

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“Amedeo Avogadro”



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica
Corso di Laurea Magistrale in Biologia


TESI

VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE DIAGNOSTICHE DI
UN TEST POINT-OF-CARE (POCT) IN UN PRONTO SOCCORSO
PEDIATRICO: STUDIO CLINICO POCT-FLUCO

Relatore: Prof. Ranzato Elia 

Co-relatore: Dott. Rocchetti Andrea

Candidato: Ranzan Sara



ANNO ACCADEMICO 2022/2023

*“Sembra sempre impossibile
finché non viene fatto”*

- Nelson Mandela

Sommario

1. Introduzione	5
1.1 La polmonite	6
1.1.2 Polmonite acquisita in comunità (CAP) negli adulti	7
1.1.3 Polmonite acquisita in comunità (CAP) nei bambini	11
1.2 Il Point-of-Care Testing (POCT)	14
1.2.1 Tecnologie point-of-care test e tipologie di strumenti	15
1.2.2 I point-of-care test nella diagnostica delle malattie infettive	19
1.2.3 Implementazione di un POCT in ambito ospedaliero	19
1.3 Malattia respiratoria acuta da SARS-CoV-2 (COVID-19)	21
1.3.1 Caratteristiche cliniche dell'infezione da Sars-CoV-2	22
1.3.2 Test diagnostici per il COVID-19	26
1.3.3 Gestione e prevenzione del COVID-19	28
1.4 Influenza A e B	30
2. Scopo del lavoro	33
3. Materiali e metodi	34
3.1 Progettazione dello studio	34
3.2 Addestramento del personale sanitario	34
3.3 Arruolamento del paziente	34
3.4 Test molecolare ID NOW™	35
3.4.2 Materiale utilizzato per l'esecuzione del test	36
3.4.3 Procedura per l'esecuzione del test	37
3.4.4 Controlli qualità dei test	41
3.5 Rilevamento di Sars-CoV-2 e di Influenza A e B tramite la tecnica di riferimento: RT-PCR	42
3.7 Raccolta dei dati	44
3.8 Analisi statistica dei dati	47
4. Risultati	47

4.1 Popolazione	47
4.2 Esami strumentali	49
4.3 Risultati dei test	51
4.3.1 Accuratezza diagnostica del test ID NOW™ per il COVID-19	51
4.3.2 Accuratezza diagnostica del test ID NOW™ per Influenza A	53
4.3.3 Accuratezza diagnostica del test ID NOW™ per l’Influenza B	55
4.3 Descrizione dei casi discordanti	57
4.4 Virus respiratorio sinciziale (RVS) e co-infezioni	58
5. Discussione	59
6. Conclusioni	61
7. Bibliografia	62
8. Sitografia	71
9. Ringraziamenti	72

1. Introduzione

Le infezioni delle vie respiratorie possono colpire sia il tratto respiratorio superiore che il tratto respiratorio inferiore. In entrambi i casi possono evolvere in forme gravi dette infezioni respiratorie acute (ARI). Le infezioni delle vie respiratorie superiori (URI) riguardano le narici, la laringe, i seni paranasali e l'orecchio medio e causano principalmente raffreddore, sinusite e faringite acuta (Simoes *et al.*, 2006).

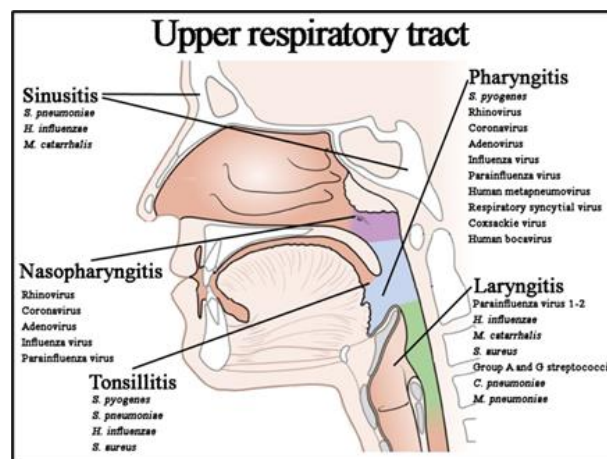


Figura 1. Infezioni del tratto respiratorio superiore (Calderaro *et al.*, 2022).

