stato trovato alcun virus vitale (in base alla possibilità di coltivare il virus)."*

H) La RKI dichiara inoltre sulla sua homepage, a partire dall'11.08.2020, che

https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html#doc13490982bodyText4) "I primi risultati della diagnostica presso l'RKI mostrano che la perdita di coltivabilità nella coltura cellulare era accompagnata da una quantità di RNA pari a <250 copie/5 µL di RNA determinata mediante PCR in tempo reale (nota: è RT- qPCR). Questa concentrazione di RNA corrispondeva a un valore Ct >30 nel sistema di analisi utilizzato".

I) Uno studio della Corea del Sud (<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2027040>) fissa la soglia di coltivabilità del virus a un valore di TC pari a 28,4.

J) In uno studio condotto a Francoforte (<https://www.mdpi.com/2077-0383/10/2/328>), è stato dimostrato che su 64 campioni di pazienti positivi alla RT-qPCR (un gene testato), la coltivazione del virus in coltura cellulare è stata possibile solo in 33 casi (=52%). Questi campioni infettivi erano già positivi fino a un valore medio di CT di 26 (Figura supplementare 1), mentre la coltura del virus non era più possibile dai campioni con un CT superiore.

K) Il valore soglia CT 25 era già stato introdotto nel dicembre 2020 dall'inglese "Office of national statistics (ONS)", in questo caso con CT superiore a 25 valutato come negativo. Tabella 2 (Dati) nel foglio dati Excel collegato (link in basso). Risultati: *"L'analisi mostra: - Gli individui con una maggiore concentrazione di materiale genetico virale (casi positivi con bassi valori di Ct; inferiori a 25) hanno maggiori probabilità di essere infettivi in una famiglia rispetto a quelli con concentrazioni inferiori (casi positivi con alti valori di Ct; superiori a 25)".* Nell'originale: *"L'analisi mostra: - Le persone con una maggiore concentrazione di materiale genetico virale (casi positivi con bassi valori di Ct; inferiori a 25) hanno maggiori probabilità di essere infettive in una famiglia rispetto a quelle con concentrazioni inferiori (casi positivi con alti valori di Ct; superiori a 25)."* (<https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/conditionsanddiseases/adhocs/12683coronaviruscovid19infectionsurveycyclethresholdandhouseholdtransmissionanalysis>).

L) In riferimento a questa soglia dell'ONS, gli autori di un ampio studio di coorte condotto a Münster nell'estate del 2021 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8166461/>), che ha utilizzato la RT-qPCR dei geni ORF-1ab ed E in campioni di tampone di 162.457 persone, hanno concluso: **"La positività del test RT-PCR non dovrebbe essere presa come misura accurata dell'incidenza infettiva della SARS-CoV-2"** Nell'originale: *"RT-PCR test positivity should not be taken as an accurate measure of infectious SARS-CoV-2 incidence"*.

Questo studio ha mostrato che un totale del 2,6% dei campioni esaminati ha avuto un risultato positivo alla RT-qPCR. La soglia di TC al di sopra della quale i campioni sono stati considerati definitivamente negativi è stata fissata a 40. I campioni sono stati analizzati anche in base al numero di campioni che sono risultati positivi fino a un valore soglia di 25

I risultati hanno mostrato che nelle persone **asintomatiche** solo lo 0,4% (68 su 16.874 persone) ha avuto un test RT-qPCR positivo con un CT medio di quasi 29. Di questi, solo il 27% (= 18 persone) aveva un CT fino a 25, che è stato interpretato dagli autori *come "indicativo della probabilità che la persona sia infettiva"*. Ciò significa che solo in 18 persone asintomatiche (sane) su 16874 (=0,1%) la PCR ha indicato una possibile infettività per quanto riguarda il SARS-CoV-2.

M) Inoltre, su 6212 individui **sintomatici** dei periodi di picco dei primi due

Nella prima e seconda "ondata corona", solo 403 persone (=6,5%) hanno avuto una RT-qPCR positiva per SARS-CoV-2 con un CT medio di 27,8 (prima ondata) e 26,6 (seconda ondata). Di queste persone positive, un massimo (nella seconda ondata) del 40% (= 145/367) e nella prima ondata anche solo il 26,5% (=10/36) aveva un CT fino a 25 e poteva quindi essere classificato come probabilmente infettivo. **Di conseguenza, solo 155 delle 6212 persone sintomatiche (malate) (=2,5%) potevano essere ritenute possibilmente infettive con il SARS-CoV-2.**

N) In il Covid-19 Studio sul controllo delle infezioni da Inghilterra (<https://elifesciences.org/articles/64683>), gli autori hanno analizzato i risultati del test SARS CoV-2 PCR (3 geni, test commerciale di Thermo Fisher) in 3,3 milioni di casi. In totale, è stato trovato lo 0,83% di strisci positivi al test con un valore medio di CT di 29,2, per cui era sufficiente che un gene dei tre geni target testati, il gene N, fosse positivo da solo e anche senza un limite di CT definito. In questo caso, la "bassa evidenza" di infezione comprendeva i soggetti che non presentavano sintomi e solo un gene con un CT pari o superiore a 34, mentre i casi "molto probabili" erano considerati quelli che presentavano sintomi e due o tre geni target positivi.

È interessante notare che un CT basso (24,9) si correlava con una successiva rilevabilità degli anticorpi nel siero (indicando una vera infezione), mentre i risultati del test con valori di CT elevati (superiori a 33) erano di solito associati a nessuna risposta anticorpale negli individui affetti, indicando una mancanza di vera infezione.

O) Un confronto tra i kit di test PCR commerciali (http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag_tab.), risulta evidente l'enorme intervallo di valori di CT anche con campioni altamente standardizzati tra i diversi kit di analisi e anche in relazione ai diversi geni target. Anche i risultati dei vari test interlaboratorio di Instand e.V. sarebbero molto interessanti, ma in gran parte non sono accessibili al pubblico e sono tenuti sotto chiave su richiesta in conformità alla legge sulla libertà d'informazione (<https://fragdenstaat.de/anfrage/herausgabe-der-auswertung-des-ringversuchs-der-gruppe-340-termin-4-2020/#nachricht-533736>). Ad esempio, in un PDF presentato della serie di test di giugno/luglio 2020, il CT per lo stesso gene target definito varia tra i diversi kit

campione diluito di SARS-CoV-2 (numero di campione 340061) per i geni raccomandati dall'OMS tra 15-40 (gene E), 20-40,7 (gene N) e 19,5-42,8 (gene RdRp). Ciò dimostra in modo impressionante l'estrema mancanza di standardizzazione dei test all'interno dei laboratori partecipanti (e certificati).

P) Nella valutazione di due controlli standardizzati dell'OMS per la RT-qPCR da parte di diversi laboratori e diversi approcci RT-qPCR, (Bentley E, WHO/BS/2020.2402 disponibile all'indirizzo: <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2402>), il campione di controllo 20/138 (un campione di virus sintetico con la sequenza di Wuhan1, linea nera nella figura) ha mostrato che una dimensione del campione di $10^{6,73}$ (correlazione con la carica virale potenzialmente infettiva) in media a un CT di 23-24, una quantità di $10^{5,73}$ (inferiore alla carica virale potenzialmente infettiva) è stata considerata positiva a un CT di 25,5-26,5, per cui con questo approccio la carica virale potenzialmente infettiva di 10^6 genomi virali si collocherebbe in un intervallo di CT23-26,5.

Per un SARS-CoV-2 inattivato (campione 20/146, linea rossa nella figura) con una quantità di virus definita di $10^{7,7}$ nella soluzione madre, è stata evidenziata una rilevazione positiva dell'RNA già a un CT inferiore a 20, a $10^{6,7}$ il CT era di 22-23 e a $10^{5,7}$ il CT era di 25,5-26, per cui anche con un campione definito contenente i virus SARS-CoV-2, un equivalente di una dose infettiva viene già rilevato a un CT compreso tra 22 e 26.

Di seguito è riportato il dato autorevole della pubblicazione a pagina 63. Le quantità standardizzate di RNA in uscita sono indicate per il campione 20/138 al punto 3 (Unitage) a pag. 66 come 6,73 log₁₀ UI/ml e per il campione 20/146 a pagina 64 al punto 3 come 7,7 log₁₀ UI/ml.

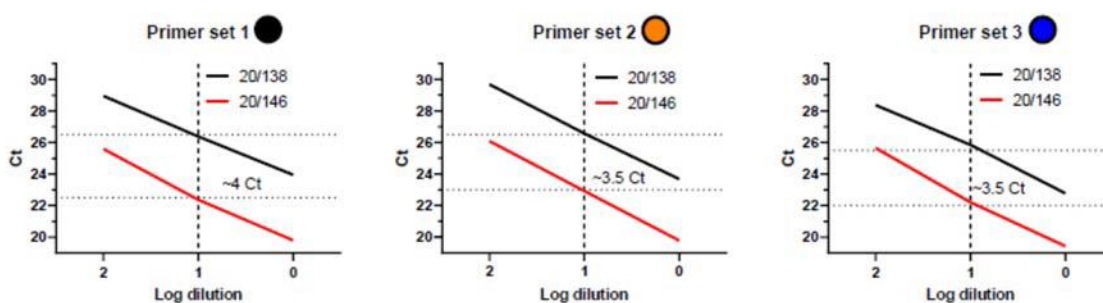


Figure 2. Relative potency of 20/138 compared to 20/146 by Real-time RT-PCR quantification using three primer sets. There is an approximate 0.5 Ct shift between the standard curves using primer set 1 which targets the region of lower coverage, in comparison to primer sets targeting the junction (primer set 2) and region of higher coverage (primer set 3).

3.3.3 Valutazione intermedia:

Alla luce dei punti A-O di cui sopra, è sconcertante che la RT-qPCR sia ancora considerata il "gold standard" dall'RKI senza definire le esatte convalide e le condizioni di certificazione esterna e i valori target della CT (e senza che queste siano apparentemente pienamente monitorate dalle autorità).

In generale, la RT-qPCR non è in grado di rilevare virus intatti e interrogabili (infettivi), nemmeno il genoma virale completo e intatto, ma solo l'acido nucleico della sezione ricercata, a causa delle sole procedure metodologiche. In genere è possibile definire un valore soglia (CT) per i test PCR ben regolati e correttamente **eseguiti mediante convalida con una coltura virale parallela in coltura cellulare**, al di sopra del quale un segnale PCR positivo non è più correlato a virus interrogabili. Si tratta di una routine ben praticata da anni nel monitoraggio degli emoderivati.

Questa rigorosa convalida consente - a condizione che il sistema di analisi NON venga modificato - di stimare la carica virale e quindi la possibile infettività del campione analizzato come marker surrogato, ma mai di effettuare una diagnosi definitiva. Non appena si cambia un componente del sistema di analisi PCR (che si tratti di sostanze chimiche, materiali plastici, enzimi, procedure di protocollo o macchine) in una delle fasi applicate, il sistema deve essere nuovamente calibrato.

Da tutte le informazioni pubblicate finora (vedi sopra), si può concludere che qualsiasi valore di CT superiore a 35 non è più associato alla coltivabilità dei virus infettivi ed è quindi il valore di cut-off assoluto per la decisione "positivo", anche indipendentemente dal sistema di test utilizzato. L'intervallo CT 25-35 può ancora essere validamente valutato come marcatore surrogato di "positività nel senso di una carica virale potenzialmente sufficiente per l'infettività" in modo dipendente dal test se, come descritto, è stato confrontato con una coltura virale con un'adeguata validazione nel laboratorio di esecuzione.

CT ≤ 25 : rilevamento positivo del genoma alto carico di mRNA
nel campione CT 26-35 : positivo solo se abbinato alla coltivazione del virus
CT > 35 : negativo

La valutazione rigorosa del valore CT è particolarmente importante quando nella PCR viene analizzato un solo segmento genico, ma in generale si applica a ogni singolo target.

3.4. Controlli adeguati

Per valutare correttamente la **sensibilità** e la **specificità** di una RT-qPCR, è necessario includere campioni adeguati in ogni corsa di reazione. Questo inizia nel sito di analisi con "tamponi bianchi" per escludere in modo affidabile la contaminazione nel sito di raccolta del campione, continua con i controlli di estrazione per garantire il corretto isolamento di RNA riproducibile con tutte le successive fasi di elaborazione, cioè un RNA definito prodotto artificialmente o - preferibilmente - isolati virali inattivati di una concentrazione definita, che viene trasportato ed elaborato in tutte le fasi di lavoro della preparazione del campione fino alla PCR e per il quale viene poi effettuata anche la PCR con l'ausilio di primer adatti. In questo modo, si può escludere che sostanze inibenti o errori impediscano l'amplificazione dell'RNA durante la lavorazione del campione.

Tali controlli definiti sono disponibili da dicembre 2020 tramite l'OMS (cfr. punto 3.3.2P, fonte: <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2402>) e anche da novembre 2020 tramite Instant e.V.. Dal libretto che accompagna l'invio della definizione (https://www.instand-ev.de/fileadmin/uploads/user_upload/Documents/Virology/20210118g_Supplementary_booklet_-_campioni_quantitativi_di_riferimento_1_e_2_-_SARS-CoV-2.pdf), in generale si possono individuare i seguenti aspetti:

- Il ceppo BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 è stato utilizzato come controllo, in quanto campione inattivato termicamente con conte virali controllate corrispondenti a 10^6 e 10^7 RNA copie/ml, in quanto questa è la soglia per valutare i pazienti come È stato impostato "probabilmente contagioso" (in: 2.2. Scopo). Questo ceppo è stato secondo il database (<https://www.european-virus-archive.com/virus/human-2019-ncov-isolate>) è stato ottenuto a Monaco di Baviera il 28.01.2020 ed è venduto tramite la Charité.
- A seconda dei geni analizzati e del laboratorio che esegue il test, è stata riscontrata un'ampia gamma di valori di CT nonostante un campione definito nei laboratori di riferimento. Ad esempio, il valore CT per il gene E per il campione con 10^6 copie/ml variava tra 21,9 (laboratorio 4) e 28,7 (laboratorio 1); per il gene RdRp tra 24,8 (laboratorio 4) e 33,0 (laboratorio 1). Tra tutti i test dei laboratori dichiaranti, si è verificata una dispersione dei valori di CT di 12-38 per questo campione (Figura 2) e una dispersione dei valori di CT di 10-36 per il campione a più alta concentrazione. Questo esempio dimostra da solo che ogni laboratorio deve sempre portare con sé i campioni definiti in ogni serie di test per poter convertire il valore di CT del laboratorio stesso nella carica virale, che dovrebbe rappresentare il campione di riferimento effettivo per la valutazione del campione del paziente esaminato.

L'estrema variabilità dei valori di CT nei diversi sistemi di prova è affrontata da C. Drosten
in il suo Podcast NDR 94 da 22.06.2021

(<https://www.ndr.de/nachrichten/info/coronaskript306.pdf>) come segue: "I valori di Ct che abbiamo qui non sono facilmente comparabili tra i singoli produttori di test. ". "Ma solo finché siamo nello stesso sistema di test, possiamo confrontarli numericamente. Le differenze sono talvolta notevoli. Ci sono produttori di test per i quali un valore di, diciamo, 25 non è affatto preoccupante, mentre lo stesso valore di 25 nel test di un altro produttore dimostra che si tratta già di una concentrazione gravemente infettiva. **Ciò è dovuto semplicemente al fatto che questi produttori di test non standardizzano il valore Ct**". (pag. 17) Continua lamentando che questa standardizzazione non avviene con le calibrazioni (fatte da lui) (pag. 18): "Al momento, tuttavia, non si sta verificando che le raccomandazioni vengano formulate e applicate in modo trasversale dagli uffici sanitari statali o anche dall'Istituto Robert Koch per determinate aree di applicazione su questa base tecnica di laboratorio che è stata creata." Significa: dall'autunno 2020 sarebbero disponibili controlli adeguati per la determinazione della carica virale, che dovrebbero essere richiesti dalle autorità ai laboratori per convalidare i risultati dei test, ma questo ovviamente non sta accadendo (secondo C. Drosten). "Possiamo anche farlo in modo tale che il problema intrinseco della non comparabilità dei valori Ct sia già stato risolto. Attenzione, in autunno. Il problema non è la tecnica e i test di laboratorio, ma ancora una volta l'attuazione e la regolamentazione. "

3.4.1. Prevedere controlli adeguati:

Inoltre, ogni serie di test corretta deve includere una serie di controlli negativi esterni (cioè eseguiti in parallelo con i campioni dei pazienti) e un controllo positivo, idealmente costituito da un ceppo di virus SARS-CoV-2 definito inattivato. Sarebbe compito proprio dell'RKI (con l'aiuto di altre istituzioni pubbliche adeguate, come l'Istituto Bernhard Nocht o l'Istituto Friedrich-Löffler) isolare un numero sufficiente di virus SARS-CoV-2 da campioni di pazienti nelle strutture di laboratorio disponibili (livello di sicurezza 4), coltivare da questi ceppi definiti come controlli, inattivarli e consegnarli in un numero definito di virus come controlli ai laboratori di analisi tramite le autorità di controllo locali. Tuttavia, poiché questo importante servizio non viene ancora offerto nemmeno dopo più di un anno dalla "pandemia", il controllo positivo consiste solitamente in un RNA sintetico che codifica solo i geni bersaglio del sistema di test. Questo controllo positivo può essere utilizzato anche per determinare il limite inferiore di rilevazione della PCR. Questo valore è indicato da alcuni kit commerciali come 20 o meno genomi virali per campione e quindi (vedi punto 1.3.2.) rileva già una quantità di virus nello striscio inferiore alla dose infettiva di un fattore 10^5 , cioè non ha valore diagnostico/prognostico. Una panoramica dei kit commerciali attualmente in uso con i relativi dati di linea è disponibile all'indirizzo http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag_tab.

-

3.4.2. Confronti interlaboratorio: caratteristiche del primo lotto

I controlli eseguiti correttamente comprendono anche la partecipazione dei laboratori che eseguono i test ai cosiddetti "ring test". In questi casi, un panel anonimo di campioni di test viene messo a disposizione da un fornitore esterno. Nel caso della rilevazione di virus, questi contengono campioni negativi e campioni con virus strettamente correlati (inattivati) per verificare la specificità (questi campioni non devono dare un segnale positivo) e campioni positivi con diverse diluizioni del virus ricercato (inattivato) per determinare la sensibilità (a partire da quale numero di virus la PCR diventa positiva, con quale valore di CT).

Prova immediata e.V.

Nel caso della SARS-CoV-2, il primo schema di AQE "Virus Genome Detection - SARS-CoV-2 (340)" è stato condotto dall'associazione "INSTANT e.V.", pronto nell'aprile 2020. Secondo il rapporto, 488 laboratori hanno partecipato a questo schema di AQE, di cui 463 hanno riportato i risultati. I risultati possono essere letti nel commento pubblicato (Zeichhardt M: *Kommentar zum Extra Ringversuch Gruppe 340 Virusgenom-Nachweis SARS-CoV-2*", disponibile all'indirizzo: <https://corona-ausschuss.de/wp-content/uploads/2020/07/Instand-Ringversuch-Virusgenom-Nachweis-SARS-CoV-2.pdf>).

mostra due deviazioni da il che già si trova all'indirizzo e
evidenziavano problemi di laboratorio con la RT-qPCR per il rilevamento del SARS-CoV-2: Ad esempio, a pagina 4 della pubblicazione si legge: *"Nota importante sulla valutazione: solo 4 dei 7 campioni testati in questo schema di AQE supplementare saranno presi in considerazione per ottenere un certificato di partecipazione di successo"*. Nella nota a pagina 10 del commento si legge: *"Nella valutazione intermedia del 17 aprile 2020, tutti i partecipanti allo schema Extra INSTAND EQA (340) Virus Genome Detection of SARS-CoV-2 April 2020 sono stati informati in anticipo delle caratteristiche dei campioni 340059, 340060 e 340064. I risultati di questi 3 campioni non saranno presi in considerazione per la concessione di un certificato [...]"*. Il motivo di questa esclusione di alcuni campioni è spiegato a pagina 4 del commento: *"Mentre l'extra ring test era ancora in corso, INSTANT e.V. ha ricevuto richieste urgenti dalla Germania e dall'estero per rivelare le proprietà dei campioni da testare prima della fine del periodo di presentazione esteso, cioè prima del 28 aprile 2020, in modo che i laboratori possano migliorare il loro metodo di prova a breve termine in caso di possibili misurazioni errate."* (pagina 4 del rapporto INSTANT e.V.))

Questa procedura è molto insolita per un vero confronto interlaboratorio e quindi non rappresenta più una procedura di verifica esterna indipendente dei laboratori partecipanti.

Nonostante i campioni già individuati e la portata ridotta del test, in un gran numero di laboratori si sono verificate commistioni di campioni - come indicato a pagina 18 del commento: *"Per il campione 340064 (SARS-CoV-2 positivo diluito 1:100 000), il tasso di successo ridotto di solo il 93,2% è dovuto principalmente all'assegnazione di risultati errati (commistioni) per il campione 340064 e il campione 340065 (negativo per SARS-CoV-2 e*

per HCoV 229E). Le confusioni per i campioni 340064 e 340065 riguardano 24 laboratori con un totale di 59 risultati per campione. Si veda anche la sezione 2.4.2.1 [...]". Un gran numero di laboratori ha quindi scambiato il campione 340064 (SARS-CoV-2 leggermente diluito) con il campione 340065 (negativo per il SARS-CoV-2 e positivo per il virus strettamente correlato HCoV 229E).

A parte il fatto allarmante che un numero considerevole di campioni è stato evidentemente confuso anche con procedure altamente standardizzate in un confronto interlaboratorio (il che solleva la questione della corrispondente percentuale di confusioni di campioni e quindi di campioni di tampone erroneamente assegnati in condizioni di test di massa), è sorprendente che tutte le confusioni segnalate riguardassero solo questi due campioni, ma non i campioni con il numero finale 61 (SARS-CoV-2 molto diluito) e 62 (negativo), che sono stati anch'essi valutati. Il dettaglio dei risultati di un secondo test round robin da Giugno/luglio 2020 (<https://www.instand-ev.de/System/rv-files/Summary%20of%20Probe%20Properties%20and%20setpoints%20Virology%20340%20giugno%20luglio%20200911a.pdf>) non sono ancora disponibili per la consultazione pubblica in dettaglio.

3.5. Esclusione della contaminazione dei reagenti e dei "problemi nel corso dell'azione".

3.5.1 Contaminazione all'interno del laboratorio dovuta a errori di esecuzione

Il miglior progetto di PCR può comunque portare a risultati falsi positivi se i reagenti/kit sottostanti sono contaminati da campioni positivi o, molto più probabilmente, se la **contaminazione** avviene nel **flusso di lavoro del laboratorio**. Poiché la PCR è un metodo estremamente sensibile (corso di reazione esponenziale) che può rilevare solo poche molecole di un DNA, la contaminazione del laboratorio da parte dei prodotti finali della PCR è un problema importante nella diagnostica clinica (descritto, ad esempio, già nel 2004 in Aslanuadeh J et al, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1171111/>: "Una tipica PCR genera fino a 10^9 copie della sequenza bersaglio e, quando viene agitata, anche la più piccola goccia di aerosol contiene fino a 10^6 prodotti di amplificazione [6]. Se non controllati, gli aerosol di prodotti di amplificazione possono contaminare i reagenti di laboratorio, le attrezzature e i sistemi di ventilazione in un tempo relativamente breve [6].

Nell'originale: "Una tipica PCR genera fino a 10^9 copie della sequenza target e, se aerosolizzata, anche l'aerosol più piccolo conterrà fino a 10^6 prodotti di amplificazione [6]. Se non controllato, in un tempo relativamente breve l'accumulo di prodotti di amplificazione aerosolizzati contaminerà i reagenti di laboratorio, le attrezzature e i sistemi di ventilazione [6].

Questo rischio estremo di contaminazione richiede che i laboratori diagnostici che lavorano con la PCR prestino la massima attenzione ai test: personale altamente

qualificato, ambiente a prova di contaminazione, controllo indipendente permanente.

Già nello schema EQA 340 di aprile, citato in precedenza, è emerso un problema di risultati falsi positivi, che è stato commentato come segue (pagina 20): *"Inoltre, in alcuni casi i test con i campioni di controllo negativi per la SARS-CoV-2 340060, 340062 e 340065 indicano problemi di specificità indipendenti dagli scambi dei campioni 340064 e 340065. Occorre chiarire se questi **risultati falsi positivi** sono dovuti a un **problema di specificità dei test applicati o a un carry-over di SARS-CoV-2 durante l'esecuzione del test o a confusione con altri campioni in questo ring trial nei laboratori interessati**".* (Pagina 21 in basso di <https://www.instand-ev.de/System/rv-files/340%20DE%20SARS-CoV-2%20Genome%20April%2020%2000502j.pdf>). Per quanto riguarda il confondimento in questo schema di AQE, vedere i dettagli sopra alla voce "Schemi di AQE".

Se, in questo contesto, si vede anche come, ad esempio, secondo un servizio della BBC, nei grandi laboratori di prova in Inghilterra si lavora apertamente e con personale non addestrato, a rischio di contaminazione (filmato attualmente non più accessibile apertamente <https://www.youtube.com/watch?v=Uk1VK1reNtE>), non c'è da stupirsi se anche in Germania (dove tali rapporti non sono ancora stati filmati) ci sono occasionali segnalazioni di

Trovare "casi falsi positivi" dovuti alla contaminazione del laboratorio nei media (ad es. MVZ Augsburg).
- alla fine della sezione).

Anche in condizioni di laboratorio controllate, non è possibile escludere con sicurezza la contaminazione attraverso le fasi della PCR in un metodo così altamente sensibile. Il problema dei risultati falsi positivi della PCR nella diagnostica della SARS-CoV-2 dovuti alle procedure di laboratorio era già stato segnalato **nella prima pubblicazione della RT-qPCR** (Corman et al., DOI: [10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045)): *"In quattro reazioni individuali del test, è stata osservata una debole reattività iniziale, ma sono risultate negative al momento di ripetere l'analisi con lo stesso saggio" [.....] ".... **molto probabilmente a problemi di manipolazione**".*

Anche un problema di contaminazione, che ha portato a risultati falsi positivi in relazione a genomi di SARS-CoV-2 in uno studio condotto dalla Charité (tra gli altri con gli autori Drosten e Landt dell'articolo sopra elencato Corman et al, che descriveva la prima PCR per l'OMS già con contaminazioni), ha costretto gli autori a ritirare una pubblicazione su Science. Tra i motivi

*"Abbiamo trovato una **miscela di diversi frammenti di genoma di SARS-CoV-2 che hanno contaminato alcuni dei campioni**"* Nell'originale: *"We found a mixture of different SARS-CoV-2 genome fragments that contaminated some of the samples".*

frammenti genomici che contaminano alcuni dei campioni". ALLEGATO 5

Anche i "laboratori di riferimento" della Charité, che fanno capo al signor Drosten, hanno

Frammenti del genoma di SARS-CoV-2, che possono portare a risultati falsi positivi nella PCR diagnostica e nell'analisi del genoma (varianti).

3.5.2 Contaminazione dei materiali/reagenti da parte del produttore

Anche se la procedura in laboratorio funziona in modo ottimale ed è estremamente monitorata per ridurre al minimo la **contaminazione** legata al laboratorio, una fonte inaspettata di risultati falsi positivi può essere rappresentata dalla **contaminazione dei materiali/chimici utilizzati dal produttore**. Ad esempio, i materiali dei tamponi utilizzati per prelevare i campioni possono essere contaminati già in partenza, come nel caso del "Fantasma di Heilbronn", in cui i tamponi di cotone utilizzati per prelevare le tracce di DNA sulle scene del crimine sono stati contaminati con il DNA di un impiegato addetto all'imballaggio dello stabilimento del produttore, ostacolando così per anni la scientifica con tracce false (<https://www.faz.net/aktuell/gesellschaft/kriminalitaet/dna-ermittlungspanne-das-phantom-von-heilbronn-ist-widerlegt-1925411.html>).

Nel caso della diagnostica della SARS-CoV-2, nel giugno 2020 è stato pubblicato anche un problema di contaminazione dovuto a primer PCR contenenti controlli positivi ex works (Wernike et al., DOI: [10.1111/tbed.13684](https://doi.org/10.1111/tbed.13684)). In questo caso è stato notato che anche i campioni di acqua pura con diversi lotti di primer indipendenti hanno dato luogo a un rilevamento chiaramente positivo del SARS-CoV-2 nella RT-qPCR: *"Tuttavia, ci sono stati anche primer/set di campioni che hanno mostrato **contaminazioni di livello** molto **basso**, che sono state rilevate solo durante un'accurata validazione interna"*.

Inoltre, alcuni risultati falsi positivi dei test SARS-CoV-2 RT-qPCR riportati dalla stampa quotidiana nell'estate 2020 sono stati attribuiti a problemi materiali (ad esempio, <http://web.archive.org/web/20210111010037/https://www.br.de/nachrichten/bayern/probleme-in-augsburger-laboratory-bringing-false-test-results,SEh5Qq4>).

3.5.3 Valutazione intermedia:

Anche con un progetto ideale di RT-qPCR e una buona pratica di laboratorio con un'adeguata convalida, i problemi nel flusso di lavoro quotidiano e quelli provenienti dall'esterno attraverso campioni già contaminati ex works possono influenzare significativamente la qualità dei risultati della RT-qPCR e portare a risultati falsi positivi.

3.6. Kit di test PCR commerciali

Molto presto, i sistemi di test PCR commerciali, i "kit PCR", sono stati utilizzati nei laboratori di routine per la diagnostica, anche se gran parte di essi erano dichiarati per "RUO" ("research use only").

In particolare va menzionato il primo, e quindi più importante, produttore di test, l'azienda

Le raccomandazioni protocollari sono state indicate come autore insieme a Christian Drosten. I kit, che si basano sulle raccomandazioni dell'OMS, sono utilizzati da Roche nella sua macchina di analisi automatizzata su larga scala "Cobas" e, insieme ad altri fornitori (vedi <https://www.vdgh.de/covid-19/sars-cov-2-und-die-industrie/hersteller/artikel16741> elenco dei produttori di test), probabilmente costituiscono ancora la maggior parte dei kit utilizzati per la diagnostica di routine in Germania. È interessante notare che molti produttori di test specificano anche il "gene E" come target principale di rilevamento, rimanendo così vicini alla raccomandazione originale dell'OMS.

Le cifre esatte non possono essere accertate, ma TIB Molbiol ha già consegnato più di 60 milioni di questi test in tutto il mondo nel 2020, secondo le sue stesse informazioni (<https://www.tib-molbiol.de/en/covid-19>), anche se sono ancora dichiarati come "**Non testati per l'uso in procedure diagnostiche**" (ad esempio l'intestazione in https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_53-0777_96_Wuhan-R-gene_V200204_09155376001%20%282%29.pdf). I corrispondenti foglietti illustrativi con le informazioni sul protocollo e le descrizioni dei kit dell'azienda TIB Molbiol sono stati sorprendentemente, secondo i metadati dei PDF originariamente disponibili (possono essere resi disponibili elettronicamente), già il **15.01.2020** (!!!) completamente creati con il numero ROCHE SAP sono ancora disponibili invariati (anche se con metadati di analisi del 06.02.2020) parallelamente ad altri kit di test, che nel frattempo hanno un'approvazione per la diagnostica in vitro.

Attualmente (a partire da giugno 2022) esiste un'ampia gamma di sistemi di rilevamento PCR (https://www.theglobalfund.org/media/9629/covid19_diagnosticproducts_list_en.pdf), molti dei quali sono approvati anche per la diagnostica in vitro (IVD) della SARS-CoV-2. Nell'esemplare descrizione di uno di questi (https://www.genesig.com/assets/files/Path_COVID_19_CE_STE_D_IFU_Issue_500.pdf) si legge al punto 1. "Uso previsto": "**I risultati positivi sono indicativi della presenza dell'RNA del SARS-CoV-2". I risultati positivi non escludono la coinfezione con altri batteri o altri virus. I risultati negativi non escludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per le decisioni di trattamento dei pazienti. I risultati positivi e negativi devono essere combinati con le osservazioni cliniche, la storia del paziente e le informazioni epidemiologiche.** Nell'originale: "I risultati positivi sono indicativi della presenza dell'RNA del SARS-CoV-2". I risultati positivi non escludono la coinfezione con altri batteri o altri virus. I risultati negativi non precludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per le decisioni sulla gestione dei pazienti. I risultati positivi e negativi devono essere combinati con le osservazioni cliniche, la storia del paziente e le informazioni epidemiologiche".

4. Relazione tra la positività della rilevazione degli acidi nucleici nella RT-qPCR e la malattia e l'infettività

Solo le persone effettivamente infettate da virus che si riproducono e che vengono anche rilasciati dalle cellule all'esterno in quantità sufficiente "infettiva" possono trasmettere il virus e portare il rischio di malattia e devono quindi essere utilizzate per determinare l'andamento di un tasso di infezione e l'ondata di malattia.

"La PCR è il test standard per la diagnosi di infezioni virali come la SARS-CoV-2. Il test rileva i singoli geni patogeni ma non gli agenti patogeni intatti". E ancora: **"Esiste la possibilità che il test risulti positivo oltre la durata dell'infezione, perché i "detriti virali" sono ancora presenti nel naso o nella gola. Una prova affidabile dell'infettività è possibile solo con test elaborati in cui si esamina in laboratorio se il materiale dei tamponi può uccidere le cellule viventi".**

Questo è stato scritto dal Dt. Ärzteblatt il 01.02.2021 (<https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/120745>). Il CDC sottolinea inoltre, alla voce "Svantaggi" dei NAAT (test di amplificazione degli acidi nucleici = PCR), che **"Un test diagnostico NAAT positivo non dovrebbe essere ripetuto entro 90 giorni, perché le persone possono continuare ad avere RNA rilevabile dopo che il rischio di trasmissione è passato"** nell'originale: **"Un test diagnostico NAAT positivo non dovrebbe essere ripetuto entro 90 giorni, perché le persone possono continuare ad avere RNA rilevabile dopo che il rischio di trasmissione è passato"** (sotto nella tabella riassuntiva all'indirizzo: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#previous>)

"Il test PCR rileva segmenti genici del SARS-CoV-2; non dice nulla sul fatto che si tratti di virus in grado di infettare o di residui virali dopo l'infezione. Ciò richiederebbe una cultura dei patogeni". È stato in una pubblicazione del direttore dell'Istituto di Francoforte

Dipartimento della Salute da da Agosto 2020 a

https://www.laekh.de/fileadmin/user_upload/Heftarchiv/Einzelartikel/2020/10_2020/Die_Covid-19-Pandemie_in_Frankfurt_am_Main.pdf). E nella sua perizia del 21 aprile per un tribunale di Heidelberg (visualizzabile in forma anonima qui: <https://www.corodok.de/wp-content/uploads/2021/05/Gutachten-Prof.-Drosten-v.-31.3.2021-anonymisiert.pdf>), l'esperto C. Drosten conferma che un test RT-PCR può diventare positivo anche se

"almeno la sezione del genoma del virus da rilevare è presente nel campione analizzato".

"Ciò significa che anche frammenti di materiale genetico, senza provenire da un virus intatto e interrogabile, possono già dare risultati positivi nella PCR, fornendo così anche una presunta individuazione del virus in campioni non infettivi".

In una pubblicazione CDC del 13/07/20 intitolata **"CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel For Emergency Use Only Instructions for Use"** (<https://www.fda.gov/media/134922/download>) a pag. 38 sotto il titolo "Limitations" (che si

trova ancora a pag. 37):

"- Il rilevamento dell'RNA virale può non indicare la presenza di un virus infettivo o che il 2019-nCoV sia l'agente causale dei sintomi clinici".

La traduzione è: "Il rilevamento dell'RNA virale può non indicare la presenza di un virus infettivo o che il 2019-nCoV sia l'agente causale dei sintomi clinici".

Il fatto che la rilevazione di mRNA puro di SARS-CoV-2 non sia necessariamente correlata a una malattia e non debba essere utilizzata come unico criterio per valutare la malattia, ma sia solo un aiuto per confermare una diagnosi clinica, è chiaramente indicato anche nell'informativa dell'OMS "Notice for IVD Users 2020/05, Nucleic acid testing (NAT) technologies that use polymerase chain reaction (PCR) for detection of SARS-CoV-2" del 13.01.2021 (pubblicata il 20.01.2021 su <https://www.who.int/news/item/20-01-2021-who-information-notice-for-ivd-users-2020->).

05): "Se i risultati del test non corrispondono alla presentazione **clinica**, è necessario prelevare un nuovo campione e sottoporlo nuovamente al test utilizzando la stessa tecnologia NAT o una diversa". - **nell'originale:** "Se i risultati del test non corrispondono alla presentazione clinica, è necessario prelevare un nuovo campione e sottoporlo a un nuovo test utilizzando la stessa tecnologia NAT o una diversa. "

Inoltre: "La maggior parte dei **test PCR è indicata come ausilio alla diagnosi**, pertanto gli operatori sanitari devono considerare qualsiasi risultato in combinazione con la tempistica del campionamento, il tipo di campione, le specifiche del test, le **osservazioni cliniche, la storia del paziente**, lo stato confermato di tutti i contatti e le informazioni epidemiologiche". Nell'originale: "La maggior parte dei test di PCR sono indicati come ausilio alla diagnosi; pertanto, gli operatori sanitari devono considerare qualsiasi risultato in combinazione con la tempistica del campionamento, il tipo di campione, le specifiche del test, le osservazioni cliniche, la storia del paziente, lo stato confermato di eventuali contatti e le informazioni epidemiologiche".

Inoltre in a pubblicazione in Lancet ([https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)00425-6/fulltext#%20](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)00425-6/fulltext#%20)), gli autori si riferiscono al test RT-qPCR come segue: "Nell'originale: "In our view, **current PCR testing is therefore not the appropriate gold standard for evaluating a SARS-CoV-2 public health test**", perché secondo loro la PCR continua a risultare positiva anche dopo che le persone testate non sono più positive, in quanto l'RNA può continuare a persistere nell'organismo per settimane e mesi anche dopo che il sistema immunitario lo ha combattuto con successo, senza che la persona sia ancora infettiva. "Una volta che la replicazione del SARS-CoV-2 è stata messa sotto controllo dal sistema immunitario, i livelli di RNA rilevabili con la PCR nelle secrezioni respiratorie scendono a livelli molto bassi, per cui è molto meno probabile che le persone colpite possano infettare altre persone". **Le copie di RNA rimanenti**

può richiedere settimane, o talvolta mesi, per essere eliminata, durante i quali la PCR rimane positiva" nell'originale: "Una volta che la replicazione del SARS-CoV-2 è stata controllata dal sistema immunitario, i livelli di RNA rilevabili tramite PCR sulle secrezioni respiratorie scendono a livelli molto bassi, quando gli individui hanno molte meno probabilità di infettare altri. Le copie di RNA rimanenti possono impiegare settimane o talvolta mesi per eliminarsi, durante i quali la PCR rimane positiva".

In una pubblicazione su Science sotto la guida di C. Drosten del maggio 2021 (DOI: [10.1126/science.abi5273](https://doi.org/10.1126/science.abi5273)), in cui viene studiata l'infettività del SARS-CoV-2, gli autori definiscono i parametri per la quantificazione e la possibile trasmissione del virus nella primissima frase dell'abstract come "... sono la *carica virale* e se i campioni producono un isolato di virus replicante in coltura cellulare" Nell'originale: "... sono la *carica virale* e se i campioni producono un isolato di virus replicante in coltura cellulare". Nell'introduzione si afferma inoltre che la carica virale è determinata dalla concentrazione di RNA virale e dal successo dell'isolamento del virus nei saggi di coltura cellulare. Inoltre, sottolineano che anche se "la ***carica virale e l'infettività in coltura cellulare non si traducono direttamente nell'infettività in vivo***, e l'influenza del contesto sociale e del comportamento sulla trasmissione è molto elevata, si può generalmente ritenere che questi parametri quantificabili siano molto probabilmente associati alla probabilità di trasmissione". Nell'originale: "Sebbene la carica virale e l'infettività delle colture cellulari non possano essere tradotte direttamente in infettività in vivo, e l'impatto del contesto sociale e del comportamento sulla trasmissione sia molto elevato, questi parametri quantificabili possono essere generalmente ritenuti quelli più strettamente associati alla probabilità di trasmissione".

In il suo NDR podcast 94 da 22.06.2021
(<https://www.ndr.de/nachrichten/info/coronaskript306.pdf>) A pagina 16, C. Drosten affronta il collegamento tra valore Ct e infettività come segue: ". che un caso, solo perché il paziente

ha un alto valore di Ct in questo momento, quindi, dato che potrebbe non essere infettivo in questo momento, ha poco virus, ha un virus, ma ha poco virus,....."

5. Conclusione: significatività dei test RT-qPCR per la rilevazione dell'infettività con il coronavirus SARS-CoV-2

1. Alla luce dei problemi e delle limitazioni tecniche qui descritte, la RT-qPCR non è uno strumento diagnostico affidabile (e approvato) per il rilevamento dei virus infettivi (in grado di replicarsi) della SARS-CoV-2.
2. Inoltre, il risultato del test RT-qPCR puro è solo un valore di laboratorio che, alla luce degli aspetti citati, non permette mai di affermare in modo valido la presenza di virus infettivi e può essere utilizzato solo in combinazione con una diagnosi clinica dei sintomi (raccolta da operatori sanitari, in Germania medici) per valutare una possibile infezione virale.

Sintesi:

Per il test di persone asintomatiche e persino sintomatiche sulla base di un tampone nasofaringeo, come viene fatto acriticamente in gran numero e prevalentemente da personale non medico SENZA (in modo cruciale: contrariamente a quanto richiesto dall'OMS!) prendere l'anamnesi e i sintomi delle persone testate, la RT-qPCR utilizzata in qualsiasi forma non è adatta a rilevare l'infezione e soprattutto l'infettività con SARS-CoV-2.

Valutazione dei termini "paziente asintomatico" e "paziente positivo" in relazione ai soggetti sottoposti a test RT-qPCR per SARS-CoV-2

Secondo le definizioni (vedi sotto), il termine paziente asintomatico non ha senso per gli individui sani che sono risultati positivi alla PCR senza avere alcun sintomo.

Poiché il termine "paziente" include di per sé una condizione medica che richiede cure mediche professionali, una persona positiva alla RT-qPCR può essere definita paziente solo se presenta dei sintomi. Questi ultimi (sintomi) corrispondono al termine "infezione", poiché una persona può essere considerata infetta solo se il suo organismo reagisce a un agente patogeno che la invade e si moltiplica.

Definizione CDC di pazienti con Covid-19 (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>)

Nelle persone infettate da COVID-19 è stata segnalata un'ampia gamma di sintomi, che vanno dalla malattia lieve a quella grave. I sintomi possono comparire da 2 a 14 giorni dopo il contatto con il virus. Chiunque può avere sintomi da lievi a gravi. Le persone che presentano questi sintomi possono avere la COVID-19:

Sintomi

- Febbre o brividi
- Tosse
- Respiro corto o difficoltà respiratorie
- Stanchezza
- Dolori muscolari o del corpo
- Mal di testa
- Nuova perdita del gusto o dell'olfatto
- Mal di gola
- Stitichezza o naso che cola
- Nausea o vomito
- Diarrea

Un "paziente positivo alla PCR" è quindi una persona **con sintomi** (in questo caso sintomi di una malattia respiratoria/sintomi di un'infezione virale),

Nell'originale:

Le persone affette da COVID-19 hanno riportato un'ampia gamma di sintomi, da quelli lievi a quelli più gravi. I sintomi possono comparire 2-14 giorni dopo l'esposizione al virus. Chiunque può avere sintomi da lievi a gravi. Le persone che presentano questi sintomi possono avere COVID-19:Febbre o brividi

- Tosse
- Respiro corto o difficoltà respiratorie
- Stanchezza
- Dolori muscolari o del corpo
- Mal di testa
- Nuova perdita del gusto o dell'olfatto
- Mal di gola
- Congestione o naso che cola
- Nausea o vomito
- Diarrea

Di conseguenza, una persona che non presenta alcuno dei sintomi di cui sopra non è né infetta né paziente, indipendentemente dai risultati della RT-qPCR.

Infezione:

Sintesi dalle fonti sottostanti:

Un'infezione è definita come una situazione in cui si verificano almeno i tre aspetti seguenti:

- Invasione del corpo da parte di microrganismi (germi) come batteri o virus.
- Questi microrganismi invasivi si moltiplicano nell'organismo
- E il corpo reagisce ad essi (sintomi)

Per definizione, parlare di infezione o di persona infetta è vero solo se sono presenti tutti e tre gli aspetti sopra citati.

Ciò significa: senza sintomi ("asintomatico") - non si può definire l'infezione nella persona colpita.

Fonti:

1. <https://www.rxlist.com/infection/definition.htm>:

L'invasione e la moltiplicazione di microrganismi come batteri, virus e parassiti che non sono normalmente presenti nell'organismo.

2. Wikipedia:

Un'infezione è la penetrazione di agenti patogeni nel tessuto corporeo di un organismo, il loro

La moltiplicazione e la reazione dei tessuti dell'ospite agli agenti infettivi e alla loro

Le malattie infettive, dette anche malattie trasmissibili, sono malattie causate da un'infezione.

Infezione

<https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/infection>

Penetrazione e moltiplicazione di microrganismi nei tessuti del corpo, come in una malattia infettiva. Il processo di infezione assomiglia a una catena circolare, in cui ogni anello rappresenta uno dei fattori coinvolti nel processo. Una malattia infettiva si verifica solo quando ogni collegamento è presente e nell'ordine corretto.

Queste connessioni sono

- (1) l'agente patogeno che deve essere presente in numero e virulenza sufficienti a distruggere i tessuti normali;
- (2) I serbatoi in cui l'agente patogeno può prosperare e moltiplicarsi, ad esempio i tessuti corporei e le escrezioni di esseri umani, animali e insetti, nonché alimenti e acqua contaminati;
- (3) una via di accesso attraverso la quale l'agente patogeno può lasciare l'ospite, come le vie respiratorie o il tratto intestinale;
- (4) una modalità di trasmissione, ad esempio mani, correnti d'aria, vettori, fomiti o altri mezzi con cui gli agenti possono essere trasmessi da un luogo o da una persona all'altra; e
- (5) una porta d'ingresso attraverso la quale gli agenti patogeni possono entrare nel corpo di un (6) ospite suscettibile.

Le ferite aperte e le vie respiratorie, intestinali e riproduttive sono esempi di porte di ingresso. L'ospite deve essere suscettibile alla malattia, cioè non deve possedere l'immunità alla malattia o una resistenza sufficiente per superare l'invasione degli agenti patogeni. L'organismo reagisce all'invasione degli agenti patogeni con la formazione di anticorpi e una serie di cambiamenti fisiologici chiamati INFIAMMAZIONE.

Nell'originale:

infezione

invasione e moltiplicazione di microrganismi nei tessuti del corpo, come in una malattia infettiva. Il processo infettivo è simile a una catena circolare in cui ogni anello rappresenta uno dei fattori coinvolti nel processo. **Una malattia infettiva si verifica solo se ogni anello è presente e nella sequenza corretta.**

Questi link
sono

- (1) l'agente causale, che **deve essere in numero e virulenza sufficienti** a distruggere i tessuti normali;
- (2) serbatoi in cui l'organismo può prosperare e riprodursi; ad esempio, tessuti corporei e rifiuti di esseri umani, animali e insetti, nonché cibo e acqua contaminati;
- (3) un portale attraverso il quale l'agente patogeno può lasciare l'ospite, come le vie respiratorie o il tratto intestinale;
- (4) una modalità di trasferimento, come le mani, le correnti d'aria, i vettori, i fomite o altri mezzi con cui gli agenti patogeni possono essere trasferiti da un luogo o da una persona all'altra; e
- (5) un portale di ingresso attraverso il quale gli agenti patogeni possono entrare nel corpo di (6) un ospite suscettibile.

Le ferite aperte e le vie respiratorie, intestinali e riproduttive sono esempi di portali di ingresso. L'ospite deve essere suscettibile alla malattia, non avere alcuna immunità o non avere una resistenza adeguata per superare l'invasione degli agenti patogeni. L'organismo risponde all'invasione degli organismi causali con la formazione di [ANTIBODI](#) e con una serie di cambiamenti fisiologici noti come [INFIAMMAZIONE](#).

<https://www.cdc.gov/infectioncontrol/spread/index.html>

Come si verificano le infezioni?

Un'infezione si verifica quando i germi entrano nel corpo, si moltiplicano e scatenano una reazione da parte dell'organismo.

Perché si verifichi un'infezione sono necessarie tre cose:

- Fonte: luoghi in cui vivono agenti infettivi (germi) (ad esempio lavandini, superfici, pelle umana).
- Persona suscettibile che ha la possibilità di far entrare i germi nell'organismo
- Trasmissione: via attraverso la quale i germi raggiungono la persona

suscettibile Nell'originale:

Come si verificano le infezioni?

Un'infezione si verifica quando **i germi entrano nel corpo, aumentano di numero e provocano una reazione dell'organismo.**

Perché si verifichi un'infezione sono necessarie tre cose:

- **Fonte:** luoghi in cui vivono agenti infettivi (germi) (ad esempio, lavandini, superfici, pelle umana).
- **Soggetto suscettibile** con una via d'ingresso dei germi nell'organismo
- **Trasmissione:** un modo in cui i germi vengono trasferiti alla persona suscettibile.

Paziente:

Definizione come sintesi dalle fonti sottostanti:

Un paziente è una persona sottoposta alle cure di un operatore sanitario professionale che presenta sintomi di malattia o lesione o che mostra altre limitazioni della salute completa.

Secondo la definizione, una persona sana ("asintomatica") senza problemi medici non può essere definita "paziente".

Wikipedia:

Come **paziente** (dal latino *patiens* 'che soffre, che sopporta', participio presente attivo di *pati* (che significa "soffrire, sopportare")) si riferisce a una persona che ricorre a servizi medici o a servizi di altre persone che forniscono trattamenti curativi. Può trattarsi della prevenzione, dell'individuazione o del trattamento medico di malattie o delle conseguenze di un incidente.

In inglese Wikipedia ancora:

La parola paziente significava originariamente "qualcuno che soffre". Questo sostantivo inglese deriva dalla parola latina *patiens*, participio presente del deponente *patior*, che significa "soffro", ed è correlato al verbo greco πάσχειν (= *paskhein*, soffrire) e al relativo sostantivo πάθος (= *pathos*).

Nell'originale:

Il termine paziente significava originariamente "colui che soffre". Questo nome inglese deriva dalla parola latina *patiens*, participio presente del verbo deponente patior, che significa "sto soffrendo", ed è affine al verbo greco πάσχειν (= *paskhein*, soffrire) e al suo sostantivo cognato πάθος (= pathos).

Rete di medicina:

<https://www.medicinenet.com/patient/definition.htm>

Paziente: persona che riceve cure mediche. La persona può essere in attesa di questa assistenza, può riceverla o averla già ricevuta. C'è molto disaccordo sull'esatto significato del termine "paziente".