Le infezioni delle vie respiratorie inferiori (LRI) coinvolgono trachea, bronchi, bronchioli e alveoli e causano principalmente polmonite e bronchiolite (Simoes *et al.*, 2006).

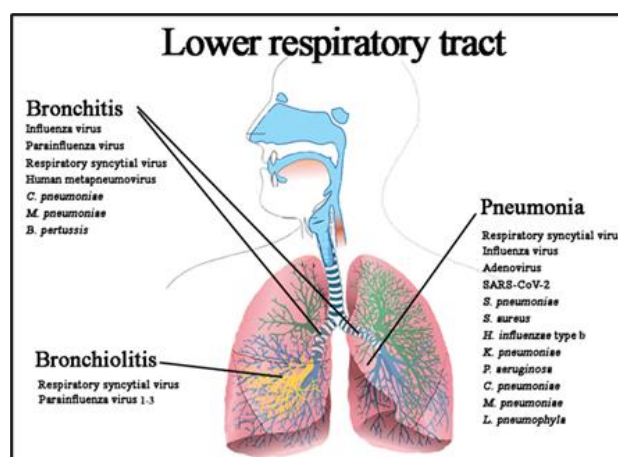


Figura 2. Infezioni del tratto respiratorio inferiore (Calderaro *et al.*, 2022).

Le LRI sono tra le principali cause di morte negli adulti nel mondo (*WHO, 2019*) e nei bambini di età inferiore ai 5 anni (*Perin et al., 2015*). Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 2019 in Italia le LRI hanno causato circa 30 morti ogni 100.000 abitanti (*WHO, 2019*).

1.1 La polmonite

La polmonite è un'infezione acuta in cui si verifica un'alterazione della normale funzionalità degli alveoli i quali si riempiono di liquidi rendendo difficile la respirazione (*WHO, 2019*).

La polmonite può manifestarsi in seguito all'inalazione di goccioline di aerosol sospese nell'aria che contengono microrganismi patogeni; in seguito all'aspirazione del contenuto orofaringeo o all'entrata nel flusso sanguigno di patogeni ad esempio per via endovenosa o in presenza di batteremia (*Limper AH, 2012*). In base all'agente patogeno coinvolto la polmonite può essere causata da virus, batteri, micobatteri, funghi, parassiti.

I sintomi principali comprendono febbre, dolore al petto, tosse, brividi, dispnea, dolori muscolari (*Lim WS, 2021*).

Un aspetto interessante è il fatto che i polmoni non sono organi sterili ma sono costituiti da un microbioma polmonare che comprende gruppi di batteri (batterioma), di funghi (micobioma) e di virus (viroma). Tale microbioma polmonare è coinvolto nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria; una sua alterazione può causare un aumento della suscettibilità alle infezioni. Inoltre è stato recentemente scoperto che il microbioma intestinale e dell'orofaringe influenzano il microbioma polmonare nella sua composizione (*Li et al., 2024*).