- È variamente definita, ad esempio come:
- Una persona che necessita di cure mediche.
- Una persona che riceve cure o trattamenti medici o dentistici.
- Una persona in cura da un medico per una particolare malattia o condizione.
- Una persona in attesa o sottoposta a trattamenti o cure mediche
- Una persona che riceve servizi professionali necessari forniti da un operatore sanitario autorizzato per mantenere, migliorare o proteggere la salute.

o per alleviare malattie, disabilità o dolori. (Centri statunitensi per i servizi Medicare e Medicaid)

- Un soldato ammalato, ferito o ferito che riceve assistenza o cure mediche da parte di personale specializzato. (Comando medico dell'esercito USA)

Dal verbo latino "patior" che significa "soffrire", sia nel senso di provare dolore sia nel senso di sopportare con pazienza. I due usi della parola "paziente" - come sostantivo che significa "uno che soffre" e come aggettivo che significa "sopportare con tolleranza" - risalgono quindi alla stessa origine.

Nell'originale:

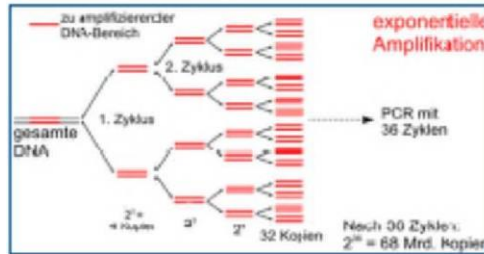
Paziente: persona sottoposta a cure sanitarie. La persona può essere in attesa di questa assistenza, può riceverla o averla già ricevuta. C'è una notevole mancanza di accordo sul significato preciso del termine "paziente".

È definito in modo diversificato, ad esempio:

- Una persona che necessita di cure mediche.
- Una persona che riceve cure o trattamenti medici o dentistici.
- Persona sottoposta alle cure di un medico per una particolare malattia o condizione.
- Una persona in attesa o sottoposta a cure e trattamenti medici
- Un individuo che riceve servizi professionali necessari, diretti da un operatore autorizzato delle arti curative al mantenimento, al miglioramento o alla protezione della salute o alla riduzione della malattia, della disabilità o del dolore. (Centri statunitensi per i servizi Medicare e Medicaid)
- Un soldato ammalato, ferito o ferito che riceve assistenza o cure mediche da parte di personale specializzato. (Comando medico dell'esercito USA)

Dal verbo latino "patior" che significa "soffrire" sia nel senso di provare dolore sia nel senso di sopportare. Pertanto, i due usi della parola "paziente" - come sostantivo che indica "qualcuno che soffre" e come aggettivo che significa "sopportare con pazienza" - derivano dalla stessa origine.

0-r-;-:-y_m_e_-a-se---K-ett_e_r_e_a-kt_i_o_____

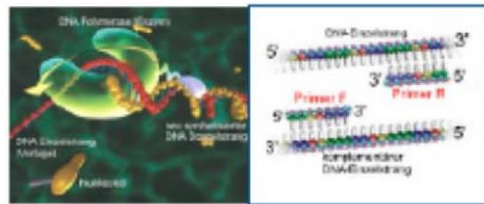


Polymerase-Kettenreaktion (PCR)?

Mit **PCR** (engl. polymerase chain reaction) wird ein vorbestimmter Abschnitt einer Erreger-DNA vervielfältigt. Als «Kopiermaschine» braucht es ein Enzym namens **Polymerase**, welches in einer Kettenreaktion aus sich wiederholenden Temperatur-Zyklen den gewünschten DNA-Abschnitt immer wieder verdoppelt und so eine messbare DNA-Menge generiert.

Vorteile: In 45 min können in einem Volumen von 20-50 µl **fin**o a rell e-ger nachgewiesen werden.

Nachteile: Es können nur Erreger nachgewiesen werden, deren Gen-Sequenz bekannt ist. Ob ein Erreger infektiös (virulent, «lebendig») ist oder nicht bleibt unbekannt.



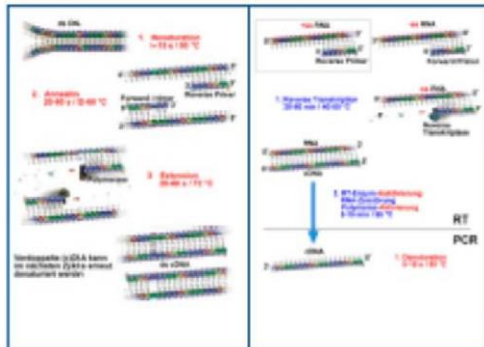
DNA-Polymerase und Oligonukleotide

Für die Vervielfältigung der DNA (**Amplifikation**) wird das Enzym **DNA-Polymerase** benötigt. Als Vorlage dient ein DNA-Einzelstrang des nachzuweisenden Erregers. Die passenden Nukleotide (dNTPs) werden durch die DNA-Polymerase zum Komplementärstrang verbunden.

Die DNA-Polymerase bindet aber nur dort an den DNA-Einzelstrang, wo eine kurze Doppelstrangstruktur als Startpunkt vorliegt. Dieser wird in der PCR mit der Zugabe von **Primer** bestimmt, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt definieren.

Ein Primer ist ein kurzes DNA-Stück bestehend aus 15-30 Nukleotiden, ein so genanntes **Oligonukleotid**. Für beide komplementären DNA-Einzelstränge des Erregers wird je ein Primer (Forward (F) & Reverse (R)) mit Hilfe von Softwares festgelegt.

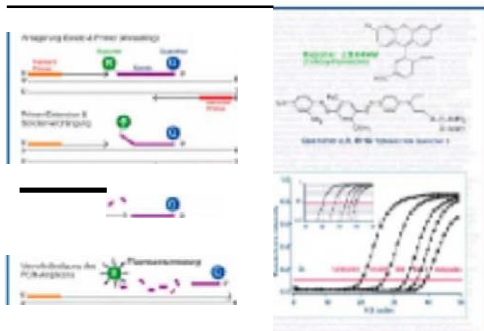
Die dazu benötigte DNA-Sequenz des nachzuweisenden Erregers wird im Internet aus öffentlichen Datenbanken kopiert. Die Oligonukleotide werden über Internet bei spezialisierten Firmen bestellt und synthetisiert.



PCR & RT-PCR – Die Kettenreaktion

Die PCR besteht aus einer Serie (Kettenreaktion) von 30 bis 45 Temperatur-Zyklen und wird in einem Thermocycler durchgeführt. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

- **Denaturierung:** Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA auf 95 °C erhitzt um die Stränge zu trennen. Es stehen zwei Vorlagen (Matrizen).
- **Annealing** (Anlagerung): Die Temperatur wird Primer-abhängig gesenkt damit sich die spez. Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern können.
- **Extension** (Elongation): Die DNA-Polymerase bindet bei 60°C an die kurzen doppelsträngigen Bereiche und repliziert den komplementären Strang. Da die Genome vieler Virenarten aus RNA bestehen, muss diese für die PCR zuerst in DNA umgeschrieben werden. Dieser Vorgang wird **Reverse Transkription (RT)** genannt und kann im selben Ansatz der PCR vorgeschaltet werden.



Quantitative real-time PCR

Bei der real-time PCR findet zusätzlich eine **Quantifizierung** des amplifizierten DNA-Abschnittes statt. Dazu werden nach jedem PCR-Zyklus **Fluoreszenz**-Messungen durchgeführt, wobei die **ZIJ** meder kopierten DNA mit der Zunahme der Fluoreszenz korreliert.

Als Fluoreszenz-Quelle können DNA-Farbstoffe (z.B. **SYBR Green**) verwendet werden, welche nur mit doppelsträngige DNA interkalieren (binden). Nach Annealing kann deren zunehmende Fluoreszenz gemessen werden. Es kann jedoch nicht zwischen spez./unspez. PCR-Produkten unterschieden werden.

Eine spezifischere Methode beruht auf den Zusatz einer zwischen den Primer liegenden Sonde (z.B. **TaqMan**). Diese ist an den Enden mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (R), und einem Fluoreszenz-absorbierenden Quencher (Q) markiert.

Durch Verwendung einer speziellen DNA-Polymerase mit **5'-3'-Exonuklease-Aktivität**, wird die Sonde während der Synthese des Gegenstranges w m 5'-Ende her abgebaut, wodurch Quencher und Fluorophor voneinander ent werden. Die steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden.

VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit

It has a detection limit of ≥ 10 RNA copies per reaction for **ORF1ab** and **N genes** (Figures 1 and 2).

Questo test ha un limite di rilevazione di ≥ 10 copie di RNA per reazione per i geni ORF 1ab e N (Figure 1 e 2).

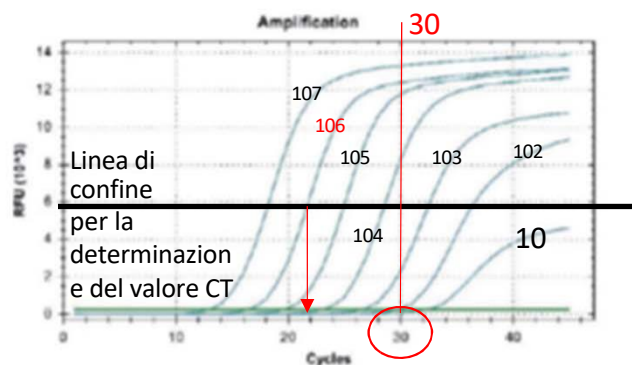


Figure 1.

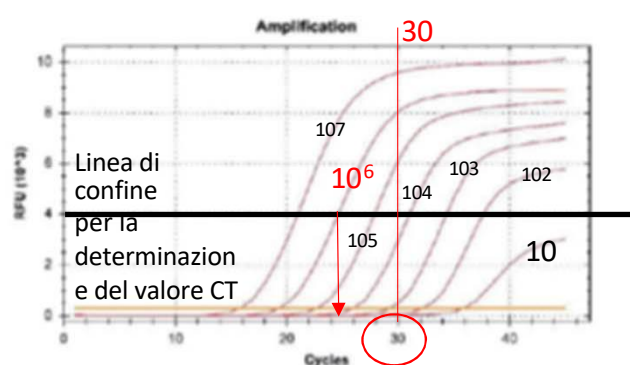


Figure 2.

Figure 1. Dilution series of ORF1ab gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (FAM channel).

Figure 2. Dilution series of N gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (ROX channel).

Per questo tipo di kit per il test Viasure, è possibile rilevare meno di 10^4 copie di RNA con il gene target ORF1ab (Figura 1) e meno di 10^5 copie di genoma con il gene N (Figura 2) con un CT di 30 (cerchio rosso, valore massimo del CT in base alle informazioni contenute nella perizia scritta).

Secondo l'RKI, almeno 10^6 RNA-copie/ml corrisponde a una correlazione plausibile con l'infettività (rilevamento del virus infettivo nella coltura cellulare).

Questo numero di copie è visibile in questo caso con un CT inferiore a 22 per il gene ORF1ab (Figura 1, freccia) e inferiore a 25 per il gene N (Figura 2, freccia).

Un CT di 30 o superiore come criterio di "infettività" è quindi ben oltre il limite reale e le specifiche del test, questo è comparabile per tutti i kit di analisi commerciali

Carica virale e cinetica di shedding del SARS-CoV-2

Olha Puhach¹ Benjamin Meyer² Isabella Eckerle^{1,4} 

Astratto

La carica virale del SARS-CoV-2 e la rilevazione del virus infettivo nel tratto respiratorio sono i due parametri chiave per stimare l'infettività. Poiché lo shedding del virus infettivo è necessario per la trasmissione successiva, la comprensione delle caratteristiche dello shedding è importante per gli interventi di salute pubblica. Lo shedding virale è influenzato dalle caratteristiche biologiche del virus, dai fattori dell'ospite e dall'immunità preesistente (infezione precedente).

vaccinazione) dell'individuo infetto. Sebbene il processo di trasmissione da uomo a uomo sia multifattoriale, la carica virale ha contribuito in modo sostanziale alla trasmissione da uomo a uomo, con una carica virale più elevata che rappresenta un rischio maggiore per la trasmissione successiva. Le varianti emergenti del SARS-CoV-2 hanno complicato ulteriormente il quadro della diffusione del virus. Poiché l'immunità di base nella popolazione, grazie a un'infezione precedente, alla vaccinazione o a una combinazione di entrambi, è aumentata rapidamente su scala globale dopo quasi 3 anni di pandemia, le modalità di diffusione virale sono diventate più distinte da quelle del SARS-CoV-2 ancestrale. La comprensione dei fattori e dei meccanismi che influenzano la diffusione del virus infettivo e il periodo in cui gli individui infettati con il SARS-CoV-2 sono contagiosi è fondamentale per guidare le misure di salute pubblica e limitare la trasmissione.

Inoltre, gli strumenti diagnostici per dimostrare la presenza di virus infettivi da campioni diagnostici di routine sono necessari.

Sezioni

Introduzione

Misurazione della carica virale del SARS-CoV-2

Carico virale e dinamiche di shedding

Trasmissione della SARS-CoV-2

Diagnostica della SARS-CoV-2 nella sanità pubblica

Conclusioni

¹Dipartimento di Medicina, Facoltà di Medicina, Università di Ginevra, Ginevra, Svizzera. ²Centro di vaccinologia, Dipartimento di patologia e immunologia, Università di Ginevra, Ginevra, Svizzera. ³Centro di Ginevra per le malattie virali emergenti, Ospedali universitari di Ginevra, Ginevra, Svizzera. ⁴Divisione di Malattie Infettive, Ospedali Universitari di Ginevra, Ginevra, Svizzera. e-mail: Isabella.Eckerle@unige.ch

Articolo di recensione

Introduzione

Alla fine del 2019 è emerso un nuovo coronavirus, in seguito denominato coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2), che è l'agente causale della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19). Il SARS-CoV-2 colpisce principalmente le cellule multiciliate del tratto respiratorio superiore (URT), ma è stato segnalato che infetta anche cellule al di fuori dell'URT.¹ Può diffondersi alle basse vie respiratorie (LRT), dove infetta gli alveoli, portando a una riduzione degli scambi gassosi, all'infiammazione e a patologie polmonari tipiche della COVID-19 (rif.²). Le persone infette diffondono il virus attraverso l'URT, con l'emissione del virus infettivo che porta alla trasmissione secondaria e quindi a un'ulteriore diffusione del virus.

A causa della loro presentazione clinica non specifica, sono necessari strumenti diagnostici precisi per identificare le infezioni da SARS-CoV-2. I test specifici di PCR in tempo reale (RT-PCR) sono stati rapidamente disponibili dopo la comparsa del virus, seguiti poi dai test diagnostici rapidi (Ag-RDT) e dai test sierologici. **Sebbene il rilevamento di**

L'RNA virale in campioni respiratori tramite RT-PCR è altamente sensibile e

specifico, non distingue tra virus compatibili con la replicazione e l'RNA residuo. In assenza di un test diagnostico, l'infettività viene spesso stabilita utilizzando una delle due proxy: la presenza di RNA virale al di sopra di un valore di soglia di ciclo (Ct) definito, o un Ag-RDT positivo. La RT-PCR è uno strumento utile per la diagnosi iniziale, mentre gli Ag-RDT possono servire come indicatore per porre fine al periodo di isolamento. **Questo perché la viralità**

L'RNA (che verrebbe rilevato dalla RT-PCR) rimane rilevabile in la presenza di un virus infettivo, mentre la positività degli Ag-RDT si correla meglio con la presenza di un virus infettivo.

Oltre che nel tratto respiratorio, l'RNA del SARS-CoV-2 è stato rilevato nel sangue periferico, nelle feci, nelle urine e nelle secrezioni oculari.³⁻⁷ L'isolamento del virus da campioni non respiratori non ha avuto successo nella maggior parte degli studi.^{4,8,9} con pochissimi casi segnalati di presenza di virus infettivi in campioni non respiratori.¹⁰⁻¹³ Inoltre, le cariche virali provenienti da campioni del tratto respiratorio sono risultate molto più elevate rispetto ad altri materiali, questi ultimi spesso con cariche virali di RNA incompatibili con la presenza di virus infettivi. Tali campioni non sono considerati rilevanti per la trasmissione e pertanto ci concentriamo sullo spargimento del virus SARS-CoV-2 solo attraverso le vie respiratorie.

In questa sede, abbiamo chiarito la relazione tra la carica virale della SARS-CoV-2 e la presenza del virus infettivo, i fattori biologici e dell'ospite che determinano lo shedding del virus infettivo, la misurazione del virus infettivo e il ruolo che la diagnostica può avere come proxy dello shedding del virus infettivo.

Misurazione della carica virale del SARS-CoV-2

Il gold standard per la diagnosi di laboratorio di un'infezione delle vie respiratorie.

è la dimostrazione dell'RNA virale con una (semi)quantificazione specifica del virus.

RT-PCR **tativa da materiale raccolto dal tratto respiratorio.** I materiali più comunemente utilizzati sono i tamponi prelevati dalla rinofaringe o dall'orofaringe, ma sono stati proposti anche tamponi della cavità nasale, saliva o soluzione liquida gargarizzata come materiali alternativi, con il vantaggio di essere una procedura meno disagiata per il partecipante. La carica virale determinata mediante

RT-PCR è espressa come numero di copie di RNA virale per millilitro di terreno di trasporto virale o per tampone, oppure dal valore Ct arbitrario specifico del test. Al contrario, l'infettività è determinata dalla valutazione qualitativa o quantitativa del virus infettivo in un campione clinico attraverso la replicazione del virus in coltura cellulare. Le limitazioni alla misurazione dello shedding virale sono descritte nel riquadro 1. In questa revisione, ci riferiamo alle particelle virali che possono causare l'infezione come virus infettivo e ai livelli di RNA virale (ampiamente utilizzati come surrogati del virus infettivo) come carica virale.

Articolo di

Il gold standard per determinare la presenza di un'infezione (cioè di una malattia infettiva), competente per la replicazione) nei campioni respiratori è il recupero di virus in coltura cellulare, una procedura che viene comunemente definita "virus isolamento" (Fig. 1).

Nel caso del SARS-CoV-2, per l'isolamento del virus si possono utilizzare diverse linee cellulari e cellule primarie, comprese quelle che esprimono l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2; il recettore necessario per l'ingresso del virus) o la proteasi transmembrana 2 (TMPRSS2; anch'essa importante per l'ingresso del virus).¹⁴. Una linea cellulare derivata da cellule di rene di scimmia verde africana, Vero E6, è comunemente utilizzata per l'isolamento, la propagazione e la titolazione del virus.¹⁵. Altre linee cellulari umane che sono state utilizzate con successo per l'isolamento del SARS-CoV-2 sono una linea cellulare di adenocarcinoma coloretale (Caco-2), una linea cellulare di adenocarcinoma polmonare (Calu-3), una linea cellulare di adenocarcinoma polmonare che sovraesprime ectopicamente l'ACE2 (A549) e una linea cellulare di carcinoma epatocellulare umano (Huh7).^{16,17}.

La presenza del virus infettivo nella coltura cellulare viene valutata qualitativamente con la microscopia ottica, che può essere utilizzata per identificare le cellule che subiscono gli effetti citopatici (e la morte) causati dall'infezione da SARS-CoV-2, che consistono nella formazione di sincizi, nell'arrotondamento delle cellule, nel distacco e nella degenerazione.¹⁷. L'infezione viene solitamente confermata con un secondo metodo, o con una RT-PCR specifica per l'RNA virale dal surnatante delle cellule infette, che indica la replicazione del virus attraverso un aumento della carica virale nel tempo rispetto al campione di riferimento, o con l'immunocolorazione per le proteine virali.^{15,18}.

Questa misurazione qualitativa della presenza del virus non è tuttavia in grado di quantificare i virioni infettivi nei campioni inoculati, sebbene i campioni con una carica virale inferiore mostrino comunemente uno sviluppo ritardato dell'effetto citopatico.¹⁹. Per quantificare il virus infettivo in un campione di paziente si possono invece utilizzare metodi come i saggi a placca, i saggi di formazione di focus o la dose infettiva da coltura tissutale del 50% (TCID₅₀).

Le metodologie sopra descritte sono strumenti affidabili per rilevare il virus infettivo nei campioni clinici di individui infetti da SARS-CoV-2, anche se presentano delle limitazioni. La rilevazione di particelle virali vitali è fortemente influenzata dalla qualità del campione e le particelle virali infettive possono perdere rapidamente la loro infettività in condizioni di conservazione non idonee. Per preservare il virus infettivo nei campioni, i campioni di tampone di pazienti infettati con SARS-CoV-2 devono essere immediatamente immersi in un terreno di trasporto virale adatto alla coltura cellulare e conservati a -80 °C il prima possibile dopo il prelievo. L'esposizione prolungata a temperature più elevate o a ripetuti cicli di congelamento e scongelamento può influenzare drasticamente la qualità del campione, portando alla perdita potenzialmente completa delle particelle virali infettive. Pertanto, molti fattori possono influenzare la riproducibilità dei risultati tra diversi laboratori. Inoltre, le linee cellulari utilizzate per l'isolamento possono mostrare un'elevata variabilità tra i laboratori anche quando sono presumibilmente le stesse. Anche i materiali di consumo utilizzati durante la coltura cellulare, come il terreno di coltura o gli additivi come il siero fetale bovino e gli antibiotici, possono potenzialmente influire sul successo dell'isolamento del virus. Nelle cellule epiteliali primarie delle vie aeree umane, che imitano il sito primario di ingresso nel tratto respiratorio umano, la probabilità di isolare il virus infettivo era ridotta rispetto a quella delle cellule Vero E6, indicando che il virus infettivo determinato utilizzando le cellule Vero E6 potrebbe

essere sovrastimato per valutare i rischi di trasmissione in vivo.²⁰.

È importante notare che tutte le colture cellulari con il SARS-CoV-2 vengono effettuate in condizioni di biosicurezza di livello 3, quindi solo personale appositamente formato in laboratori con infrastrutture avanzate può eseguire questi esperimenti. Pertanto, la rilevazione di virus vitali attraverso l'isolamento del virus non è adatta alla diagnostica ed è limitata alla ricerca.

Scatola 1

Limiti della misurazione della carica virale

Sito di selezione dei campioni

Il sito anatomico scelto per raccogliere il campione di tampone per la rilevazione della SARS-CoV-2 potrebbe influenzare la rilevazione della carica virale. È stata riportata una carica virale di RNA più elevata dai tamponi nasofaringei rispetto a quelli orofaringei.^{28,124,181} Di conseguenza, i campioni nasofaringei mostrano la massima accuratezza diagnostica rispetto agli altri campioni del tratto respiratorio superiore.¹⁸² Allo stesso modo, è stato riportato un maggiore successo nell'isolamento del virus dai tamponi nasofaringei rispetto a quelli salivari, nasali o sublinguali.¹²⁴ Tuttavia, un altro studio ha rilevato cariche virali di RNA più elevate nella gola e nell'espettorato rispetto ai tamponi nasali.³⁰ Due studi indicano che il virus può essere individuato più precocemente nella gola²⁹ o saliva³³ ma raggiunge livelli significativamente più elevati e rimane rilevabile più a lungo nel naso.^{29,33} Una meta-analisi, che ha valutato diversi metodi di campionamento clinico utilizzando il tampone nasofaringeo come riferimento, ha dimostrato che i tamponi nasali e della gola in pool hanno mostrato le migliori prestazioni diagnostiche.¹⁸³ In particolare, questa analisi ha rivelato una maggiore eterogeneità dei risultati negli studi che hanno utilizzato campioni nasali o salivari rispetto a quelli che hanno utilizzato tamponi nasali e della gola in pool.¹⁸³

L'effetto del metodo di prelievo del tampone (autosomministrato o eseguito da una persona addestrata) sulle cariche virali misurate non può essere trascurato: la sensibilità dei test diagnostici di rilevamento dell'antigene (rapidi) ottenuti dagli operatori sanitari è risultata superiore a quella dei test autodiagnostici.^{57,184}

Impatto della cinetica di infezione individuale

Ad oggi, esiste un numero limitato di studi che descrivono la dinamica longitudinale dello shedding del SARS-CoV-2.^{29,33} La maggior parte di questi studi hanno utilizzato un solo momento per raccogliere i tamponi respiratori dai soggetti infetti per la misurazione della carica virale.

Rilevazione della carica virale di RNA

Le tecniche per la rilevazione dell'RNA virale mediante RT-PCR sono state rapidamente messe a punto all'inizio della pandemia.^{21,22} (Fig. 1). L'elevata specificità e sensibilità della RT-PCR ne fanno il gold standard per la diagnosi della SARS.

Infezioni da CoV-2. I saggi RT-PCR quantitativi forniscono un valore Ct, che è inversamente correlato alla concentrazione dell'RNA virale target nel campione clinico (cioè, più alto è il valore, minore è l'RNA target nel campione). Utilizzando uno standard esterno con un numero definito di copie di RNA, i valori Ct possono essere trasformati in numeri assoluti di copie di RNA virale o in unità internazionali per millilitro di terreno di trasporto virale o per tampone totale.

Sebbene la RT-PCR non sia in grado di determinare direttamente

Di conseguenza, i diversi tempi di insorgenza dei sintomi possono essere un fattore confondente quando si confronta la carica virale tra diversi pazienti, il che potrebbe anche spiegare la variazione dei dati disponibili sulla carica virale.

Influenza del periodo epidemico

Le cariche virali di RNA nei campioni raccolti in singoli punti temporali sono risultate indicare la traiettoria dell'epidemia, in quanto un'alta percentuale di individui infettati di recente con valori di soglia di ciclo bassi è correlata a un numero di riproduzione più elevato, indicativo di un'epidemia in crescita.¹⁸⁵ Allo stesso modo, l'ascesa e il declino di La carica virale dell'RNA è correlata al numero di casi di COVID-19 e di ricoveri ospedalieri nella popolazione, come è stato identificato utilizzando la misurazione dell'RNA del SARS-CoV-2 in campioni di acque reflue.¹⁸⁶ Inoltre, la variazione nelle stime del periodo medio di incubazione è stata più breve prima del picco epidemico in Cina che dopo il picco stesso.¹⁸⁷ Pertanto, il campionamento in singoli punti temporali può essere influenzato dal periodo epidemico e potrebbe riflettere più le dinamiche epidemiologiche che le cinetiche di diffusione individuali.

Influenza della variante SARS-CoV-2 che desta preoccupazione

I dati disponibili sulle varianti di SARS-CoV-2 che destano preoccupazione hanno dimostrato che, sebbene il modello generale della dinamica della carica virale sia conservato tra le varianti, l'infezione con diverse varianti di SARS-CoV-2 che destano preoccupazione ha portato a quantità di virus infettivo e cariche virali di RNA altamente distinte.^{25,86,87,90,92,94} e le variazioni del periodo di incubazione della SARS-CoV-2.¹¹³ Pertanto, l'estrapolazione delle nostre conoscenze dallo shedding delle varianti attuali o precedenti del SARS-CoV-2 alle varianti emerse di recente può avere un valore limitato.

L'infettività a causa di alla sua incapacità di distinguere tra replicazione-competente (infect-virus) e l'RNA virale residuo (non infettivo), una correlazione con l'RNA residuo. tra la carica virale di RNA e la presenza di virus infettivo è stata cercata. Diversi studi hanno cercato di correlare la quantità di RNA virale con l'infettività isolando il virus in un intervallo di valori di Ct. In effetti, si è verificata una diminuzione graduale della probabilità di isolamento del virus con l'aumento dei valori di Ct nei campioni raccolti nei primi 8 giorni dopo l'inizio dei sintomi (dpos).^{18,23} Tuttavia, altri Gli studi hanno rilevato che la correlazione tra virus infettivo e La carica virale dell'RNA era bassa e che la carica virale (o i valori Ct come proxy) è solo

Articolo di recensione

un risultato predittivo della presenza del virus infettivo nei primi 5 giorni di vita.^{4,28,24,29} Inoltre, quando si prende come soglia un certo valore di Ct o il numero di copie di RNA, non è possibile determinare se la carica virale di RNA stia aumentando o stia già diminuendo; pertanto, una bassa carica virale potrebbe essere misurata alla fine dell'infezione o nella fase iniziale (pre)sintomatica prima di raggiungere il picco di carica virale.

In un contesto diagnostico di routine, la sensibilità analitica e i limiti di rilevazione possono variare tra i test e i laboratori in cui vengono applicati. Un confronto analitico delle prestazioni tra diversi

I saggi di RT-PCR hanno mostrato una variazione tra i valori Ct misurati e

il tasso di rilevamento²⁶. Pertanto, l'applicazione di standard di RNA e il calcolo del numero di copie del genoma dell'RNA basato su una curva standard possono migliorare la comparabilità tra i laboratori e le analisi. Per facilitare la calibrazione e il controllo delle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici,

uno standard internazionale con potenza assegnata sotto forma di u n a

isolato inattivato di SARS-CoV-2 è stato introdotto dalla World

H e a l t h

Organizzazione (OMS)²⁷.

Come per il rilevamento del virus infettivo, diversi altri parametri possono influenzare la possibilità di rilevare la carica virale. La sede di raccolta dei campioni può influire sui risultati relativi alla carica virale; sebbene alcuni studi riportino una carica virale di RNA più elevata nei tamponi nasali o nasofaringei^{28,29} altri mostrano una carica virale di RNA più elevata nei campioni di gola.³⁰ Inoltre, il trasporto

Articolo di recensione

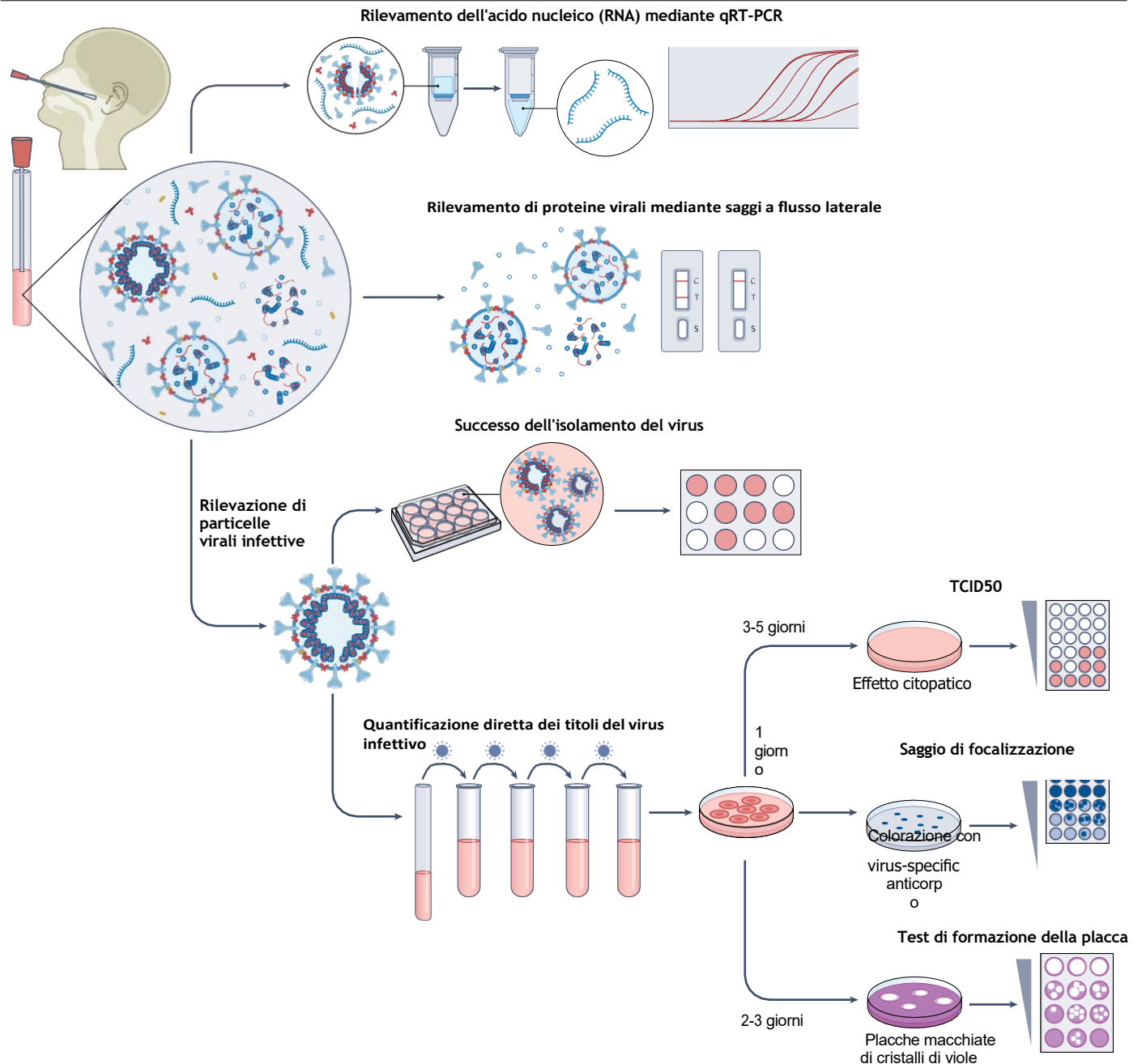


Fig. 1 | Metodi di misurazione della carica virale di virus e RNA infettivi.

Per la rilevazione delle cariche virali della SARS-CoV-2 si utilizzano campioni di tampone prelevati dal rinofaringe o dall'orofaringe. La rilevazione degli acidi nucleici virali (RNA) viene effettuata mediante PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR). L'RNA virale viene estratto dal virus lisato, trascritto in modo inverso e amplificato mediante qPCR utilizzando primer specifici per una o più regioni target del genoma virale. Il ciclo di amplificazione in cui i campioni attraversano la soglia (soglia di ciclo) definisce la quantità di RNA virale. La carica virale di RNA può essere espressa come numero di copie di RNA virale per millilitro o come valore soglia del ciclo specifico del test. I saggi a flusso laterale rilevano la presenza di specifiche proteine virali nelle particelle virali lisate. Il nucleocapside del SARS-CoV-2 è utilizzato nella

maggior parte dei test diagnostici rapidi (antigen-detecting). La presenza di virus infettivo (compatibile con la replicazione) nei campioni respiratori può essere determinata solo dal recupero del virus in coltura cellulare mediante isolamento o dalla quantificazione dei titoli di virus infettivo utilizzando colture di tessuto infettive al 50%.

Articolo di recensione

(TCID₅₀) e saggi di formazione di focolai o saggi di formazione di placche.

L'isolamento del virus viene effettuato applicando il terreno infettivo sul monostrato di cellule; il successo dell'isolamento è determinato dalla presenza di un effetto citopatico approssimativo.

3-5 giorni dopo l'infezione. Il colore bianco indica la presenza di un effetto citopatico nelle cellule. Per la quantificazione dei titoli virali infettivi, vengono eseguite diluizioni seriali dei campioni respiratori e utilizzate per l'inoculazione sul monostrato di cellule. In TCID₅₀, 3-5 giorni dopo l'infezione, l'effetto citopatico indotto dal virus è

classicamente definiti con la microscopia. Nei saggi di formazione di focolai, le cellule vengono fissate 1 giorno dopo l'infezione e viene eseguita

l'immunocolorazione con anticorpi specifici per il virus per rilevare gruppi di cellule infette (focolai). I focolai, che indicano la presenza del virus infettivo, sono visualizzati in blu. Nei test di formazione di placche, le piastre vengono fissate 2-3 giorni dopo l'infezione e colorate con cristalvioletto; i pozzetti con le singole placche vengono utilizzati per determinare i titoli virali. Le placche, che indicano la presenza

del virus infettivo, sono visualizzati in bianco.

Articolo di recensione

I supporti utilizzati per il campione, le condizioni di conservazione e la qualità del campione possono influenzare ulteriormente la rilevazione dell'RNA virale e la loro utilità e i limiti nell'estrapolazione della potenziale infettività.

Sebbene le nuove varianti abbiano avuto un impatto su alcuni bersagli genici, nella maggior parte dei casi non hanno avuto un effetto rilevante sulla diagnostica molecolare, grazie all'uso di saggi a doppio bersaglio (in cui vengono rilevati almeno due geni virali contemporaneamente).³¹.

Test diagnostici rapidi per la rilevazione dell'antigene

La maggior parte dei test a flusso laterale è progettata per rilevare la proteina nucleocapside del SARS-CoV-2, come proxy del virus infettivo, in tam

maggior parte degli studi sulla rilevazione di Ag-RDT mostra una buona concordanza con la positività della RT-PCR quando i valori Ct sono inferiori a 25-30,

una carica virale compatibile con la presenza del virus infettivo, mentre valori di Ct più elevati danno risultati meno affidabili^{34,37-41}.

I primi momenti dell'infezione spesso danno risultati negativi con l'Ag-RDT in soggetti che sono risultati positivi alla PCR.^{29,42}. In media, i primi risultati positivi all'Ag-RDT si ottengono circa 1-2 giorni dopo i risultati positivi alla PCR.³⁷ mentre la sensibilità più elevata nei pazienti è stata mostrata durante i primi 7 dpos negli studi con SARS-CoV-2 ancestrale (rif. ⁴²⁻⁴⁴). I test antigenici mostrano la massima sensibilità per i campioni contenenti virus infettivi e con valori di Ct inferiori a 25 (rif. ⁴⁵⁻⁴⁹), e la loro positività è altamente correlata alla presenza di virus infettivo^{34,45,47,50}. Al contrario, gli Ag-RDT sono meno sensibili alle basse cariche virali di RNA (che hanno valori Ct più elevati).⁵¹. Diversi studi hanno dimostrato una forte correlazione tra la positività all'Ag-RDT e il periodo in cui è possibile rilevare il virus infettivo, indicando che gli Ag-RDT possono aggiungere un ulteriore livello di sicurezza per decidere quando porre fine all'isolamento.^{29,39}.

Tuttavia, sono state rilevate alcune incongruenze tra gli studi e i test. Ad esempio, sono stati segnalati (in una serie di studi e di Ag-RDT) casi di mancata rilevazione di antigeni virali in campioni con un basso valore Ct e/o contenenti virus infettivi (oltre la fase acuta iniziale).^{46,50}. Inoltre, raramente sono stati segnalati casi di Ag-RDT che rimangono positivi dopo più di 10 giorni.^{42,46,50}. Poiché la maggior parte degli studi non è riuscita a isolare il virus infettivo dopo più di 10 dpos, non è chiaro se la positività all'Ag-RDT oltre i 10 dpos sia correlata allo shedding del virus infettivo. Uno studio ha dimostrato che i test antigenici predicono l'infettività in modo più accurato a 1-5 dpos, rispetto a 6-11 dpos.⁵². In particolare, c'è stata una buona correlazione tra la positività all'Ag-RDT e l'isolamento del virus infettivo entro i primi 11 dpos.⁵².

Sono stati riscontrati risultati contrastanti per quanto riguarda la sensibilità e la specificità degli Ag-RDT per la rilevazione delle varianti di SARS-CoV-2, con ampie variazioni tra i produttori, il tipo di ambiente in cui gli Ag-RDT sono stati utilizzati (autotest rispetto a test raccolti da un operatore sanitario) e il tipo di campione utilizzato per la rilevazione (nasale rispetto a orale).⁵³⁻⁵⁷. Con l'aumento dell'immunità ibrida e la presenza di anticorpi mucosali, gli Ag-RDT possono perdere ulteriormente sensibilità.⁵⁸.

Carico virale e dinamiche di shedding

Le cariche virali sono utilizzate come proxy per caratterizzare lo shedding virale infettivo. Il tempo esatto in cui gli individui rimangono infettivi è difficile da stimare ed è probabile che vari da

un paziente all'altro. Fattori virali, come la variante virale, e fattori dell'ospite, come l'età, il sesso e lo stato immunitario del paziente, influenzano la dinamica dello shedding.

La carica virale come determinante dello shedding virale

Dopo la comparsa della SARS-CoV-2 alla fine del 2019, i primi dettagli sulla carica virale e sullo shedding del virus infettivo sono stati misurati in un cluster di infezioni che si è verificato nel gennaio 2020 in Germania, valutando

Articolo di recensione

nove individui immunocompetenti con un decorso lieve della malattia il picco delle cariche virali di RNA è stato raggiunto nel periodo sintomatico iniziale a 5 dpos, un dato confermato da altri studi. ^{4,7,28,59} È stato riportato il picco delle cariche virali al momento dell'insorgenza dei sintomi o anche poco prima. ^{4,7,28,59}. Le cariche virali di RNA sono diminuite gradualmente nel corso della malattia nei tamponi nasofaringei e della gola, raggiungendo livelli bassi o non rilevabili 2 settimane dopo l'inizio dei sintomi. ^{4,23,59,60} (Fig. 2). La diminuzione della carica virale di RNA è associata alla risoluzione dei sintomi clinici e al graduale aumento dei titoli anticorpali, sia per gli anticorpi leganti che per quelli neutralizzanti. ^{18,23}. Tuttavia, è stata descritta la rilevazione continua di RNA virale per periodi prolungati fino a 28 dpos in individui altrimenti sani. ⁶¹ e alcuni studi hanno riportato la rilevazione di bassi livelli di RNA mediante RT-PCR anche per mesi. ⁶². I partecipanti che continuano a rilasciare RNA virale per più di 4 settimane dopo la rilevazione iniziale mediante RT-PCR rappresentano una minoranza di casi non gravi, stimati rispettivamente intorno al 3%, 14% e 14%. ⁶³, 14% ⁶⁴ o meno del 20% ⁶⁵. È stato riportato che lo spargimento del virus infettivo del ceppo ancestrale della SARS-CoV-2, determinato mediante isolamento del virus in coltura cellulare, è correlato a un'elevata carica virale di RNA nella fase acuta iniziale dopo la comparsa dei sintomi. ²³. È importante notare che il campionamento longitudinale giornaliero di campioni respiratori di individui con malattia lieve o infezione asintomatica ha rivelato che il virus infettivo può essere rilevato già prima dell'insorgenza dei sintomi. ³³. L'isolamento del virus infettivo è stato riportato con successo entro i primi 8-10 dpos, ma la probabilità di coltura dopo questo periodo di tempo è rapidamente diminuita. ^{4,7,23,29,66,67}. Gli studi che hanno valutato quantitativamente il virus infettivo hanno riscontrato che i titoli del virus infettivo sono diminuiti nei primi 10 giorni. ^{25,29}. Inoltre, una ridotta possibilità di isolamento del virus coincideva con il momento della sierconversione nei pazienti ospedalizzati e, di conseguenza, il virus infettivo non poteva più essere isolato dai pazienti sierconvertiti con titoli anticorpali rilevabili. ^{18,68,69}. Sebbene manchino studi analoghi di sierconversione condotti su pazienti lievemente sintomatici, il numero di individui immunologicamente naive è in calo e questa situazione è ampiamente esistente. L'immunità sottostante rende tale valutazione più complessa.

La maggior parte degli studi sullo shedding del virus infettivo nel periodo sintomatico acuto è stata condotta su pazienti immunocompetenti con malattia lieve o moderata, che rappresentano la maggior parte dei casi di COVID-19 nella comunità. Pertanto, la valutazione della presenza del virus infettivo nell'URT, ricavata da questi studi, è stata utilizzata per definire la durata del periodo di contagiosità e ha contribuito alle migliori pratiche di sanità pubblica per l'isolamento e la quarantena. ^{62,70}. Sebbene il modello di infezione sia sostanzialmente simile nei pazienti con malattia lieve e grave, esistono differenze fondamentali. La prima settimana di malattia è paragonabile in termini di carica virale di RNA tra pazienti con malattia lieve e grave. Tuttavia, i pazienti con malattia grave presentano cariche virali di RNA elevate nella seconda settimana di malattia e l'RNA è stato rilevato per periodi prolungati. ⁷¹. Inoltre, il virus infettivo è stato recuperato da pazienti ospedalizzati per periodi prolungati, fino a 32 dpos. ^{18,72,73} Tuttavia, il tempo mediano dall'insorgenza dei sintomi alla clearance virale in coltura era simile a quello dei pazienti con malattia lieve o moderata. ^{18,73}. La COVID-19 grave è caratterizzata anche da una carica virale di RNA elevata e persistente nell'LRT, mentre i casi non gravi hanno cariche virali simili nell'URT e nell'LRT. ⁷⁴.

Il rilevamento prolungato dell'RNA virale è stato segnalato anche in pazienti immunocompromessi; ad esempio, 224 giorni dopo l'inizio dell'infezione, il virus è stato ancora rilevato in un uomo infettato dall'HIV, compreso il rilevamento di RNA subgenomico (sgRNA) che indica una replicazione virale attiva. ⁷⁵. Inoltre, il virus infettivo è stato recuperato fino a 61 dpos in tamponi nasofaringei

raccolti da pazienti immunocompromessi. ⁷⁶ e in un altro studio sono state rilevate basse cariche virali di RNA a 60 dpos. ⁷⁷. Il virus infettivo è stato isolato da fluidi broncoalveolari di pazienti sottoposti a terapia con cellule T chimeriche con recettore dell'antigene (CAR).

Articolo di recensione

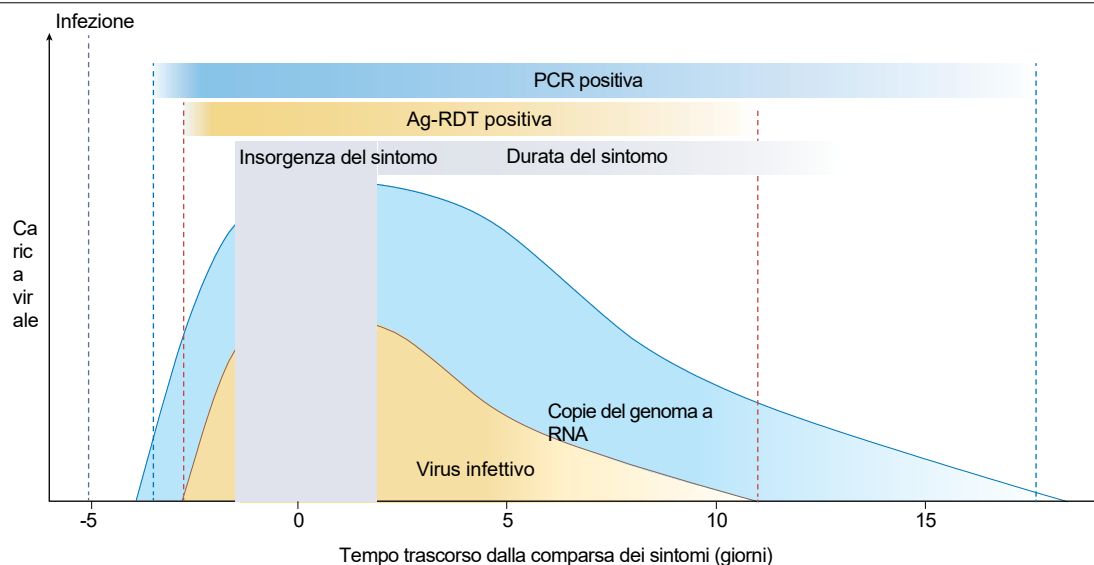


Fig. 2 | Cinetica delle cariche virali di RNA e del virus infettivo per gli ancestrali

SARS-CoV-2 in pazienti con malattia lieve-moderata. Secondo diversi studi, il periodo di incubazione del SARS-CoV-2 ancestrale è stato stimato tra 4,6 e 6,4 giorni. In media, i sintomi persistono per 10 giorni. L'RNA può essere rilevato già prima della comparsa dei sintomi; i livelli di RNA raggiungono il picco intorno alla comparsa dei sintomi e poi diminuiscono gradualmente. Spazio libero mediano per la carica virale di RNA è di 16 giorni dopo la comparsa dei sintomi. I titoli del virus infettivo sono più alti intorno alla comparsa dei sintomi e il virus infettivo può essere isolato fino a 8 o 10 giorni dopo la comparsa dei sintomi. L'RNA può essere rilevato per periodi prolungati

mediante PCR in tempo reale, quando il virus infettivo non è più rilevabile, mentre la rilevazione del virus mediante test diagnostici (rapidi) che rilevano l'antigene (Ag-RDT) si è dimostrata una migliore correlazione con l'infettività. I gradienti riflettono la variabilità tra gli individui (l'ombra più chiara verso la fine dell'infezione indica che le cariche virali continuano a essere rilevate in alcuni individui ma non in tutti). La linea grigia tratteggiata segna l'infezione iniziale, quella blu il periodo di positività alla PCR. e le linee rosse tratteggiate indicano la positività all'Ag-RDT. I dettagli degli studi sottostanti utilizzati per generare la Fig. 2 sono riportati nella Tabella supplementare 1.

fino a 28 giorni dopo il ricovero in un'unità di terapia intensiva⁷⁸. Un caso di paziente immunocompromesso ha mostrato l'isolamento del virus infettivo fino a 78 dpos.⁷⁹. Le segnalazioni di isolamento di virus infettivi da pazienti gravemente malati o immunocompromessi sono limitate (a causa del basso numero di pazienti), quindi è difficile definire la percentuale di casi con shedding prolungato.

Le caratteristiche dello shedding virale di altri virus respiratori sono delineate nel riquadro 2.

Diffusione virale delle varianti del SARS-CoV-2

L'evoluzione virale del SARS-CoV-2 nel tempo ha portato alla comparsa di numerose varianti. In combinazione con l'aumento dell'immunità della popolazione dovuto alla vaccinazione o all'infezione naturale, ciò ha portato alla necessità di rivalutare le nostre conoscenze sui modelli di diffusione virale.

L'OMS ha designato le varianti come varianti preoccupanti (VOC) se associate a uno o più dei seguenti fattori: elevata trasmissibilità o cambiamento dannoso nell'epidemiologia di COVID-19; aumento della virulenza o cambiamento nella presentazione clinica della malattia; diminuzione dell'efficacia delle misure di salute pubblica o dei metodi diagnostici, vaccinali o terapeutici disponibili.⁸⁰. Ad oggi sono riconosciute cinque VOC: Alpha, Beta, Gamma, Delta e Omicron. A differenza del SARS-CoV-2 ancestrale, i COV presentano alcune differenze nell'evasione dall'immunità, nelle cariche virali, nel periodo di diffusione e persino nel periodo di incubazione, con

conseguenti livelli di trasmissione drasticamente diversi.⁸¹⁻⁸⁵ (Fig. 3).

Tutti i COV hanno mostrato cambiamenti nella carica virale rispetto al SARS-CoV-2 ancestrale. Uno studio ha riportato che l'infezione con Alpha porta a una carica virale di RNA circa dieci volte superiore e a una maggiore probabilità di isolamento in coltura cellulare rispetto al virus ancestrale.⁸⁶.