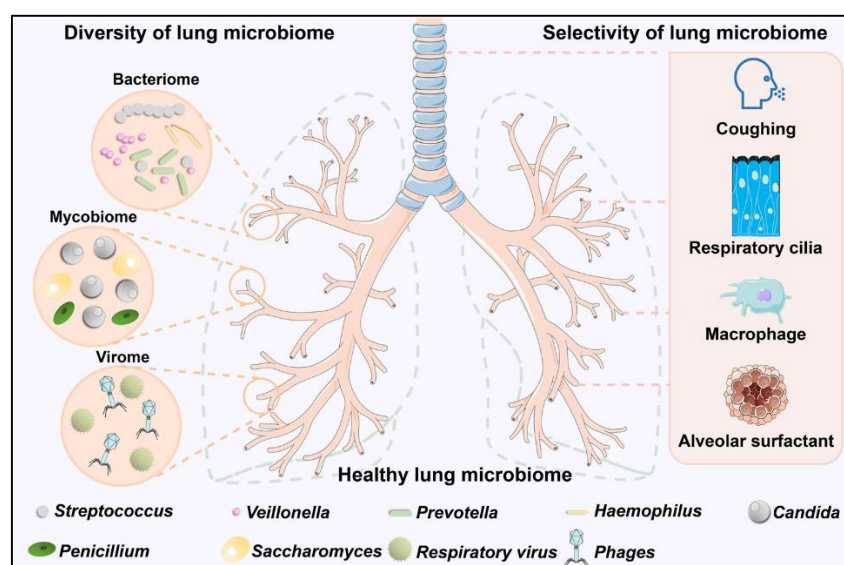


Figura 3. Microbioma polmonare (*Li et al., 2024*).

Le cellule epiteliali respiratorie costituiscono la prima barriera di difesa dagli agenti patogeni poiché tramite la produzione di muco riescono ad intrappolare i microrganismi. Tuttavia, se i patogeni raggiungono il tratto respiratorio inferiore si attivano le difese immunitarie. Le cellule immunitarie coinvolte nella risposta comprendono: i macrofagi alveolari (AM) che fagocitano i patogeni e producono citochine pro-infiammatorie, le cellule linfoidi innate (ILC), i neutrofili che vanno a creare delle trappole extracellulari dei neutrofili (NET), i linfociti T CD8⁺ e CD4⁺ (Torres et al., 2021).

A seconda del luogo di infezione la polmonite può essere classificata in due categorie:

- polmonite acquisita in comunità (CAP) se acquisita in un luogo al di fuori dell'ospedale;
- polmonite nosocomiale che comprende la polmonite acquisita in ospedale (HAP) quando i sintomi si manifestano dopo 48 ore dal ricovero e la polmonite associata al ventilatore (VAP) in seguito all'intubazione endotracheale.

La polmonite associata all'assistenza sanitaria (HCAP) si riferisce invece alla polmonite acquisita in strutture sanitarie diverse dall'ospedale, come ad esempio le case di cura, prima considerata una categoria separata, oggi non più utilizzata (Torres et al., 2021).

1.1.2 Polmonite acquisita in comunità (CAP) negli adulti

Incidenza e mortalità

L'impatto della polmonite acquisita in comunità in Europa è elevato sia dal punto di vista dell'incidenza e della mortalità sia dal punto di vista economico e della qualità della vita. L'incidenza e la mortalità variano da paese a paese e in base all'età e dipendono anche da fattori di rischio e comorbilità presenti nel paziente. In generale sono elevate in pazienti con età ≥ 65 anni poiché tali soggetti sono più suscettibili a contrarre malattie. Inoltre i pazienti in età anziana hanno un maggior peso economico per la sanità a causa della maggior durata del ricovero rispetto a pazienti giovani (Tsumani et al., 2023). All'aumentare dell'età l'incidenza della CAP aumenta più nei maschi che nelle femmine (Rivero-Calle et al., 2016). Uno studio del 2018 che ha valutato il peso della CAP pneumococcica in Europa ha rilevato l'incidenza più elevata in Spagna (166 casi su 100.00 abitanti) (Torres et al., 2018). Un altro studio ha riportato che negli Stati Uniti ogni anno più di 1,7 milioni di ricoveri sono causati dalla CAP (Ramirez et al., 2017).

Fattori di rischio

I principali fattori di rischio per la CAP negli adulti dipendono dall'ambiente e dallo stile di vita: l'età, il fumo, la malnutrizione, l'esposizione a sostanze tossiche. Tuttavia sono state riscontrate anche altre cause tra cui la presenza di comorbidità come la BPCO, le malattie orodentali e parodontali, l'asma e una precedente infezione di CAP (Almirall et al., 2017), la residenza in una struttura sanitaria, l'abuso di alcool, la scarsa igiene orale e l'utilizzo di inibitori della pompa protonica (BMJ, 2024).