Articolo di recensione

Tuttavia, un altro studio non ha riscontrato una differenza sostanziale nel titolo del virus infettivo tra il SARS-CoV-2 alfa e quello ancestrale (rif.³³). Secondo quanto riferito, il Delta ha portato a un aumento ancora maggiore della carica virale di RNA: uno studio ha riportato un aumento di 1.000 volte rispetto al virus ancestrale.⁸⁷, mentre altri studi hanno riportato 1,7× (rif.⁸⁸) o 6,2 volte superiore⁸⁹ carica virale rispetto ad Alpha. Inoltre, Delta ha dimostrato un'elevata probabilità di isolamento delle colture cellulari.⁹⁰ e titoli virali infettivi più elevati rispetto ad Alpha⁹¹. Sebbene Omicron si sia dimostrato altamente trasmissibile, sono state osservate cariche virali di RNA più basse, una minore probabilità di isolamento delle colture cellulari e cariche virali di RNA più basse.⁹² minore probabilità di isolamento delle colture cellulari⁹³ e titoli virali infettivi più bassi²⁵ sono stati osservati nei pazienti infettati con Omicron BA.1 rispetto a quelli infettati con Delta. Anche all'interno del clade Omicron, ci sono differenze tra i sotto-lineaggi, con l'infezione con Omicron BA.2 che porta a livelli più elevati di cariche virali di RNA e tempi più lunghi per la clearance virale rispetto a Omicron BA.1 (rif.^{94–96}).

Allo stesso modo, i COV hanno mostrato differenze nella durata dello shedding virale. L'analisi dei valori di Ct nei campioni respiratori ha evidenziato che Delta ha mostrato una maggiore persistenza dell'RNA virale rispetto al SARS-CoV-2 ancestrale (rif.⁹⁷). Un altro studio ha dimostrato che non c'era una differenza significativa nella durata media della presenza di RNA virale nelle infezioni Delta e Omicron BA.1.⁹². La durata dello shedding virale infettivo sembra essere simile a quella osservata con il SARS-CoV-2 ancestrale, con virus coltivabile ottenuto a 5 dpos⁸⁵ e nessun virus compatibile con la replicazione isolato oltre i 10 dpos in pazienti infettati con Delta e Omicron BA.1 (rif.^{84,98}). È importante notare che l'immunità preesistente al SARS-CoV-2, dovuta all'infezione o alla vaccinazione, potrebbe influenzare la durata dello spargimento del virus infettivo (oltre allo stato immunitario e alla gravità della malattia, come discusso sopra), il che potrebbe aver determinato alcune di queste differenze nel corso della pandemia.

Articolo di recensione

Influenza dell'età e del sesso sullo shedding virale

Esistono alcune evidenze che le differenze nell'immunità innata e adattativa associate all'età e al sesso, così come la maggiore espressione di ACE2 negli adulti rispetto ai bambini, determinino un aumento del rischio di malattia grave nei pazienti maschi più anziani.⁹⁹⁻¹⁰¹ Inoltre, alcuni studi hanno rilevato che l'età e il sesso influenzano le cariche virali e le dinamiche di shedding. Nei casi di infezione con SARS-CoV-2 ancestrale, la risoluzione dello shedding di RNA è stata più rapida nei partecipanti di età inferiore a 18 anni e più lenta nei partecipanti di età superiore a 50 anni.⁶¹ Secondo uno studio, l'RNA virale può essere rilevato per tempi più lunghi nei pazienti maschi infettati con SARS-CoV-2 ancestrale (rif.¹⁰²), e le cariche virali di RNA sono risultate più elevate nei pazienti di sesso maschile infettati con le varianti Alpha o Delta rispetto ai pazienti di sesso femminile.⁸⁸ Tuttavia, una possibile associazione della dinamica della carica virale con l'età o il sesso è molto discussa, poiché altri studi hanno dimostrato che non hanno alcuna influenza sulle cariche virali di virus o RNA infettivi.²⁵ o cariche virali di RNA⁵⁹.

I primi studi sulla SARS-CoV-2 ancestrale non hanno rilevato differenze nel successo dell'isolamento del virus o nelle cariche virali di RNA tra bambini e adulti.¹⁰³ o cariche virali di RNA tra bambini e adulti¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ ma le dimensioni del campione erano ridotte. Analizzando coorti molto più ampie, sono state osservate cariche virali di RNA leggermente inferiori e una clearance più rapida dell'RNA virale nei bambini rispetto agli adulti, mentre i modelli delle curve di shedding nel tempo erano simili tra bambini e adulti.¹⁰⁷ Inoltre, l'analisi su larga scala delle cariche virali nei diversi gruppi di età non ha mostrato differenze nella distribuzione della carica virale dell'RNA tra bambini e adulti.¹⁰⁸ o cariche virali solo leggermente inferiori (<0,5 log₁₀ unità) nei bambini di età inferiore a 5 anni⁸⁶.

I sintomi come correlazione con lo shedding

Uno dei parametri epidemiologici chiave per la trasmissione della SARS-CoV-2 è il periodo di incubazione, definito come il tempo trascorso dall'esposizione o dall'infezione alla comparsa dei sintomi. Studi sul SARS-CoV-2 ancestrale

Box 2

Diffusione di virus respiratori

La dinamica dello shedding virale differisce tra i virus respiratori, il che influenza la loro trasmissione e ha un effetto sulla diagnostica e sulle misure applicate per contenere i focolai.

SARS-CoV

L'epidemia di coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV) è iniziata nel novembre 2002 nella provincia cinese di Guangdong e si è rapidamente diffusa al di fuori della Cina. Il virus si trasmetteva per via aerea e poteva essere diffuso anche attraverso goccioline di saliva, ma è solo moderatamente trasmissibile tra gli esseri umani.¹⁸⁸ Nel periodo sintomatico iniziale sono state rilevate solo basse cariche virali, in genere con un picco nel tratto respiratorio superiore (URT) circa 10-14 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi (dpos)^{189,190} per poi scendere a livelli bassi a 3-4 settimane dall'infezione.¹⁹¹ Nei pazienti infettati con SARS-CoV, l'RNA virale è stato rilevabile per un massimo di 8 settimane nei campioni raccolti dall'URT.¹⁹¹ e per 52 giorni in campioni di espettorato¹⁹² mentre il virus infettivo è stato isolato fino a 28 dpos da campioni di feci e respiratori e fino a 36 dpos da campioni di urina.^{191,193} Il SARS-CoV si replica in modo meno efficiente a basse temperature; di conseguenza, la replicazione del virus è più efficiente nel tratto respiratorio inferiore (LRT) che nell'URT.¹⁹⁴ In particolare, lo spargimento virale asintomatico o pre-sintomatico e la trasmissione non sono stati registrati per il SARS-CoV^{190,195}; i picchi di trasmissione si è verificato intorno a 2 e 10 dpos¹⁹⁵. Di conseguenza, i focolai sono stati contenuti con successo grazie all'isolamento dei pazienti sintomatici infettati dal SARS-CoV, che ha ridotto la trasmissione successiva.¹⁹⁶

MERS-CoV

Il coronavirus respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV) è stato isolato da un paziente con polmonite in Arabia Saudita nel 2012 ed è stato dimostrato essere l'agente causale di un gruppo di gravi infezioni del tratto respiratorio in Medio Oriente.¹⁹⁷ La malattia causata dal MERS-CoV è caratterizzata da un'ampia gamma di gravità cliniche e da sintomi prevalentemente respiratori, come la sindrome virale acuta e l'insonnia. polmonite, con un elevato tasso di mortalità per caso¹⁹⁸. Il virus è in grado di

Articolo di recensione

trasmissione per via aerea e ha una bassa trasmissibilità tra gli esseri umani, con un numero di riproduzione massimo stimato inferiore a 1 (rif. ¹⁹⁸). Sono state rilevate cariche virali di RNA più elevate nella LRT rispetto alla URT. La durata media stimata dello shedding è di 15,3 giorni nella URT e 16,3 giorni nella LRT⁶². La positività prolungata alla PCR e le cariche virali di RNA più elevate nell'URT e nell'LRT sono state associate a una maggiore gravità della malattia.^{62,199}. L'RNA virale è stato rilevato anche nelle urine, nelle feci e nel siero.²⁰⁰. Uno studio ha riportato il rilevamento dell'RNA virale nel sangue per 34 giorni e hanno dimostrato che la presenza di RNA virale nel sangue è associata a una maggiore mortalità.²⁰¹ Tuttavia, un altro studio non è riuscito a isolare il virus da campioni di siero positivi alla PCR.²⁰⁰.

Virus dell'influenza

Nei pazienti sintomatici, le cariche virali di RNA iniziano a essere rilevabili mediante PCR in tempo reale 2 giorni prima della comparsa dei sintomi e raggiungono il picco a 1 dpos.²⁰². Le prove di sfida sull'uomo con i virus dell'influenza A mostrano che le cariche virali aumentano bruscamente già a 1 giorno dall'inoculazione, raggiungono un picco a 2 giorni dall'inoculazione e diventano non rilevabili a 8 giorni dall'inoculazione. La durata media dello shedding virale per i virus influenzali è di 4,8 giorni e la durata massima è compresa tra 6 e 7 giorni.^{203,204}. Le cinetiche dei titoli virali infettivi erano simili alle tendenze della carica virale rilevate dalla PCR in tempo reale per diversi ceppi di influenza.²⁰⁵. Nei pazienti asintomatici sono state osservate cariche virali di RNA più basse e uno shedding virale infettivo più breve.²⁰².

Virus respiratorio umano sinciziale

Questo virus è l'agente causale più frequente delle infezioni da LRT, con conseguente morbidità e mortalità soprattutto nei bambini piccoli e negli adulti anziani.²⁰⁶. Il virus si trasmette attraverso il contatto con le secrezioni nasali o con grandi aerosol. La carica virale e i sintomi sono aumentati contemporaneamente, raggiungendo un picco a 5,4 giorni.²⁰⁷. Nella sfida umana i titoli del virus respiratorio sinciziale sono stati rilevabili per una media di 4,6 giorni. L'RNA virale può essere ancora rilevato fino a 9 dpos, mentre i titoli virali infettivi possono essere rilevati da 1 a 8 dpos negli adulti.²⁰⁸ e fino a 9 dpos nei bambini²⁰⁹.

Articolo di recensione

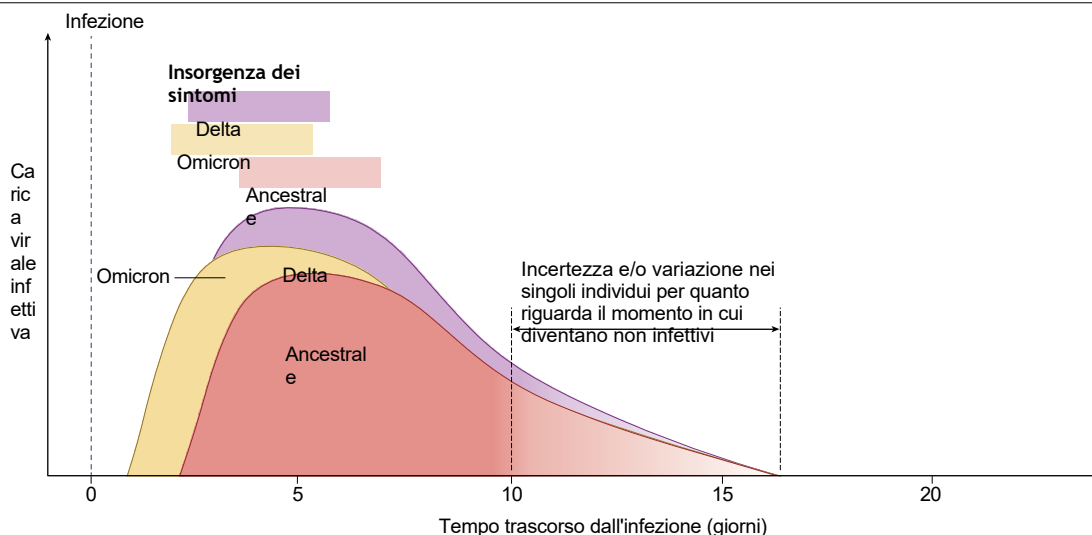


Fig. 3 | Carica virale infettiva e comparsa dei sintomi nelle varianti SARS-CoV-2 Delta e Omicron BA.1 che destano preoccupazione. I modelli complessivi delle dinamiche di shedding sono conservati tra le varianti del SARS-CoV-2. Rispetto al SARS-CoV-2 ancestrale, Delta e Omicron BA.1 hanno periodi di incubazione più brevi, stimati in circa 3,7-4 giorni per Delta e circa 3-3,4 giorni per Omicron BA.1. Nei pazienti infettati con Delta sono state rilevate cariche virali più elevate rispetto a quelle dei pazienti infettati con Omicron BA.1 o con SARS-CoV-2 ancestrale.

un numero limitato di studi ha determinato il momento in cui termina lo spargimento del virus per Delta e Omicron BA.1, quindi questo momento non è ben definito. A causa del basso livello di numero di studi che confrontano la fine del periodo infettivo tra le diverse varianti di SARS-CoV-2 che destano preoccupazione, il punto finale dell'infettività non è ben definito (mostrato come un gradiente di colore). I dettagli degli studi di base utilizzati per generare la Fig. 3 sono riportati nella Tabella 2 supplementare.

hanno stimato che il periodo di incubazione è in media compreso tra 4,6 e 6,4 giorni.^{59,109-111} (Fig. 2). Uno studio di challenge umano con il SARS-CoV-2 ancestrale ha dimostrato che i sintomi iniziano a comparire 2-4 giorni dopo l'inoculazione e le cariche virali di RNA raggiungono il picco 4-5 giorni dopo l'inoculazione.²⁹ Pertanto, l'inoculazione artificiale del virus ha confermato i tempi del picco di carica virale osservato negli individui infettati naturalmente, mentre l'insorgenza dei sintomi è stata più rapida nei casi di sfida umana. A differenza dell'infezione naturale, nell'inoculazione artificiale le gocce contenenti il virus con un'elevata carica virale vengono applicate direttamente nel naso e quindi raggiungono più rapidamente l'epitelio nasale, il che potrebbe portare a una più rapida comparsa dei sintomi. Per Delta, il periodo di incubazione stimato è compreso tra 3,7 e 4 giorni.^{81-83,97} mentre l'infezione con Omicron BA.1 è stata caratterizzata da un periodo di incubazione ancora più breve, pari a 3-3,4 giorni.^{83,112,113} (Fig. 3). Tuttavia, poiché il momento dell'infezione è raramente noto al di fuori delle sperimentazioni sull'uomo, il dpos è più comunemente utilizzato per analizzare la carica virale e il virus infettivo.

Considerando che cariche virali elevate possono essere rilevate nell'URT di individui infetti indipendentemente dalle loro manifestazioni cliniche, la presenza di sintomi è un indicatore inaffidabile di contagiosità. In particolare, gli individui infettati con il SARS-CoV-2 possono essere contagiosi prima della comparsa dei sintomi.⁵⁹ e si stima che circa la metà delle trasmissioni secondarie avvenga nella fase pre-sintomatica.^{59,114} Inoltre, secondo le indagini sulla popolazione, i casi asintomatici rappresentano circa il 40% di tutte le infezioni da SARS-CoV-2 con SARS-CoV-2 ancestrale (rif. ¹¹⁵⁻¹¹⁷), e il monitoraggio dei contatti stretti dei casi confermati di SARS-CoV-2 ha rilevato che fino al 23% delle infezioni era asintomatico.¹¹⁸ Esistono risultati contrastanti riguardo alle

differenze di diffusione virale nei pazienti sintomatici e asintomatici. Il confronto delle cariche virali tra pazienti sintomatici e asintomatici rimane impegnativo, poiché il momento dell'esposizione non può essere chiaramente identificato negli individui asintomatici e il dpos non può essere utilizzato per confrontare le cariche virali.

Articolo di recensione

cariche virali con individui sintomatici. Inoltre, gli individui che non presentano sintomi clinici al momento del test possono rappresentare veri e propri asintomatici o individui pre-sintomatici che svilupperanno sintomi in seguito. Pertanto, solo studi ben controllati con un follow-up di individui valutati possono fare una chiara distinzione tra individui pre-sintomatici e asintomatici. Uno studio sulla SARS-CoV-2 ancestrale, che ha seguito COVID-19 casi confermati ricoverati in ospedale per l'isolamento e ha registrato i sintomi quotidianamente, ha riscontrato valori Ct iniziali simili tra individui asintomatici e sintomatici.¹¹⁹ Analogamente, non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nelle cariche virali di RNA tra pazienti sintomatici e asintomatici in altri studi in cui i pazienti sono stati seguiti longitudinalmente e la presenza di sintomi è stata monitorata dagli operatori sanitari o è stata auto-riferita.¹²⁰ o è stato autodichiarato¹¹⁵. Al contrario, altri studi, in cui i sintomi sono stati registrati dai medici, hanno riportato cariche virali di RNA più basse nei partecipanti asintomatici.^{121,122} Inoltre, uno studio ha rilevato una clearance più rapida dell'RNA virale nei soggetti asintomatici rispetto a quelli sintomatici.¹²³ e un altro ha registrato una durata mediana più lunga dello shedding dell'RNA virale tra i pazienti asintomatici.¹¹⁹

Esistono dati limitati sulla presenza di virus infettivi in pazienti asintomatici. Uno studio ha mostrato un minore successo nell'isolamento del virus da pazienti asintomatici, ma è stato incluso solo un piccolo numero di pazienti.¹²⁴ ma è stato incluso solo un piccolo numero di pazienti. Pertanto, ulteriori studi che valutino il virus infettivo nei pazienti asintomatici contribuirebbero a chiarire le differenze nella loro infettività rispetto ai pazienti sintomatici.

Trasmissione della SARS-CoV-2

Le cariche virali hanno un ruolo chiave nella trasmissione della SARS-CoV-2. Come discusso in precedenza, l'ospite (ruolo della vaccinazione o dell'infezione precedente) e i fattori virali (varianti del SARS-CoV-2) influenzano notevolmente le dinamiche della carica virale e quindi influenzano ulteriormente la trasmissione virale.

Articolo di recensione

Influenza della carica virale sulla trasmissione

Il SARS-CoV-2 può essere trasmesso attraverso goccioline e aerosol più grandi prodotti respirando, parlando, starnutando o tossendo e, in misura minore, anche da superfici contaminate. Poiché un'infezione può essere indotta solo da particelle virali infettive e non solo da RNA o proteine residue, la presenza di SARS-CoV-2 infettivo è necessaria per la trasmissione secondaria. Sebbene la trasmissione sia un processo multifattoriale influenzato, ad esempio, da fattori ambientali e comportamentali (come l'umidità, la qualità dell'aria, il tempo di esposizione o la vicinanza del contatto), la carica virale del SARS-CoV-2 nell'URT è considerata una proxy del rischio di trasmissione.

Uno studio epidemiologico che ha incluso l'analisi della carica virale ha rilevato che la carica virale di un caso indice è fortemente correlata alla trasmissione successiva, con cariche virali più elevate per il SARS-CoV-2 ancestrale che presentano un rischio maggiore di attacco secondario.¹²⁵ In questo studio, la carica virale è stata identificata come il principale fattore di trasmissione, con un effetto più pronunciato nei contesti domestici rispetto a quelli non domestici (ospedali e case di cura, tra gli altri). La probabilità di trasmissione ha un picco intorno alla comparsa dei sintomi, quando si stima che i titoli virali infettivi siano i più alti nel corso dell'infezione. Poiché la carica virale diminuisce con il tempo, la probabilità di trasmissione diminuisce gradualmente anche nei casi di infezione con SARS-CoV-2 ancestrale (rif.¹²⁶). A questo proposito, uno studio sugli operatori sanitari infettati con il virus ancestrale ha documentato l'assenza di trasmissione da casi indice oltre i 6 dpos, il che è in linea con i risultati che mostrano un ridotto successo nell'isolamento del virus verso la fine della prima settimana di malattia sintomatica.¹²⁷

Tuttavia, l'utilizzo della carica virale di un caso indice come proxy della trasmissione presenta dei limiti. Ad oggi, non è ancora nota la dose infettiva di SARS-CoV-2 necessaria per portare a una trasmissione secondaria e l'associazione tra la presenza del virus infettivo nel tratto respiratorio e l'infettività degli stessi individui è poco conosciuta. Nell'unico studio di challenge umano disponibile, condotto con il SARS-CoV-2 ancestrale, una dose infettiva iniziale di 10 TCID₅₀ non ha portato a un'infezione in 16 dei 36 partecipanti.²⁹ Altri fattori, come i sintomi, il tipo di contatto, le misure di protezione, lo stato di vaccinazione e altri fattori dell'ospite, possono avere un ulteriore effetto sulla trasmissione.¹²⁸⁻¹³³

La carica virale può variare notevolmente da un individuo all'altro (come risultato della suscettibilità individuale e dell'immunità derivante da precedenti infezioni o vaccinazioni), il che porta a differenze nella propensione a trasmettere il virus. Infatti, sono state osservate differenze nella durata della rilevazione del virus infettivo e nelle cariche virali nasali e orali sia per il SARS-CoV-2 ancestrale che per l'Alpha³³. Si è ipotizzato che la variabilità interindividuale abbia un ruolo nell'eterogeneità osservata delle dinamiche della carica virale, in quanto alcune firme immunitarie precoci erano significativamente associate a cariche virali di RNA orofaringeo più elevate nei pazienti.¹³⁴ Pertanto, l'eterogeneità osservata tra gli individui ha un ruolo importante nella trasmissione virale in corso.³³

Tali differenze possono portare a un'eterogeneità nella trasmissione del virus. La modellazione con il SARS-CoV-2 ancestrale e Alpha ha stimato che gli individui altamente infettivi, noti come superspreaders, diffondono una quantità di virus 57 volte superiore nel corso dell'infezione rispetto a quelli con una minore infettività.³³

Al contrario, la maggior parte dei pazienti con COVID-19 non infetta altri individui perché espelle poche o nessuna particella virale dalle vie respiratorie.¹³⁵ Infatti, solo una minoranza (circa l'8%) di pazienti positivi per il SARS-CoV-2 infettati con il SARS-CoV-2 ancestrale o con l'Alpha ha titoli virali infettivi significativamente più alti rispetto al resto della popolazione (come dimostrato in uno studio che misura la probabilità di isolamento del virus in un'ampia coorte di pazienti).⁸⁶ Inoltre, solo il 15%¹¹⁴ al 19%¹³⁶ di individui che

sono stati infettati ha portato all'80% delle trasmissioni secondarie di SARS-CoV-2 ancestrale. Tendenze simili sono state confermate per Omicron BA.1 e BA.2, per i quali solo il 9% dei casi è stato infettato dai contatti infettivi sono stati responsabili dell'80% di tutte le trasmissioni.

Gli eventi di superdiffusione sono quindi caratterizzati da individui infettivi che hanno contatti stretti con un numero elevato di individui suscettibili e da una maggiore probabilità di trasmissione per contatto. Oltre ai fattori biologici che influenzano questi eventi, anche i fattori socio-comportamentali e ambientali contribuiscono alla probabilità di superdiffusione (ad esempio, grandi raduni al chiuso con scarsa ventilazione e assenza di altre misure di prevenzione delle infezioni). Inoltre, particolari luoghi possono rappresentare un rischio più elevato di trasmissione (ad esempio, molti eventi di superdiffusione hanno luogo in ambienti chiusi affollati, come navi da crociera, riunioni familiari, feste, centri di assistenza per anziani e ospedali).¹³⁹.

Il ruolo dell'immunità preesistente sullo shedding e la trasmissione virale

Tutti i vaccini contro la SARS-CoV-2 attualmente in commercio vengono somministrati per via intramuscolare e determinano un aumento degli anticorpi nel siero e una protezione dalla malattia grave e dalla morte per COVID-19, ma non una protezione a lungo termine dall'infezione.¹⁴⁰⁻¹⁴². I livelli di anticorpi circolanti generati dalla vaccinazione diminuiscono nel tempo, ma possono essere aumentati da una dose di richiamo.^{143,144}. Inoltre, i vaccini attualmente disponibili sono stati sviluppati contro il ceppo ancestrale della SARS-CoV-2 utilizzando la proteina spike del primo virus sequenziato, e il grado di protezione dalla malattia grave contro altre varianti genetiche ha dimostrato di variare.¹⁴⁵. Inoltre, la vaccinazione porta a una limitata induzione di anticorpi neutralizzanti sulle superfici mucosali, che potrebbero avere un ruolo nel mitigare la replicazione del virus e nella prevenzione di una malattia più pronunciata.^{146,147}. Per esempio, in uno studio gli anticorpi della componente secretoria, specifici per le superfici mucosali, sono stati rilevati nella saliva nel 58% dei partecipanti 2 settimane dopo la vaccinazione con vaccini a mRNA, ma i livelli erano significativamente più bassi rispetto ai partecipanti convalescenti e la loro capacità neutralizzante è diminuita significativamente 6 mesi dopo la vaccinazione.¹⁴⁸. Uno studio su un piccolo gruppo di individui non infetti o infettati da Delta ha dimostrato che le risposte anticorpali mucosali indotte dalla vaccinazione erano basse o non rilevabili, ma le infezioni dirompenti hanno portato a un aumento sostanziale dei titoli anticorpali nella saliva.¹⁴⁹. Tuttavia, il ruolo dell'immunità mucosale preesistente sullo spargimento del virus infettivo e la possibile correlazione tra gli anticorpi mucosali e le cariche virali nell'uomo non sono stati chiariti.

A causa del calo degli anticorpi e della comparsa di COV con proprietà immuno-evasive, sono state segnalate sempre più spesso infezioni da rottura tra i soggetti vaccinati, soprattutto dopo la comparsa dei COV Delta e Omicron. Si è discusso se la vaccinazione con gli attuali vaccini contro la SARS-CoV-2 abbia un impatto sulla carica virale (e quindi sullo shedding) nelle infezioni dirompenti. L'effetto della vaccinazione sulla carica virale e sullo shedding è quindi interessante perché significherebbe che la vaccinazione non solo protegge la persona vaccinata, ma può anche contribuire a mitigare la diffusione del virus riducendo i titoli virali infettivi o abbreviando i periodi di shedding infettivo, con un impatto che va oltre la protezione dell'individuo.

Nel complesso, la vaccinazione ha portato a una riduzione della carica virale (Fig. 4), anche se questa diminuisce con il tempo. La vaccinazione con il vaccino ChAdOx1 (il vaccino di Oxford-AstraZeneca) o BNT162b2 (il vaccino di Pfizer/BioNTech) porta a una riduzione delle cariche virali di RNA nei soggetti infettati con Alpha, ma l'effetto è stato più debole per le infezioni di

breakthrough con Delta^{150,151}. L'immunizzazione con BNT162b2 ha portato a una riduzione delle cariche virali di RNA nelle infezioni Delta breakthrough, anche se questo effetto è diminuito.

Articolo di recensione

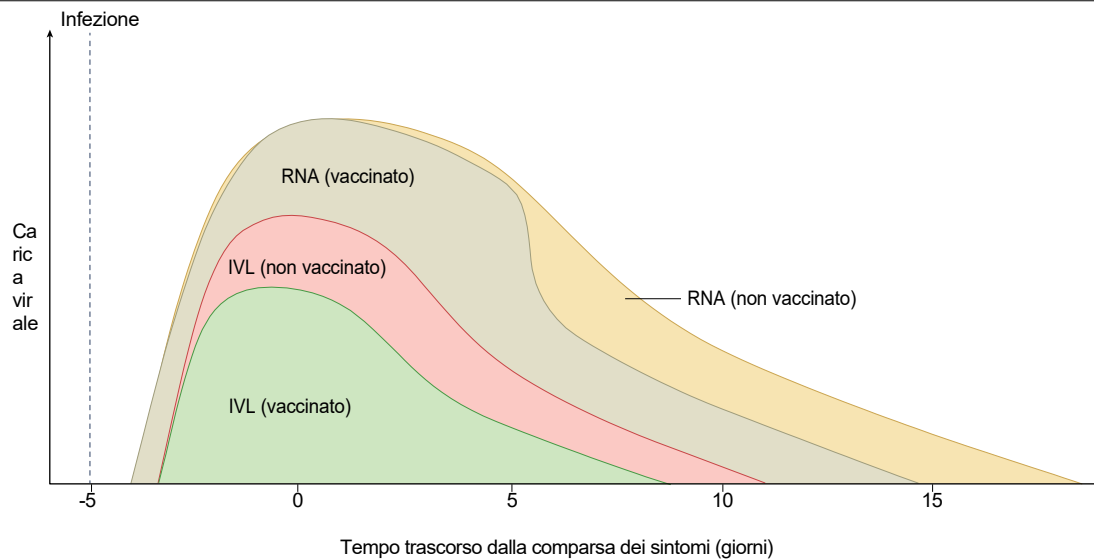


Fig. 4 | Influenza della vaccinazione sulla carica virale. Cariche virali di RNA simili sono state rilevate nei pazienti vaccinati e non vaccinati infettati con la variante Delta di interesse nei primi 5 giorni dopo l'inizio dei sintomi. Tuttavia, nei pazienti vaccinati è stata dimostrata una più rapida eliminazione dell'RNA virale. Le cariche virali infettive (IVL) sono risultate significativamente più basse nei soggetti vaccinati e sono diminuite nei pazienti non vaccinati.

più velocemente rispetto agli individui non vaccinati infettati da Delta. La dinamica delle cariche virali nei soggetti vaccinati può variare notevolmente in caso di infezione con un'altra variante. I dettagli degli studi di base utilizzati per generare la Fig. 4 possono essere consultati nella Tabella supplementare 3.

2 mesi dopo la vaccinazione e infine sbiadito 6 mesi dopo la vaccinazione.¹⁵² L'immunizzazione con il vaccino ChAdOx1 ha portato anche a una riduzione della carica virale di RNA nelle infezioni da breakthrough con Alpha VOC.¹⁵³ È stata rilevata una clearance più rapida delle cariche virali di RNA nel gruppo di pazienti vaccinati che hanno ricevuto prevalentemente vaccini a mRNA.^{154,155} e si è osservata una minore probabilità di isolamento del virus infettivo dai pazienti vaccinati con vaccini a mRNA o con vettori adenovirali.^{156,157} Anche se non tutti gli studi hanno potuto dimostrare una riduzione delle cariche virali di RNA nelle infezioni da delta breakthrough^{150,154} i titoli virali infettivi sono risultati più bassi nei soggetti vaccinati con vaccini a mRNA o con vettori adenovirali, nonostante livelli simili di RNA virale.^{25,93,157} Anche la vaccinazione ha influenzato l'isolamento del virus infettivo. Il virus vitale in coltura cellulare è stato rilevato

lungo nei pazienti non vaccinati infettati con Delta rispetto ai pazienti vaccinati infettati con Delta.^{155,158} Tuttavia, non sono state riscontrate differenze significative nell'RNA virale.

sono stati riscontrati carichi di sangue tra i non vaccinati, i completamente vaccinati o i potenziati pazienti infettati con Omicron BA.1 o BA.2 (rif. ^{93,159}), mentre l'infezione titoli virali del virus, misurati quantitativamente a 5 dpos, sono risultati più bassi nell'Omicron BA.1 infezioni dirompenti solo dopo una dose di richiamo²⁵.

Altr o

Gli studi hanno dimostrato che lo stato di vaccinazione non ha influenzato l'infezione successo dell'isolamento del virus⁹³ o il tempo trascorso dall'iniziale positività del test PCR a l

conversione colturale in pazienti infettati da Omicron BA.1 (rif.⁸⁵). Questi studi indicano che la triplice vaccinazione riduce la carica virale

infettiva ma non il periodo di tempo in cui il virus infettivo può essere isolato dalle infezioni da Omicron breakthrough.

Esistono dati limitati sull'effetto di un'infezione precedente sullo shedding virale. Uno studio condotto sul SARS-CoV-2 ancestrale ha dimostrato cariche virali di RNA inferiori tra gli individui sieropositivi rispetto a quelli sieronegativi.¹⁶⁰ Sebbene siano stati dimostrati livelli più elevati di reinfezione con Omicron BA.1 tra i pazienti non vaccinati precedentemente infettati con altre varianti del SARS-CoV-2.¹⁶¹ Non ci sono dati rilevanti sull'effetto delle infezioni precedenti sulla dinamica della carica virale.

Articolo di recensione

Insieme di questi risultati suggerisce che gli individui vaccinati sono meno infettivi di quelli non vaccinati, anche se la durata di questo effetto non è stata studiata sistematicamente. Tuttavia, ci sono dati contrastanti sull'effetto della vaccinazione sulla trasmissione successiva. Uno studio epidemiologico condotto nel Regno Unito ha rilevato che, nonostante la carica virale di RNA diminuisca più rapidamente tra i pazienti completamente vaccinati rispetto a quelli non vaccinati infettati con Delta, i picchi di carica virale di RNA erano simili e il tasso di attacchi secondari tra le famiglie esposte a casi indice completamente vaccinati o non vaccinati non differiva.¹⁵¹. Al contrario, i dati provenienti da Israele hanno dimostrato che nelle famiglie con partecipanti vaccinati si è verificata una minore trasmissione di Delta rispetto a quelle con partecipanti non vaccinati.¹³⁰. Un altro studio condotto nel Regno Unito ha dimostrato che entrambi i vaccini BNT162b2 e ChAdOx1 hanno portato a una riduzione della trasmissione da parte dei pazienti indice vaccinati, sebbene sia stata rilevata una riduzione più marcata per il vaccino Alpha rispetto a quello Delta.¹²⁹ probabilmente a causa delle cariche virali più elevate in caso di infezione con Delta, come dimostrato in precedenza.^{88,89,129}. Infine, un altro studio ha rilevato che la vaccinazione è associata a una ridotta trasmissione dell'infezione Delta breakthrough, grazie alla minore durata dello shedding del virus vitale.¹⁵⁸.

Nel complesso, anche se i vaccini attualmente utilizzati sono ancora basati sulla proteina spike del virus ancestrale e suscitano principalmente una risposta immunitaria sistemica piuttosto che mucosale, è stato osservato un certo effetto sulla carica virale, sullo spargimento del virus infettivo e sulla trasmissione.^{129,130,162}. Inoltre, con l'aumento dei tassi di infezione dirompente nelle onde Omicron dalla fine del 2021, molti individui mostrano un'immunità ibrida costituita dalla vaccinazione combinata con una o più infezioni naturali prima o dopo la vaccinazione.^{163,164}. Si pensa che questa immunità ibrida possa fornire un migliore controllo della replicazione del virus nella mucosa.^{149,163,165}.

Con la costante comparsa di nuove varianti in grado di eludere l'immunità esistente, la nostra comprensione dell'effetto della vaccinazione sullo shedding virale deve essere costantemente aggiornata.¹⁶⁶. Una migliore comprensione del ruolo dell'immunità mucosale e, potenzialmente, dei vaccini in grado di suscitare

Articolo di recensione

Glossari

o

trasmissione rimane

Terapia con cellule T a recettore antigenico chimerico (CAR)

Un modo per trattare il cancro utilizzando cellule T che esprimono recettori geneticamente modificati per colpire le cellule tumorali.

nessun punto...

Valore di soglia del ciclo (Ct)

Il numero di amplificazioni necessarie affinché un gene target superi la soglia determinata dalla PCR in tempo reale. I valori Ct arbitrari specifici del test sono inversamente correlati alla carica virale.

trascritti in

Saggi di focalizzazione

Saggi che contano il numero di "foci", definito come un gruppo di cellule adiacenti che esprimono l'antigene virale, colorato da un anticorpo specifico.

rilevato che

Immunosintesi

Un metodo per il rilevamento di specifiche

proteine in singole cellule o tessuti utilizzando anticorpi. Nel caso della SARS-CoV-2, gli anticorpi anti-nucleocapside sono utilizzati per rilevare il virus nelle cellule infette.

Caso indice

L'individuo infetto che scatena un focolaio o un cluster trasmettendo un agente infettivo ad altri. In un'epidemia o in uno studio epidemiologico possono esserci più casi indice.

Le risposte immunitarie locali piuttosto che sistemiche sono necessarie per puntare alla riduzione della carica virale come mezzo per controllare la circolazione del SARS-CoV-2.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

Influenza dei VOC della SARS-CoV-2 sulla trasmissione

Saggi sulla placca

Saggi che quantificano il numero di virioni infettivi contando le placche in un monostrato cellulare che corrispondono a singole particelle infettive.

Tasso di attacco secondario

La probabilità che un'infezione si diffonda da un caso indice a persone suscettibili in un ambiente specifico (di solito, una famiglia o contatti stretti). Il termine è usato per valutare il rischio di un'ulteriore

trasmissione dell'agente patogeno all'interno di un

popolazione.

Sieroconversione

Lo sviluppo di anticorpi specifici nel siero come conseguenza di

immunizzazione tramite infezione naturale o

vaccinazione.

sgRNA

Frammenti di RNA subgenomico che si formano durante la replicazione virale.

TCID₅₀

Una misura della presenza di effetti citopatici nelle cellule in seguito a infezione con diluizioni seriali di campioni di virus, che indica la dose necessaria per indurre un effetto citopatico nel 50% dei pozzetti inoculati.

varianti, non può essere previsto da specifici modelli di mutazione. Con una situazione ancora altamente dinamica in termini di evoluzione virale della SARS-CoV-2, la comprensione della cinetica virale e del suo effetto sulla

di elevato interesse per la salute pubblica.

Diagnostica della SARS-CoV-2 nella sanità pubblica

La nostra capacità di definire la presenza di virus infettivi è fondamentale per orientare le misure di salute pubblica, in quanto consentirà di isolare i virus infettivi.

individui per limitare la trasmissione secondaria. Sfortunatamente,

Attualmente esiste un test diagnostico per determinare l'infezione da SARS.

CoV-2 in un campione di pazienti¹⁷² e la coltura del virus come descritto sopra non è

adatto a scopi diagnostici. Per questo motivo, sono stati suggeriti diversi approcci per trovare una proxy della contagiosità per guidare i periodi di isolamento. Un esempio è il rilevamento dei trascritti di sgRNA, che vengono generati durante la replicazione del virus, e in

particolare la sintesi di

non sono impacchettati nei virioni e possono quindi fungere da

un indicatore di replicazione attiva e quindi di virus infettivo. Specifico

I test RT-PCR sono stati sviluppati per rilevare gli sgRNA in aggiunta al rilevamento diagnostico dell'RNA genomico della SARS-CoV-2, ma tali test hanno

non si sono fatti strada nell'uso diagnostico di routine a causa della loro minore

sensibilità rispetto ai saggi RT-PCR convenzionali. Alcuni studi hanno

il rilevamento di sgRNA è correlato al rilevamento di virus infettivi^{4,173,174},

e che l'sgRNA era raramente rilevabile 8 dpi⁵⁷. Tuttavia, l'sgRNA è stato

rilevato nei campioni diagnostici fino a 17 giorni dopo il rilevamento iniziale dell'infezione¹⁷⁵ o in campioni negativi alla coltura¹⁷⁶ probabilmente a causa della stabilità e della resistenza alle nucleasi delle vescicole a doppia membrana con.

che contengono sgRNA. Pertanto, anche se l'assenza di sgRNA indicherebbe

assenza di replicazione virale, la presenza di sgRNA non necessariamente

indicano l'infettività¹⁹.

I valori Ct sono stati utilizzati anche come proxy dell'infettività, come descritto in precedenza. Tuttavia, come già discusso, i campioni di bassa qualità derivanti da errori tecnici durante il processo di raccolta possono indicare falsamente l'assenza di virus infettivi. Inoltre, a causa del rapido aumento della carica virale di RNA all'inizio dell'infezione, una bassa carica virale, soprattutto in assenza di sintomi o nelle prime fasi dell'infezione, può portare a un'infezione.

periodo sintomatico, non esclude che un individuo non si Esistono diverse possibili cause alla base dell'aumento della trasmissibilità delle nuove varianti emergenti, che consentono ai COV di superare rapidamente i ceppi precedentemente in circolazione, tra cui l'aumento delle cariche virali, una dose infettiva inferiore necessaria per stabilire l'infezione e un periodo di infettività prolungato.¹⁷⁰.

Inoltre, le proprietà immuno-evasive delle nuove varianti portano a una ridotta suscettibilità all'infezione per gli individui vaccinati e precedentemente infettati e determinano una maggiore trasmissibilità, con Omicron^{166,171}.

La rapida comparsa di varianti del SARS-CoV-2 con proprietà biologiche alterate ha dimostrato che le conoscenze sulle cariche virali, sulla cinetica virale e sullo shedding del virus infettivo sono specifiche per ogni variante e ogni variante emergente richiede una rivalutazione. Sebbene la comprensione dei profili mutazionali e dei fenotipi associati alle varianti del SARS-CoV-2 sia migliorata, le ragioni della maggiore trasmissibilità sono molteplici e non tutte ancora comprese. Ad oggi, le caratteristiche di shedding e le proprietà di trasmissione non possono essere facilmente previste sulla base delle sequenze. A differenza dei meccanismi di evasione immunitaria, le dinamiche di shedding, come la cinetica dei titoli virali infettivi o i periodi di incubazione del virus SARS-CoV-2, sono state definite in maniera diversa.

entrare nel periodo infettivo con il più alto rischio di trasmissione. In questo periodo, le cariche virali raggiungono i livelli massimi, causando la maggior parte degli eventi di trasmissione.^{59,126}.

Anche se gli Ag-RDT sono meno sensibili della RT-PCR, sono meno costosi, possono essere eseguiti al di fuori dei laboratori e danno risultati più rapidi, quindi sono strumenti utili per guidare l'isolamento e limitare la trasmissione.¹⁷⁷. I test RT-PCR hanno un limite di rilevamento di 10^2 - 10^3 copie di genoma per millilitro, mentre gli Ag-RDT hanno un limite di rilevamento che risponde a 10^4 - 10^6 copie di genoma per millilitro.¹⁷⁷⁻¹⁸⁰.

Infettivo
Gli individui hanno tipicamente cariche virali di RNA di $>10^6$ copie di genoma per

millilitro, che corrisponde in larga misura a un Ct di 25 nella maggior parte delle RT-PCR

saggi⁴ indicando che l'Ag-RDT è un buon indicatore della contagiosità.¹⁷⁷. Tuttavia, le ovvie limitazioni dell'Ag-RDT, come la minore sensibilità nella rilevazione del virus infettivo verso la fine dell'infezione, sono state eliminate.^{47,52} non deve essere trascurato. Anche gli Ag-RDT hanno mostrato variazioni nella loro sensibilità e specificità per la rilevazione di SARS-CoV-2 VOC.^{53,54} che rappresenta una sfida per l'emergere di nuove varianti.

Nel complesso, tutti i metodi diagnostici attualmente disponibili presentano alcune limitazioni per il rilevamento dei virus infettivi. Tuttavia, anche se questi test servono solo come strumenti imperfetti quando vengono usati come proxy per l'infettività, la loro implementazione come parte di una strategia di salute pubblica non è intesa a prevenire ogni singola infezione, ma piuttosto a ridurre il numero di infezioni.

Articolo di recensione

numero di persone infettive nella comunità e quindi di diminuire il numero di trasmissioni secondarie.

Conclusioni

Entrando nel terzo anno della pandemia, sono state acquisite molte conoscenze sulle cariche virali della SARS-CoV-2, sullo shedding del virus infettivo e sulle finestre di infettività, anche se le varianti emergenti del SARS-CoV-2 e l'immunità crescente della popolazione aggiungono ulteriore complessità alla situazione.

Sebbene durante la pandemia siano stati compiuti molti progressi nel campo della diagnostica, a tutt'oggi non esistono test diagnostici in grado di garantire l'affidabilità della malattia. determinare la presenza di un virus infettivo. La valutazione continua delle caratteristiche di diffusione virale in queste circostanze mutevoli e la comprensione delle proprietà biologiche delle nuove varianti di SARS-CoV-2 per quanto riguarda la diffusione virale rimangono importanti per guidare le pratiche di salute pubblica.

Published online: 02 December 2022

Pubblicato online: xx xx xxxx

Riferimenti

1. Puellas, V. G. et al. Tropismo multiorgano e renale del SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* **383**, 590-592 (2020).
2. Lamers, M. M. & Haagmans, B. L. Patogenesi del SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **20**, 270-284 (2022).
3. Peng, L. et al. Il SARS-CoV-2 può essere rilevato nelle urine, nel sangue, nei tamponi anali e in campioni di tamponi orofaringei. *J. Med. Virol.* **92**, 1676-1680 (2020).
4. Wölfel, R. et al. Valutazione virologica dei pazienti ospedalizzati con COVID-19. *Nature* **581**, 465-469 (2020).
5. Zhang, W. et al. Indagine molecolare e sierologica dei pazienti infettati da 2019-nCoV: implicazione di vie di diffusione multiple. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 386-389 (2020).
6. Pérez-Bartolomé, F. & Sánchez-Quirós, J. Manifestazioni oculari della SARS-CoV-2: revisione della letteratura. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* **96**, 32-40 (2021).
7. Vetter, P. et al. Cinetica virale giornaliera e valutazione della risposta immunitaria innata e adattativa in COVID-19: una serie di casi. *mSphere* <https://doi.org/10.1128/mSphere.00827-20> (2020).
8. Jeong, H. W. et al. SARS-CoV-2 vitale in vari campioni di pazienti COVID-19. *Clin. Microbiol. Infect.* **26**, 1520-1524 (2020).
9. Cerrada-Romero, C. et al. Escrezione e vitalità del SARS-CoV-2 nelle feci e sua associazione con l'esito clinico del COVID-19. *Sci. Rep.* **12**, 7397 (2022).
10. Dergham, J. & Delerue, J. Isolamento di virus SARS-CoV-2 vitale dalle feci di un paziente immunocompromesso che suggerisce una possibile modalità di trasmissione fecale. *J. Clin. Med.* <https://doi.org/10.3390/jcm10122696> (2021).
11. Xiao, F. et al. SARS-CoV-2 infettivo nelle feci di un paziente con grave COVID-19. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 1920-1922 (2020).
12. Sun, J. et al. Isolamento di SARS-CoV-2 infettivo dalle urine di un paziente COVID-19. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 991-993 (2020).
13. Colavita, F. et al. Isolamento di SARS-CoV-2 da secrezioni oculari di un paziente con COVID-19 in Italia con rilevamento prolungato di RNA virale. *Ann. Stigista. Med.* **173**, 242-243 (2020).
14. Matsuyama, S. et al. Isolamento migliorato del SARS-CoV-2 da parte di cellule che esprimono TMPRSS2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **117**, 7001-7003 (2020).
15. Case, J. B., Bailey, A. L., Kim, A. S., Chen, R. E. & Diamond, M. S. Crescita, rilevamento, quantificazione e inattivazione del SARS-CoV-2. *Virologia* **548**, 39-48 (2020).
16. Baggen, J., Vanstreels, E., Jansen, S. & Daelemans, D. Fattori di accoglienza cellulare per l'infezione da SARS CoV-2. *Nat. Microbiol.* **6**, 1219-1232 (2021).
17. Chu, H. et al. Tropismo comparativo, cinetica di replicazione e profilo di danno cellulare di SARS-CoV-2 e SARS-CoV con implicazioni per le manifestazioni cliniche, la trasmissibilità e gli studi di laboratorio di COVID-19: uno studio osservazionale. *Lancet Microbe* **1**, e14-e23 (2020).
18. van Kampen, J. J. A. et al. Durata e determinanti chiave dello shedding del virus infettivo in pazienti ospedalizzati con malattia da coronavirus-2019 (COVID-19). *Nat. Commun.* **12**, 267 (2021).
19. Bruce, E. A. et al. Previsione dell'infettività: confronto tra quattro test basati sulla PCR per rilevare il SARS-CoV-2 coltivabile in campioni clinici. *EMBO Mol. Med.* **14**, e15290 (2022).
20. Essaidi-Laziosi, M. & Perez Rodriguez, F. J. Stima dell'infettività clinica del SARS-CoV-2 in cellule epiteliali Vero E6 e primarie delle vie aeree. *Lancet Microbe* **2**, e571 (2021).
21. Liu, R. et al. Tasso di positività nella rilevazione RT-PCR dell'infezione da SARS-CoV-2

in 4880 casi di un ospedale di Wuhan, Cina, da gennaio a febbraio 2020. *Clin. Chim. Acta* **505**, 172-175 (2020).

22. Corman, V. M. et al. Rilevamento del nuovo coronavirus 2019 (2019-nCoV) mediante RT-PCR in tempo reale. *Eur. Surveill.* <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045> (2020).
23. Bullard, J. et al. Previsione della sindrome respiratoria acuta grave infettiva da coronavirus 2 da campioni diagnostici. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 2663-2666 (2020).
24. Jefferson, T., Spencer, E. A., Brassey, J. & Heneghan, C. Colture virali per la valutazione dell'infettività della malattia da coronavirus 2019: una revisione sistematica. *Clin. Infect. Dis.* **73**, e3884-e3899 (2021).

Articolo di recensione

25. Puhach, O. et al. Carica virale infettiva in individui non vaccinati e vaccinati infettati da SARS-CoV-2: carica virale, Delta o Omicron. *Nat. Med.* **28**, 1491-1500 (2022).
26. van Kasteren, P. B. et al. Confronto tra sette kit diagnostici RT-PCR commerciali per COVID-19. *J. Clin. Virol.* **128**, 104412 (2020).
27. B. et al. Laboratorio per la definizione di uno standard internazionale dell'OMS per l'RNA della SARS-CoV-2 (OMS, 2020).
28. Zou, L. et al. Carica virale di SARS-CoV-2 in campioni respiratori superiori di pazienti infetti. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1177-1179 (2020).
29. Killingley, B. et al. Sicurezza, tollerabilità e cinetica virale durante il challenge di SARS-CoV-2 umano in giovani adulti. *Nat. Med.* **28**, 1031-1041 (2022).
30. Yu, F. et al. Rilevazione quantitativa e analisi della carica virale del SARS-CoV-2 nei pazienti infetti di . *Clin. Infetto. Dis.* **71**, 793-798 (2020).
31. Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie e Ufficio regionale dell'Organizzazione mondiale della sanità per l'Europa. Metodi per il rilevamento e l'identificazione delle varianti del SARS-CoV-2 : secondo aggiornamento, agosto 2022 (OMS, 2022).
32. Ke, R. et al. L'analisi longitudinale delle infezioni da vaccino SARS-CoV-2 rivela uno spargimento limitato del virus infettivo e una distribuzione tissutale limitata. *Forum aperto Infetti. Dis.* **9**, ofac192 (2022).
33. Ke, R. et al. Il campionamento longitudinale giornaliero dell'infezione da SARS-CoV-2 rivela una sostanziale eterogeneità nella contagiosità. *Nat. Microbiol.* **7**, 640-652 (2022).
34. Pekosz, A. et al. I test basati sull'antigene ma non la reazione a catena della polimerasi in tempo reale correlano con la cultura virale del coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave. *Clin. Infetto. Dis.* **73**, e2861-e2866 (2021).
35. Monel, B. et al. Rilascio di virus infettivo e citochine in tamponi nasofaringei di individui infettati con varianti SARS-CoV-2 non alfa o alfa: uno studio retrospettivo osservazionale. *EBioMedicine* **73**, 103637 (2021).
36. Kirby, J. E. et al. I test per l'antigene della SARS-CoV-2 predicono l'infettività sulla base della cultura virale: confronto tra antigene, carica virale PCR e test di cultura virale su un'ampia coorte di campioni. *Clin. Microbiol. Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.07.010> (2022).
37. Pickering, S. et al. Prestazioni comparative dei test per l'antigene a flusso laterale SARS-CoV-2 e associazione con la rilevazione del virus infettivo nei campioni clinici: uno studio di valutazione di un laboratorio monocentrico. *Lancet Microbe* **2**, e461-e471 (2021).
38. Tariq, M. et al. Gli isolati vitali di coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave 2 presentano una maggiore correlazione con i test rapidi dell'antigene rispetto all'RNA subgenomico o all'RNA genomico. *Anteriore. Microbiol.* **12**, 718497 (2021).
39. Chu, V. T. et al. Confronto del test antigenico domiciliare con RT-PCR e cultura virale durante il decorso dell'infezione da SARS-CoV-2. *JAMA Intern. Med.* **182**, 701-709 (2022).
40. Albert, E. et al. Valutazione sul campo di un test rapido all'antigene (Panbio™ COVID-19 Ag rapid test device) per la diagnosi di COVID-19 nei centri di assistenza sanitaria primaria. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 472.e7-472.e10 (2021).
41. Ford, L. et al. Caratteristiche epidemiologiche associate ai risultati dei test basati sull'antigene della sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus 2 (SARS-CoV-2), ai valori di soglia del ciclo della reazione a catena della polimerasi con trascrizione inversa in tempo reale (rRT-PCR), all'RNA subgenomico e ai risultati delle colture virali dei test universitari. *Clin. Infetto. Dis.* **73**, e1348-e1355 (2021).
42. Berger, A. et al. L'accuratezza diagnostica di due prodotti commerciali che rilevano l'antigene della SARS-CoV-2 test rapidi presso il punto di assistenza nei centri di analisi della comunità. *PLoS ONE* **16**, e0248921 (2021).
43. Bruemmer, L. E. et al. Accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: a living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* **18**, e1003735 (2021).
44. Ngo Nsoga, M. T. et al. Accuratezza diagnostica dei test rapidi all'antigene Panbio sui tamponi orofaringei per il rilevamento del SARS-CoV-2. *PLoS ONE* **16**, e0253321 (2021).
45. Korenkov, M. et al. Valutazione di un test antigenico rapido per rilevare l'infezione da SARS-CoV-2 e identificare individui potenzialmente infettivi. *J. Clin. Microbiol.* **59**, e0089621 (2021).
46. Yamayoshi, S. et al. Confronto tra test rapidi dell'antigene per COVID-19. *Virus* **12**, 1420 (2020).
47. McKay, S. L. et al. Valutazione delle prestazioni del test rapido seriale dell'antigene SARS-CoV-2 durante un'epidemia in una casa di cura. *Ann. Stagista. Med.* **174**, 945-951 (2021).
48. Nordgren, J. et al. Test rapido per l'antigene SARS-CoV-2: alta sensibilità per rilevare il virus infettivo. *J. Clin. Virol.* **140**, 104846 (2021).
49. Fernandez-Montero, A. & Argemi, J. Validazione di un test rapido all'antigene come strumento di screening per l'infezione da SARS-CoV-2 in popolazioni asintomatiche. Sensibilità, specificità e valori predittivi. *EClinicalMedicine* **37**, 100954 (2021).
50. Currie, D. W. et al. Relazione tra l'antigene SARS-CoV-2 e la PCR a trascrizione inversa positività per le colture virali. *Emerg. Infetto. Dis.* **28**, 717-720 (2022).
51. Corman, V. M. et al. Confronto tra sette test rapidi per l'antigene SARS-CoV-2 in commercio: uno studio di valutazione di laboratorio monocentrico. *Lancet Microbe* **2**, e311-e319 (2021).
52. Lopera, T. J. & Alzate-Ángel, J. C. L'utilità del test dell'antigene nel prevedere la contagiosità di in COVID-19. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0196221 (2022).
53. Osterman, A. et al. Rilevazione compromessa dell'Omicron da parte dei test rapidi dell'antigene SARS-CoV-2. *Med. Microbiol. Immunol.* **211**, 105-117 (2022).
54. Galliez, R. M. et al. Valutazione del test diagnostico rapido dell'antigene Panbio COVID-19 in soggetti infettati da Omicron utilizzando diversi campioni. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0125022 (2022).
55. Raich-Regué, D. et al. Prestazioni dei test diagnostici rapidi per la rilevazione dell'antigene SARS-CoV-2 per Omicron e altre varianti problematiche. *Anteriore. Microbiol.* **13**, 810576 (2022).
56. van Ogtrop, M. L., van de Laar, T. J. W., Eggink, D., Vanhommerig, J. W. & van der Reijden, W. A. Confronto delle prestazioni dei test antigenici Panbio COVID-19 nelle varianti B.1.1.7 (alfa) della SARS-CoV-2 rispetto alle varianti non B.1.1.7. *Microbiol. Spectr.* **9**, e0088421 (2021).

Articolo di recensione

57. Lindner, A. K. et al. Confronto testa a testa tra il test rapido per la rilevazione dell'antigene della SARS-CoV-2 con tampone nasale raccolto autonomamente e tampone nasofaringeo raccolto da un professionista. *Eur. Respir. J.* **57**, 2003961 (2021).
58. Meiners, L. & Horn, J. Sensibilità del test rapido all'antigene della SARS-CoV-2 e carica virale in dipendenti ospedalieri appena sintomatici, da dicembre 2020 a febbraio 2022. Preprint su <https://doi.org/10.2139/ssrn.4099425> (2022).
59. He, X. et al. Dinamiche temporali nello shedding virale e nella trasmissibilità di COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 672-675 (2020).
60. Néant, N. et al. Modellazione della cinetica virale della SARS-CoV-2 e associazione con la mortalità nei pazienti ospedalizzati della coorte francese COVID. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **118**, e2017962118 (2021).
61. Owusu, D. et al. SARS-CoV-2 RNA shedding persistente senza evidenza di infettività: uno studio di coorte di individui con COVID-19. *J. Infect. Dis.* **224**, 1362-1371 (2021).
62. Cevik, M. et al. Dinamica della carica virale di SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV, durata dello shedding virale e contagiosità: revisione sistematica e meta-analisi. *Lancet Microbe* **2**, e13-e22 (2021).
63. Chen, X. et al. Associazioni delle caratteristiche cliniche e dei regimi di trattamento con la durata dello shedding dell'RNA virale in pazienti affetti da COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.* **98**, 252-260 (2020).
64. Kim, S. M. & Hwang, Y. J. Rilevamento prolungato del SARS-CoV-2 e risultati inversi della RT-PCR in pazienti lievi o asintomatici. *Infect. Dis.* **53**, 31-37 (2021).
65. Talmy, T. & Tsur, A. Durata del rilevamento della SARS-CoV-2 nei soldati delle forze di difesa israeliane con COVID-19 lieve. *J. Med. Virol.* **93**, 608-610 (2021).
66. Singanayagam, A. et al. Durata dell'infettività e correlazione con i valori soglia dei cicli RT-PCR nei casi di COVID-19, Inghilterra, da gennaio a maggio 2020. *Euro Surveill.* <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483> (2020).
67. Perera, R. et al. Coltura del virus SARS-CoV-2 e RNA subgenomico per campioni respiratori da pazienti con malattia da coronavirus lieve. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 2701-2704 (2020).
68. Killerby, M. E. et al. Diffusione del virus coltivabile, sieroconversione e risposte anticorpali a 6 mesi di follow-up nei primi 14 casi confermati di malattia da coronavirus del 2019 negli Stati Uniti. *J. Infect. Dis.* **224**, 771-776 (2021).
69. Glans, H. et al. Shedding di SARS-CoV-2 infettiva da parte di pazienti COVID-19 ospedalizzati in relazione alle risposte anticorpali sieriche. *BMC Infect. Dis.* **21**, 494 (2021).
70. Badu, K. et al. SARS-CoV-2 viral shedding and transmission dynamics: implications of WHO COVID-19 discharge guidelines. *Anteriore. Med.* **8**, 648660 (2021).
71. Munker, D. et al. La dinamica dello spargimento di SARS-CoV-2 nel tratto respiratorio dipende da la gravità della malattia in pazienti COVID-19. *Eur. Respir. J.* **58**, 2002724 (2021).
72. Folgueira, M. D. & Luczkowiak, J. Prolungata replicazione cellulare del SARS-CoV-2 in campioni respiratori di pazienti con COVID-19 grave. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 886-891 (2021).
73. Kim, M. C. et al. Durata della coltura di SARS-CoV-2 in pazienti ospedalizzati con Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **384**, 671-673 (2021).
74. Chen, P. Z. et al. Dinamiche di diffusione del SARS-CoV-2 attraverso il tratto respiratorio, il sesso e la gravità della malattia per COVID-19 adulti e pediatrici. *eLife* <https://doi.org/10.7554/eLife> (2021).
75. Cunha, M. D. P. et al. Shedding virale atipico e prolungato con evoluzione intra-ospite del SARS-CoV-2 in un paziente sintomatico lievemente colpito. *Anteriore. Med.* **8**, 760170 (2021).
76. Aydllo, T. et al. Shedding di SARS-CoV-2 virale dopo la terapia immunosoppressiva per il cancro. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2586-2588 (2020).
77. Caillard, S., Benotmane, I., Gautier Vargas, G., Perrin, P. & Fafi-Kremer, S. Dinamiche virali della SARS-CoV-2 in pazienti immunocompromessi. *Am. J. Transpl.* **21**, 1667-1669 (2021).
78. Roedel, K. et al. Dinamica virale del SARS-CoV-2 nei riceventi di trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche in condizioni critiche e nei pazienti immunocompetenti con COVID-19. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **203**, 242-245 (2021).
79. Leung, W. F. et al. COVID-19 in un ospite immunocompromesso: diffusione persistente di SARS-CoV-2 virale e comparsa di mutazioni multiple: un case report. *Int. J. Infect. Dis.* **114**, 178-182 (2022).
80. Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie. Valutazione rapida del rischio: valutazione della circolazione della SARS-CoV-2, delle varianti che destano preoccupazione, degli interventi non farmacologici e dell'introduzione del vaccino nell'UE/SEE, 15° aggiornamento (Centro europeo per la prevenzione delle malattie e il controllo di , 2021).
81. Grant, R. et al. Impatto della variante Delta del SARS-CoV-2 sull'incubazione, sulle impostazioni di trasmissione e sull'efficacia del vaccino: risultati di uno studio caso-controllo su scala nazionale in Francia. *Lancet Reg. Health Eur.* **13**, 100278 (2022).
82. Ogata, T. & Tanaka, H. Periodo di incubazione più breve tra i pazienti non vaccinati affetti da malattia da coronavirus variante Delta 2019 in Giappone. *Int. J. Environ. Res. Public Health* <https://doi.org/10.3390/ijerph19031127> (2022).
83. Backer, J. A. et al. Intervalli seriali più brevi nei casi di SARS-CoV-2 con variante Omicron BA.1 rispetto alla variante Delta, Paesi Bassi, 13-26 dicembre 2021. *Eur. Surveill.* <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.6.2200042> (2022).
84. Takahashi, K. et al. Durata dello shedding del virus infettivo da parte di vaccinati affetti da SARS-CoV-2 Omicron variante. *Emerg. Infect. Dis.* **28**, 998-1001 (2022).
85. Boucau, J. et al. Durata dello spargimento di virus coltivabile nell'infezione da SARS-CoV-2 Omicron (BA.1). *N. Engl. J. Med.* **387**, 275-277 (2022).
86. Jones, T. C. et al. Stima della contagiosità nel corso dell'infezione da SARS-CoV-2. *Scienza* <https://doi.org/10.1126/science.abi5273> (2021).
87. Li, B. et al. Infezione virale e trasmissione in un grande focolaio ben tracciato causato dalla variante Delta del SARS-CoV-2. *Nat. Commun.* **13**, 460 (2022).

- Articolo di
recensione**
88. Bolze, A. et al. La variante Delta del SARS-CoV-2 ha rapidamente soppiantato la variante Alpha negli Stati Uniti e ha portato a cariche virali più elevate. *Cell Rep. Med.* **3**, 100564 (2022).
89. Earnest, R. et al. Trasmissibilità comparata delle varianti Delta e Alpha del SARS-CoV-2 negli Stati Uniti. *Cell Rep. Med.* **3**, 100583 (2022).
90. Luo, C. H. et al. L'infezione con la variante Delta del SARS-CoV-2 è associata a un maggiore recupero del virus infettivo rispetto alla variante Alfa sia in individui non vaccinati che in quelli vaccinati con il sito. *Clin. Infetto. Dis.* **75**, e715-e725 (2021).
91. Despres, H. W. et al. La misurazione del SARS-CoV-2 infettivo in campioni clinici rivela un titolo virale più elevato: rapporto RNA per le varianti Delta ed Epsilon rispetto alle varianti Alpha. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* <https://doi.org/10.1073/pnas.2116518119> (2022).
92. Hay, J. A. et al. Quantificare l'impatto dell'anamnesi e della variante immunitaria sulla cinetica virale della SARS-CoV-2 e sul rimbalzo dell'infezione: uno studio retrospettivo di coorte. *eLife* **11**, e81849 (2022).
93. Fall, A. et al. Lo spostamento della variante Delta del SARS-CoV-2 con Omicron: un'indagine sui ricoveri ospedalieri e sulle cariche virali delle vie respiratorie superiori. *EbioMedicine* <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104008> (2022).
94. Lentini, A. & Pereira, A. Il monitoraggio della transizione del lignaggio SARS-CoV-2 Omicron BA.1/BA.2 nella popolazione svedese rivela un aumento dei livelli di RNA virale nei casi BA.2. *Med* **3**, 636-664 (2022).
95. Qassim, S. H. et al. Effetti della sottovariante BA.1/BA.2, della vaccinazione e dell'infezione precedente sulla contagiosità delle infezioni da SARS-CoV-2 Omicron. *J. Travel Med.* **29**, taac068 (2022).
96. Marking, U. et al. Correlazioni della protezione, traiettorie della carica virale e sintomi nelle infezioni da breakthrough BA.1, BA.1.1 e BA.2 in operatori sanitari con tripla vaccinazione. Preprint presso *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2022.04.02.22273333> (2022).
97. Wang, Y. et al. Trasmissione, cinetica virale e caratteristiche cliniche dell'emergente SARS-CoV-2 Delta VOC a Guangzhou, Cina. *EClinicalMedicine* **40**, 101129 (2021).
98. Siedner, M. J. et al. Durata dello shedding virale e positività della coltura con infezioni postvaccinazione da SARS-CoV-2 variante delta. *JCI Insight* <https://doi.org/10.1172/jci.insight.155483> (2022).
99. Pierce, C. A. et al. Risposte immunitarie all'infezione da SARS-CoV-2 in pazienti pediatrici e adulti ospedalizzati. *Sci. Transl. Med.* **12**, eabd5487 (2020).
100. Takahashi, T. et al. Differenze di sesso nelle risposte immunitarie alla base dei risultati della malattia COVID-19. *Nature* **588**, 315-320 (2020).
101. Bunyavanich, S., Do, A. & Vencio, A. Espressione genica nasale dell'enzima 2 di conversione dell'angiotensina in bambini e adulti. *JAMA* **323**, 2427-2429 (2020).
102. Zheng, S. et al. Dinamica della carica virale e gravità della malattia in pazienti infettati con SARS-CoV-2 nella provincia di Zhejiang, Cina, gennaio-marzo 2020: studio retrospettivo di coorte. *BMJ* **369**, m1443 (2020).
103. L'Huillier, A. G. & Torriani, G. SARS-CoV-2 coltura-competente nel nasofaringe di neonati, bambini e adolescenti sintomatici. *Emerg. Infetto. Dis.* **26**, 2494-2497 (2020).
104. Baggio, S. et al. Carica virale del coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) nel tratto respiratorio superiore di bambini e adulti con malattia acuta precoce da coronavirus 2019 (COVID-19). *Clin. Infetto. Dis.* **73**, 148-150 (2021).
105. Chung, E. et al. Confronto dei sintomi e dei livelli di RNA in bambini e adulti con infezione da SARS-CoV-2 in ambito comunitario. *JAMA Pediatr.* **175**, e212025 (2021).
106. Han, M. S. et al. Caratteristiche cliniche e rilevamento dell'RNA virale nei bambini con malattia da coronavirus 2019 nella Repubblica di Corea. *JAMA Pediatr.* **175**, 73-80 (2021).
107. Bellon, M. et al. Cinetica della carica virale del coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) in bambini, adolescenti e adulti sintomatici. *Clin. Infetto. Dis.* **73**, e1384-e1386 (2021).
108. Madera, S. et al. Le cariche virali nasofaringee del SARS-CoV-2 nei bambini piccoli non differiscono significativamente da quelle dei bambini più grandi e degli adulti. *Sci. Rep.* **11**, 3044 (2021).
109. Lauer, S. A. et al. Il periodo di incubazione della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) da casi confermati riportati pubblicamente: stima e applicazione. *Ann. Stagista. Med.* **172**, 577-582 (2020).
110. Elias, C., Sekri, A., Leblanc, P., Cucherat, M. & Vanhems, P. Il periodo di incubazione di COVID-19: una meta-analisi. *Int. J. Infetto. Dis.* **104**, 708-710 (2021).
111. Dhoub, W. et al. Il periodo di incubazione durante la pandemia di COVID-19: una revisione sistematica e una meta-analisi. *Syst. Rev.* **10**, 101 (2021).
112. Brandal, L. T. et al. Epidemia causata dalla variante SARS-CoV-2 Omicron in Norvegia, novembre-dicembre 2021. *Eur. Sorvegliare.* **26**, 2101147 (2021).
113. Wu, Y. et al. Periodo di incubazione della COVID-19 causata da ceppi unici di SARS-CoV-2: una revisione sistematica e una meta-analisi. *JAMA Netw. Open* **5**, e2228008 (2022).
114. Sun, K. et al. Eterogeneità di trasmissione, cinetica e controllabilità della SARS-CoV-2. *Science* **371**, eabe2424 (2021).
115. Lavezzo, E. et al. Soppressione di un focolaio di SARS-CoV-2 nel comune italiano di Vo'. *Nature* **584**, 425-429 (2020).
116. Gudbjartsson, D. F. et al. Diffusione della SARS-CoV-2 nella popolazione islandese. *N. Engl. J. Med.* **382**, 2302-2315 (2020).
117. Glenet, M. et al. Pazienti adulti ambulatoriali COVID-19 asintomatici identificati come importanti diffusori virali di SARS-CoV-2. *Sci. Rep.* **11**, 20615 (2021).
118. Wang, Y. et al. Caratterizzazione di una coorte asintomatica di individui infettati dal coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) al di fuori di Wuhan, Cina. *Clin. Infetto. Dis.* **71**, 2132-2138 (2020).
119. Long, Q. X. et al. Valutazione clinica e immunologica delle infezioni asintomatiche da SARS-CoV-2. *Nat. Med.* **26**, 1200-1204 (2020).
120. Lee, S. et al. Decorso clinico e shedding virale molecolare tra i pazienti asintomatici e sintomatici con infezione da SARS-CoV-2 in un centro di trattamento comunitario nella Repubblica di Corea. *JAMA Intern. Med.* **180**, 1447-1452 (2020).

Articolo di recensione

121. Zhou, R. et al. Dinamica virale in pazienti asintomatici affetti da COVID-19. *Int. J. Infetto. Dis.* **96**, 288-290 (2020).
122. Hall, S. M. et al. Confronto dei valori della TC delle narici anteriori in individui asintomatici e sintomatici con diagnosi di SARS-CoV-2 in un programma di screening universitario. *PLoS ONE* **17**, e0270694 (2022).
123. Kissler, S. M. et al. Dinamiche virali dell'infezione acuta da SARS-CoV-2 e applicazioni a strategie diagnostiche e di salute pubblica. *PLoS Biol.* **19**, e3001333 (2021).
124. Tallmadge, R. L. et al. Carico di RNA virale e infettività del SARS-CoV-2 in campioni respiratori e orali accoppiati di individui sintomatici, asintomatici o postsintomatici. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0226421 (2022).
125. Marks, M. et al. Trasmissione di COVID-19 in 282 cluster in Catalogna, Spagna: uno studio di coorte. *Lancet Infect. Dis.* **21**, 629-636 (2021).
126. Marc, A. et al. Quantificazione della relazione tra carica virale di SARS-CoV-2 e infettività. *eLife* <https://doi.org/10.7554/eLife.69302> (2021).
127. Cheng, H. Y. et al. Valutazione della dinamica di trasmissione della COVID-19 a Taiwan e del rischio in diversi periodi di esposizione prima e dopo la comparsa dei sintomi. *JAMA Intern. Med.* **180**, 1156-1163 (2020).
128. Muggleston, M. A. et al. Trasmissione presintomatica, asintomatica e post-sintomatica del SARS-CoV-2: guida congiunta di British Infection Association (BIA), Healthcare Infection Society (HIS), Infection Prevention Society (IPS) e Royal College of Pathologists (RCPATH). *BMC Infect. Dis.* **22**, 453 (2022).
129. Eyre, D. W. et al. Effetto della vaccinazione Covid-19 sulla trasmissione di Alpha e Delta varianti. *N. Engl. J. Med.* **386**, 744-756 (2022).
130. Prunas, O. et al. La vaccinazione con BNT162b2 riduce la trasmissione della SARS-CoV-2 ai contatti domestici in Israele. *Science* **375**, 1151-1154 (2022).
131. Lyngse, F. P. et al. Trasmissione domestica della variante SARS-CoV-2 Omicron delle sottovarianti BA.1 e BA.2 in Danimarca. *Nat. Commun.* **13**, 5760 (2022).
132. Leung, N. H. L. Trasmissibilità e trasmissione dei virus respiratori. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 528-545 (2021).
133. Alihsan, B. et al. L'efficacia delle mascherine nella prevenzione della COVID-19: una revisione sistematica. Preprint su *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2022.07.28.22278153> (2022).
134. Hu, Z. et al. Marcatori immunitari precoci di esiti clinici, virologici e immunologici in pazienti con COVID-19: uno studio multiomico. *eLife* **11**, e77943 (2022).
135. Chen, P. Z. et al. Eterogeneità nella trasmissibilità e nello spargimento di SARS-CoV-2 tramite goccioline e aerosol. *eLife* <https://doi.org/10.7554/eLife.65774> (2021).
136. Adam, D. C. et al. Clustering and superspreading potential of SARS-CoV-2 infections in Hong Kong. *Nat. Med.* **26**, 1714-1719 (2020).
137. Guo, Z. et al. Potenziale di diffusione dell'infezione seminata dalla variante SARS-CoV-2 Omicron BA.1 in Corea del Sud. *J. Infect.* **85**, e77-e79 (2022).
138. Guo, Z. et al. Potenziale di diffusione del focolaio COVID-19 seminato da varianti Omicron di SARS-CoV-2 a Hong Kong. *J. Travel Med.* **29**, taac049 (2022).
139. Althouse, B. M. et al. Eventi di superdiffusione nelle dinamiche di trasmissione della SARS-CoV-2: opportunità per interventi e controlli. *PLoS Biol.* **18**, e3000897 (2020).
140. Baden, L. R. et al. Efficacia e sicurezza del vaccino SARS-CoV-2 mRNA-1273. *N. Engl. J. Med.* **384**, 403-416 (2021).
141. Lopez Bernal, J. et al. Efficacia dei vaccini Covid-19 contro la variante B.1.617.2 (Delta). *N. Engl. J. Med.* **385**, 585-594 (2021).
142. Feikin, D. R. et al. Durata dell'efficacia dei vaccini contro l'infezione da SARS-CoV-2 e la malattia COVID-19: risultati di una revisione sistematica e di una meta-regressione. *Lancet* **399**, 924-944 (2022).
143. Belik, M. et al. Analisi comparativa delle risposte al vaccino COVID-19 e degli anticorpi neutralizzanti indotti dalla terza dose di richiamo contro le varianti Delta e Omicron. *Nat. Commun.* **13**, 2476 (2022).
144. Pegu, A. et al. Durata degli anticorpi indotti dal vaccino mRNA-1273 contro le varianti del SARS-CoV-2. *Science* **373**, 1372-1377 (2021).
145. Lipsitch, M., Krammer, F., Regev-Yochay, G., Lustig, Y. & Balicer, R. D. Infezioni da SARS-CoV-2 in soggetti vaccinati: misura, cause e impatto. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 57-65 (2022).
146. Mostaghimi, D., Valdez, C. N., Larson, H. T., Kalinich, C. C. & Iwasaki, A. Prevenzione della trasmissione da ospite a ospite mediante vaccini SARS-CoV-2. *Lancet Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00472-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00472-2) (2021).
147. Russell, M. W., Moldoveanu, Z., Ogra, P. L. & Mestecky, J. Immunità mucosale in COVID-19: un aspetto trascurato ma critico dell'infezione da SARS-CoV-2. *Anticorp. Immunol.* **11**, 611337 (2020).
148. Sheikh-Mohamed, S. et al. Le risposte IgA sistemiche e mucosali sono variabilmente indotte in risposta alla vaccinazione con SARS-CoV-2 mRNA e sono associate alla protezione contro la successiva infezione. *Mucosal Immunol.* **15**, 799-808 (2022).
149. Collier, A. Y. et al. Caratterizzazione delle risposte immunitarie in individui completamente vaccinati dopo l'infezione di breakthrough con la variante Delta del SARS-CoV-2. *Sci. Transl. Med.* **14**, eabn6150 (2022).
150. Pouwels, K. B. et al. Effetto della variante Delta sulla carica virale e sull'efficacia del vaccino contro le nuove infezioni da SARS-CoV-2 nel Regno Unito. *Nat. Med.* **27**, 2127-2135 (2021).
151. Singanayagam, A. et al. Trasmissione comunitaria e cinetica della carica virale della variante SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) in individui vaccinati e non vaccinati nel Regno Unito: uno studio prospettico, longitudinale e di coorte. *Lancet Infect. Dis.* **22**, 183-195 (2021).
152. Levine-Tiefenbrun, M. et al. Cariche virali di infezioni da SARS-CoV-2 con variante Delta, dopo la vaccinazione e il richiamo con BNT162b2. *Nat. Med.* **27**, 2108-2110 (2021).
153. Emary, K. R. W. et al. Efficacia del vaccino ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) contro la variante SARS-CoV-2 di interesse 202012/01 (B.1.1.7): analisi esplorativa di uno studio randomizzato controllato. *Lancet* **397**, 1351-1362 (2021).

154. Chia, P. Y. et al. Cinetica virologica e sierologica delle infezioni da SARS-CoV-2: un confronto tra vaccinati e non vaccinati: uno studio di coorte multicentrico. *Clin. Microbiol. Infect.* **25**, 612.e1-612.e7 (2021).
155. Garcia-Knight, M. et al. Shedding virale infettivo di SARS-CoV-2 Delta dopo vaccinazione: studio longitudinale di coorte. *PLoS Pathog.* **18**, e1010802 (2022).
156. Peña-Hernández, M. A. et al. Confronto dell'infettività del SARS-CoV-2 dal rinofaringe di individui vaccinati e non vaccinati. Preprint su *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.12.28.21268460> (2022).
157. Shamier, M. C. et al. Caratteristiche virologiche delle infezioni da vaccino SARS-CoV-2 negli operatori sanitari. Preprint su *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.08.20.21262158> (2021).
158. Jung, J. et al. Cinetiche di trasmissione e di diffusione infettiva del SARS-CoV-2 in individui vaccinati e non vaccinati. *JAMA Netw. Open* **5**, e2213606 (2022).
159. Hirotsu, Y. et al. Cariche virali simili nelle infezioni da Omicron indipendentemente dallo stato di vaccinazione. Preprint su *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2022.04.19.22274005> (2022).
160. Letizia, A. G. et al. Sieropositività al SARS-CoV-2 e successivo rischio di infezione in giovani adulti sani : uno studio prospettico di coorte. *Lancet Respir. Med.* **9**, 712-720 (2021).
161. Pulliam, J. R. C. et al. Aumento del rischio di reinfezione da SARS-CoV-2 associato all'emergenza di Omicron in Sudafrica. *Science* **376**, eabn4947 (2022).
162. Harris, R. J. et al. Effetto della vaccinazione sulla trasmissione domestica della SARS-CoV-2 in Inghilterra. *N. Engl. J. Med.* **385**, 759-760 (2021).
163. Bates, T. A. et al. La vaccinazione prima o dopo l'infezione da SARS-CoV-2 porta a una robusta risposta umorale e ad anticorpi che neutralizzano efficacemente le varianti. *Sci. Immunol.* **7**, eabn8014 (2022).
164. Wrátil, P. R. et al. Tre esposizioni alla proteina spike del SARS-CoV-2, tramite infezione o vaccinazione, generano un'immunità neutralizzante superiore a tutte le varianti in questione. *Nat. Med.* **28**, 496-503 (2022).
165. Malato, J. et al. Rischio di infezione BA.5 tra le persone esposte a precedenti varianti di SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* **387**, 953-954 (2022).
166. Cao, Y. et al. BA.2.12.1, BA.4 e BA.5 sfuggono agli anticorpi provocati dall'infezione da Omicron. *Nature* **608**, 593-602 (2022).
167. Hassan, A. O. et al. Un vaccino ChAd intranasale a dose singola protegge le vie respiratorie superiori e inferiori contro il SARS-CoV-2. *Cell* **183**, 169-184 (2020).
168. Lapuente, D. et al. Immunità protettiva della mucosa contro il SARS-CoV-2 dopo l'immunizzazione eterologa sistemica di tipo prime-mucosal boost. *Nat. Commun.* **12**, 6871 (2021).
169. Afkhami, S. et al. La somministrazione alla mucosa respiratoria del vaccino COVID-19 di nuova generazione fornisce una solida protezione contro i ceppi ancestrali e varianti del SARS-CoV-2. *Cell* **185**, 896-915 (2022).
170. Grubaugh, N. D. & Hodcroft, E. B. Azioni di sanità pubblica per controllare le nuove varianti di SARS-CoV-2. *Cell* **184**, 1127-1132 (2021).
171. Carreño, J. M. et al. Attività del siero di convalescenza e del vaccino contro il SARS-CoV-2 Omicron. *Nature* **602**, 682-688 (2022).
172. Ashcroft, P., Lehtinen, S. e Bonhoeffer, S. Strategie di intervento Test-trace-isolate-quarantine (TTIQ) dopo l'identificazione di un caso COVID-19 sintomatico. *PLoS ONE* **17**, e0263597 (2022).
173. Santos Bravo, M. et al. La coltura virale ha confermato il valore dell'RNA subgenomico della SARS-CoV-2 come buon marker surrogato di infettività. *J. Clin. Microbiol.* **60**, e0160921 (2022).
174. Kim, J. Y. et al. Utilità diagnostica del rilevamento dell'RNA subgenomico del SARS-CoV-2 vitale in pazienti con COVID-19. *Clin. Microbiol. Infect.* **28**, 101-106 (2022).
175. Alexandersen, S. & Chamings, A. Gli RNA genomici e subgenomici del SARS-CoV-2 nei campioni diagnostici non sono un indicatore di replicazione attiva. *Nat. Commun.* **11**, 6059 (2020).
176. Bonenfant, G. et al. Sorveglianza e correlazione dell'RNA virale della SARS-CoV-2, dell'antigene, dell'isolamento del virus e dei sintomi auto-riferiti in uno studio longitudinale con campionamento giornaliero. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciac282> (2022).
177. Peeling, R. W., Heymann, D. L., Teo, Y. Y. & Garcia, P. J. Diagnostica per COVID-19: passare dalla risposta alla pandemia al controllo. *Lancet* **399**, 757-768 (2022).
178. Pilarowski, G. et al. Caratteristiche di prestazione di un test rapido per la rilevazione dell'antigene del coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave in una piazza pubblica di San Francisco. *J. Infect. Dis.* **223**, 1139-1144 (2021).
179. Leber, W. et al. Confronto dell'accuratezza diagnostica del test dell'antigene a flusso laterale point-of-care per la SARS-CoV-2 con la RT-PCR nell'assistenza primaria (REAP-2). *EClinicalMedicine* **38**, 101011 (2021).
180. Kohmer, N. et al. Le prestazioni cliniche comparative di quattro test rapidi per l'antigene SARS-CoV-2 e la loro correlazione con l'infettività in vitro. *J. Clin. Med.* <https://doi.org/10.3390/jcm10020328> (2021).
181. Wang, W. et al. Rilevamento del SARS-CoV-2 in diversi tipi di campioni clinici. *JAMA* **323**, 1843-1844 (2020).
182. Lee, R. A., Herigon, J. C., Benedetti, A., Pollock, N. R. & Denkinger, C. M. Performance di saliva, tamponi orofaringei e nasali per la rilevazione molecolare del SARS-CoV-2: una revisione sistematica e una meta-analisi. *J. Clin. Microbiol.* **59**, e02881-20 (2021).
183. Tsang, N. N. Y. et al. Prestazioni diagnostiche di diversi approcci di campionamento per il test SARS-CoV-2 RT-PCR: una revisione sistematica e una meta-analisi. *Lancet Infect. Dis.* **21**, 1233-1245 (2021).
184. Peto, T. COVID-19: rilevamento rapido dell'antigene per la SARS-CoV-2 mediante test a flusso laterale: una valutazione sistematica nazionale della sensibilità e della specificità per il test di massa. *EClinicalMedicine* **36**, 100924 (2021).
185. Hay, J. A. et al. Stima delle dinamiche epidemiologiche dalle distribuzioni trasversali della carica virale. *Science* **373**, eabh0635 (2021).

Articolo di recensione

186. Peccia, J. et al. La misurazione dell'RNA della SARS-CoV-2 nelle acque reflue traccia le dinamiche di infezione della comunità. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1164-1167 (2020).
187. Xin, H. et al. La distribuzione del periodo di incubazione della malattia da coronavirus 2019: una revisione sistematica e una meta-analisi. *Clin. Infetto. Dis.* **73**, 2344-2352 (2021).
188. Yu, I. T. et al. Prove di trasmissione aerea del virus della sindrome respiratoria acuta grave. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1731-1739 (2004).
189. Cheng, P. K. et al. Modelli di diffusione virale del coronavirus in pazienti con probabile sindrome respiratoria acuta grave. *Lancet* **363**, 1699-1700 (2004).
190. Peiris, J. S. et al. Progressione clinica e carica virale in un focolaio comunitario di polmonite da SARS associata a coronavirus: uno studio prospettico. *Lancet* **361**, 1767-1772 (2003).
191. Chan, P. K. S. et al. Diagnosi di laboratorio della SARS. *Emerg. Infetto. Dis.* **10**, 825-831 (2004).
192. Liu, W. et al. Escrezione a lungo termine di coronavirus della SARS da una coorte di pazienti, Cina. *Emerg. Infetto. Dis.* **10**, 1841-1843 (2004).
193. Xu, D. et al. Diffusione persistente di SARS-CoV vitale nelle urine e nelle feci di pazienti con SARS durante la fase di convalescenza. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**, 165-171 (2005).
194. V'Kovski, P. et al. Dinamiche virus-ospite dipendenti dalla temperatura diverse per il SARS-CoV-2 e il SARS-CoV nell'epitelio respiratorio umano. *PLoS Biol.* **19**, e3001158 (2021).
195. Pitzer, V. E., Leung, G. M. & Lipsitch, M. Stima della variabilità nella trasmissione della sindrome respiratoria acuta grave ai contatti domestici a Hong Kong, Cina. *Am. J. Epidemiol.* **166**, 355-363 (2007).
196. Riley, S. et al. Dinamiche di trasmissione dell'agente eziologico della SARS a Hong Kong: impatto degli interventi di sanità pubblica. *Science* **300**, 1961-1966 (2003).
197. Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. & Fouchier, R. A. Isolamento di un nuovo coronavirus da un uomo con polmonite in Arabia Saudita. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1814-1820 (2012).
198. Breban, R., Riou, J. & Fontanet, A. Trasmissibilità interumana del coronavirus della sindrome respiratoria del Medio Oriente: stima del rischio pandemico. *Lancet* **382**, 694-699 (2013).
199. Oh, M. D. et al. Cinetica della carica virale dell'infezione da coronavirus MERS. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1303-1305 (2016).
200. Corman, V. M. et al. Diffusione virale e risposta anticorpale in 37 pazienti con infezione da coronavirus della sindrome respiratoria del Medio Oriente. *Clin. Infetto. Dis.* **62**, 477-483 (2016).
201. Min, C.-K. et al. Analisi comparativa e cinetica dello shedding virale e delle risposte immunologiche in pazienti affetti da MERS che rappresentano un ampio spettro di gravità della malattia. *Sci. Rep.* **6**, 25359 (2016).
202. Ip, D. K. et al. Diffusione virale e potenziale di trasmissione delle infezioni asintomatiche e paucisintomatiche da virus influenzale nella comunità. *Clin. Infetto. Dis.* **64**, 736-742 (2017).
203. Carrat, F. et al. Linee temporali dell'infezione e della malattia nell'influenza umana: una revisione degli studi su volontari. *Am. J. Epidemiol.* **167**, 775-785 (2008).
204. Pawelek, K. A. et al. Modellazione delle dinamiche interne all'ospite dell'infezione da virus influenzale, comprese le risposte immunitarie. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002588 (2012).
205. Ip, D. K. M. et al. La relazione dinamica tra sintomatologia clinica e Lo shedding virale nelle infezioni da virus dell'influenza stagionale e pandemica acquisite naturalmente. *Clin. Infetto. Dis.* **62**, 431-437 (2016).
206. Nair, H. et al. Onere globale delle infezioni respiratorie acute inferiori dovute al virus respiratorio sinciziale nei bambini piccoli: una revisione sistematica e una meta-analisi. *Lancet* **375**, 1545-1555 (2010).
207. Bagga, B. et al. Il confronto delle dinamiche virali e di malattia dell'influenza e dell'RSV in adulti infettati sperimentalmente predice l'efficacia clinica degli antivirali per l'RSV. *Antivir. Ther.* **18**, 785-791 (2013).
208. DeVincenzo, J. P. et al. La carica virale guida la malattia negli esseri umani infettati sperimentalmente con il virus respiratorio sinciziale. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 1305-1314 (2010).
209. Kutter, J. S. et al. Piccole quantità di RNA del virus respiratorio sinciziale solo in grandi goccioline intorno a neonati ricoverati con infezioni respiratorie acute. *Antimicrob. Resistere. Infetto. Control* **10**, 100 (2021).

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano E. Boehm per l'aiuto nella ricerca della letteratura e nella correzione delle bozze. Il lavoro è stato finanziato dal Programma Nazionale di Ricerca COVID-19 (numero di sovvenzione 198412) del Fondo Nazionale Svizzero.

Contributi degli autori

O.P. e I.E. hanno scritto il manoscritto. B.M. ha creato le figure. Tutti gli autori hanno contribuito alla discussione dei contenuti e hanno rivisto e modificato il manoscritto prima dell'invio.

Interessi contrastanti

Gli autori non dichiarano interessi in competizione.

Informazioni aggiuntive

Informazioni supplementari La versione online contiene materiale supplementare disponibile su <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>.

La corrispondenza va indirizzata a Isabella Eckerle.

Informazioni sulla revisione paritaria *Nature Reviews Microbiology* ringrazia Nancy Leung, Quanyi Wang e gli altri revisori anonimi per il loro contributo alla revisione paritaria di questo lavoro.

Le informazioni per la ristampa e le autorizzazioni sono disponibili all'indirizzo www.nature.com/reprints.

Nota dell'editore Springer Nature rimane neutrale rispetto alle rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e alle affiliazioni istituzionali.

Springer Nature o il suo licenziatario (ad esempio una società o un altro partner) detiene i diritti esclusivi di questo articolo in base a un accordo di pubblicazione con l'autore o gli autori o altri titolari dei diritti; l'autoarchiviazione da parte dell'autore della versione manoscritta accettata di questo articolo è regolata esclusivamente dai termini di tale accordo di pubblicazione e dalla legge applicabile.

© Springer Nature Limited 2022

LETTERE

A cura di Jennifer Sills

Espressioni editoriali di preoccupazione

Nel 2001, *Science* ha pubblicato la relazione "Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation" di E. Stein *et al.*

(*I*). Nel 2015, gli autori ci hanno segnalato problemi con le immagini di Western blot nelle Figure 1 e 3, causati dalla piastrellatura con sovrapposizione di colonne adiacenti e dalla combinazione di immagini di blot per standardizzare le dimensioni del pannello. Gli autori hanno fornito immagini corrette, ma a causa Per un nostro errore, *Science* non ha mai pubblicato un Erratum. Ci rammarichiamo di questo errore e ci scusiamo con la comunità scientifica. Sia noi che gli autori siamo consapevoli che dal 2015 sono state sollevate ulteriori perplessità, per cui non procediamo a una correzione in questo momento, ma avvisiamo i lettori alle preoccupazioni, mentre gli autori e l'istituzione degli autori indagano ulteriormente.

H. Holden Thorp
Caporedattore

RIFERIMENTI E NOTE

1 E. Stein, Y. Zou, M.-M. Poo, M. Tessier-Lavigne, *Science* 291, 1976 (2001).

Publicato online il 15 dicembre 2022
10.1126/science.adg2852

Nel 2001, *Science* ha pubblicato la ricerca Articolo "Organizzazione gerarchica di

Recettori di guida: silenziamento dell'attrazione della netrina da parte di Slit attraverso un complesso di recettori Robo/DCC" di E. Stein e M. Tessier-Lavigne (*I*). Nel 2015, gli autori ci hanno segnalato problemi con le immagini di Western blot nelle figure 4, 5 e 6, causati dalla piastrellatura con sovrapposizione di immagini di blot per standardizzare le dimensioni del pannello. Gli autori hanno fornito immagini corrette per questi Western blot. Inoltre, le immagini sono state duplicate nella Figura 2D (micrografie) e nella Figura 4B (Western blot in bianco), mentre nella Figura 5E (in alto a destra) è stato utilizzato un pannello bianco incorporato. Non è stato possibile accedere ai dati originali di queste figure, pertanto non tutte le conclusioni specifiche

avvisando i lettori delle preoccupazioni, mentre gli autori e l'istituzione di appartenenza indagano ulteriormente.

H. Holden Thorp
Caporedattore

RIFERIMENTI E NOTE

E. Stein, M. Tessier-Lavigne, *Science* 291, 1928 (2001).

Publicato online il 15 dicembre 2022
10.1126/science.adg2860

Ritrattazione

Nell'articolo di ricerca "Gradual emergence followed by exponential spread of the SARS-CoV-2 Omicron variant in Africa" (*I*), abbiamo riportato i dati della caratterizzazione retrospettiva dei genomi virali di antenati putativi della variante SARS-CoV-2 Omicron provenienti dall'Africa occidentale mesi prima della prima rilevazione di Omicron. Dopo che diversi post sui social media hanno suggerito che queste sequenze dei primi antenati di Omicron potevano essere dei falsi positivi, abbiamo rianalizzato i dati. I nostri dati e dei campioni residui.

Noi abbiamo trovato una miscela di differenti SARS-CoV-2

frammenti genomici che contaminano alcuni

i campioni e i dati di sequenza su cui abbiamo basato la nostra analisi. I campioni residui sono ora esauriti, e la ricostruzione di intermedi evolutivi non può essere replicato. Pertanto, ritrattiamo il nostro articolo di ricerca. I dati epidemiologici non sono messi in discussione e saranno resi disponibili.

Carlo Fischer¹, Tongai Gibson Maponga², Anges Yadouleton³, Nuro Abílio⁴, Emmanuel Aboce⁵, Praise Adewumi³, Pedro Afonso⁶, Jewelna relative a questi pannelli sono supportate da queste figure. *Science* ha acconsentito alla pubblicazione di un Erratum che però, per un nostro errore, non è stato pubblicato. Ci rammarichiamo di questo errore e ci scusiamo con la comunità scientifica. Alla luce del ritardo, non stiamo procedendo con una correzione in questo momento ma stiamo

Nyanjom³⁸, Eddy Okoth Odari³⁸, Alfred Okeng⁵, Jean Bienvenue Ouoba¹⁹, Michael Owusu³⁹, Irene Owusu Donkor⁷, Karabo Kristen Phadu², Richard Odame Phillips³⁹, Wolfgang Preiser^{2,40}, Vurayai Ruhanya¹⁷, Fortune Salah²⁷, Sourakatou Salifou⁴¹, Amadou Alpha Sall²², Augustina Angelina Sylverken^{39,42}, Paul Alain Tagnouokam-Ngoupo²⁸, Zekiba Tarnagda¹⁹, Francis Olivier Tchikaya¹⁴, Tafese Beyene Tufa^{25,26}, Jan Felix Drexler^{1,24*}
¹Charité-Universitätsmedizin Berlin, a z i e n d a membro della Freie Universität di Berlino e dell'Università Humboldt di Berlino
Università di Berlino, Istituto di virologia, Berlino, Germania. ²Divisione di virologia medica, Facoltà di medicina e scienze della salute dell'Università di Stellenbosch, Città del Capo, Sudafrica. ³Laboratorio sulle malattie emorragiche virali di Cotonou, Akpakpa, Benin. ⁴Istituto Nacional de Saúde, Maputo, Mozambico. ⁵MBN Clinical Laboratories, Kampala, Uganda. ⁶Istituto Nacional de Investigação em Saúde (INIS), Luanda, Angola. ⁷Noguchi Memorial Institute for Medical Research, Università del Ghana, Legon, Ghana. ⁸Istituto Pasteur del Madagascar, Antananarivo, Madagascar. ⁹Istituto Pasteur del Marocco, Casablanca, Marocco. ¹⁰Istituto Pasteur di Algeria, Centro Nazionale dell'Influenza, Sidi-Fredj, Algeria. ¹¹Laboratori di ricerca multifunzionali dell'Università di Gulu, Gulu, Uganda. ¹²Scuola di Scienze, Ingegneria e Ambiente, Università di Salford, Salford, Regno Unito. ¹³Facoltà di Scienze della Salute, Università Marien Ngouabi, Pointe-Noire, Congo. ¹⁴Laboratorio di Diagnostica Molecolare HDL, Pointe-Noire, Congo. ¹⁵Collegio di Scienze della Salute dell'Università Makerere, Kampala, Uganda. ¹⁶Centro di ricerca sulle malattie tropicali, Ndola Teaching Hospital, Ndola, Zambia. ¹⁷Laboratorio nazionale di virologia, Facoltà di Medicina e Scienze della Salute, Università dello Zimbabwe, Avondale, Zimbabwe. ¹⁸Scuola di Igiene e Medicina Tropicale di Londra, Regno Unito. ¹⁹Laboratoire National de Référence-Grippe, Ouagadougou, Burkina Faso. ²⁰Unità del Medical Research Council presso la London School of Hygiene and Tropical Medicine, Banjul, Gambia. ²¹Unité des Virus Émergents, Aix Marseille Université, Marsiglia, Francia. ²²Istituto Pasteur di Dakar (IPD), Dakar, Senegal. ²³Università delle Scienze, delle Tecnologie e delle Tecnologie di Bamako (USTTB), Bamako, Mali. ²⁴Centro tedesco per la ricerca sulle infezioni (DZIF),

Partner associato Charité-Universitätsmedizin Akorli, Soa Fy Andriamandimby, Latifa Anga, Yvonne Ashong⁷, Mohamed Amine Beloufa¹⁰, Aicha Bensalem¹⁰, Richard Birtles^{11,12}, Anicet Luc Magloire Boumba^{13,14}, Freddie Bwanga^{5,15}, Mike Chaponda¹⁶, Paradzai Chibukira¹⁷, R. Matthew Chico¹⁸, Justin Chileshe¹⁶, Gershom Chongwe¹⁶, Assana Cissé¹⁹, Umberto D'Alessandro²⁰, Xavier Nicolas de Lamballerie²¹, Joana F. M. de Moraes⁶, Fawzi Derrar¹⁰, Ndongo Dia²², Youssouf Diarra²³, Lassina Doumbia²³, Christian Drosten^{1,24}, Philippe Dussart⁸, Richard Echodu¹¹, Yannik Eggers^{25,26}, Abdelmajid Eloulid⁹, Ousmane Faye²², Torsten Feldt^{25,26}, Anna Frühauf¹, Afiwa Halatoko²⁷, Pauliana- Vanessa Ilouga²⁸, Nalia Ismael⁴, Ronan Jambou²⁹, Sheikh Jarju²⁰, Antje Kamprad¹, Ben Katowa^{30,31}, John Kayiwa³², Leonard King'wara³³, Ousmane Koita²³, Vincent Lacoste⁸, Adamou Lagare²⁹, Olfert Landt³⁴, Sonia Etenna Lekana-Douki³⁵, Jean-Bernard Lekana-Douki³⁵, Etuhole

lipumbu36, Hugues Loemba37,¹⁴ Julius
Lutwama32, Santou Mamadou29, Issaka
Maman27, Brendon Manyisa17, Pedro A.
Martinez6, Japhet Matoba30,³¹ Lusia Mhuulu36,
Andres Moreira-Soto1, Judy Mwangi11,¹²,
Nadine N'dilimabaka35, Charity Angella
Nassuna32, Mamadou Ousmane Ndiath20,
Emmanuel Nepolo36, Richard Njouom28, Jalal
Nourlil9, Steven Ger

Berlino, Berlino, Germania. 25Istituto di Medicina
Tropicale ^{Hirsch}, Asella, Etiopia. ²⁶Dipartimento di
Gastroenterologia, Epatologia e Malattie
Infettive, Ospedale Universitario di Düsseldorf,
Università Heinrich Heine di Düsseldorf,
Düsseldorf, Germania.
²⁷Istituto Nazionale di Igiene, Lomé, Togo. ²⁸Centro
Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Camerun.
²⁹Centro di ricerca medica e sanitaria (CERMES),
Niamey, Niger. ³⁰Macha Research Trust, Choma,
Zambia. ³¹Scuola di Medicina Veterinaria,
Università dello Zambia, Lusaka, Zambia.
32Istituto di ricerca sui virus dell'^{Uganda},
Entebbe, Uganda. 33Laboratorio nazionale di
riferimento per la salute pubblica, Ministero
della Salute, Nairobi, Kenya.
³⁴TIB-Molbiol GmbH, Berlino, Germania. ³⁵Centro
Interdisciplinaire de Recherches Médicales de
Franceville (CIRMF), Franceville, Gabon. ³⁶Scuola di
Medicina, Università della Namibia, Windhoek,
Namibia. ³⁷Facoltà di Medicina, Università di Ottawa,
Ottawa, Ontario, Canada. ³⁸Scuola di Scienze
Biomediche, Università di Agricoltura e
Tecnologia Jomo Kenyatta, Nairobi, Kenya.
³⁹Centro Kumasi per la ricerca collaborativa in
medicina tropicale (KCCR), Università di
Scienza e Tecnologia Kwame Nkrumah
(KNUST), Kumasi, Ghana. ⁴⁰National Health
Laboratory Service Tygerberg Business Unit,
Città del Capo, Sudafrica. ⁴¹Ministero della Salute,
Akpakpa, Benin. ⁴²Dipartimento di Biologia teorica e
applicata, KNUST, Kumasi, Ghana.

*Autore corrispondente.
Email:
felix.drexler@charite.de