Eziologia

In più della metà dei pazienti con CAP l'agente eziologico non viene identificato. Il patogeno più rilevato è lo *Streptococcus pneumoniae*. Altri batteri che causano la CAP sono: l'*Haemophilus influenzae*, lo *Staphylococcus aureus*, la *Klebsiella pneumoniae*, la *Pseudomonas aeruginosa*; tra i batteri atipici rilevati con minore frequenza sono stati trovati il *Mycoplasma pneumoniae*, la *Legionella*, la *Chlamidophyla*, la *Coxiella* (Shoar et al, 2020). Talvolta la CAP può essere causata da batteri che sviluppano resistenze agli antibiotici (ad esempio lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina o MRSA) (Torres et al., 2021).

Per quanto riguarda gli agenti virali, i più rilevati sono: il *Virus influenzale*, il *Virus respiratorio sinciziale* (RVS), il *Rinovirus* e il *Metapneumovirus* (Shoar et al.,2020), l'*Adenovirus*, i *Coronavirus* e il *Mycobacterium tuberculosis*, soprattutto nelle zone endemiche (Lim WS, 2022). Inoltre è presente un'elevata percentuale di co-infezioni batteriche e virali (Shoar et al, 2020).

Diagnosi e gestione del paziente adulto con polmonite acquisita in comunità

- **Diagnosi clinica**

Secondo le linee guida la British Thoracic Society la diagnosi di CAP viene formulata in presenza di una serie di sintomi (febbre, tosse, dolore pleurico, dispnea, tachipnea) accompagnati dalla conferma di un esame radiologico del torace. Quest'ultimo in ambito ambulatoriale è poco disponibile e viene richiesto raramente, mentre nei pazienti che necessitano di un ricovero è essenziale per confermare la diagnosi di CAP, in particolare in presenza di un'ombra radiografica in uno o più lobi polmonari (Lim et al., 2009).



Figura 4. Immagini radiografiche del torace di un paziente con polmonite acquisita in comunità (Durrington et al., 2008).

Al fine di gestire e trattare adeguatamente il paziente si valuta la gravità clinica della CAP tramite l'utilizzo di strumenti di punteggio che predicono la mortalità a 30 giorni. I sistemi più utilizzati sono il CURB-65 e il PSI (Pneumonia Severity Index) accompagnati da un giudizio clinico. Il punteggio di CURB-65 assegna un punto per ognuno dei criteri soddisfatti (confusione, urea > 7 mmol, frequenza respiratoria ≥ 30 respiri/minuto, pressione sanguigna <90 mmHg sistolica o <60 mmHg diastolica, età ≥ 65 anni). Il base al rischio (basso, moderato, alto) la mortalità a 30 giorni aumenta e cambia il tipo di trattamento. Ad esempio per un rischio basso il paziente può essere trattato a livello ambulatoriale mentre per un rischio alto potrebbe essere trasferito in terapia intensiva. Il punteggio PSI invece viene assegnato in base all'età, alla presenza di patologie, ai risultati dell'esame fisico e di laboratorio. Tale punteggio classifica i pazienti in 5 classi di rischio (BMJ, 2024). Le linee guida ATS/IDSA raccomandano di utilizzare sempre uno di questi punteggi e di preferire, ove possibile, il punteggio PSI in quanto più efficace nel discriminare i livelli di gravità della malattia (Metlay et al, 2019).

- **Esami di laboratorio**

Su ogni paziente ricoverato per CAP deve essere eseguita la misurazione dell'ossigeno, dell'urea e degli elettroliti, l'emocromo completo, il test di funzionalità epatica e il dosaggio della proteina C reattiva. La misurazione della PCR è infatti utile ai fini della diagnosi e del trattamento (*Lim et al., 2009*).

- **Esami microbiologici**

Le indagini microbiologiche vengono eseguite per identificare l'agente eziologico. I metodi più utilizzati sono l'emocoltura, la coltura e la colorazione dell'espettorato, la ricerca nelle urine dell'antigene pneumococcico e della legionella, la PCR e la sierologia per la ricerca di altri patogeni respiratori. Tali esami non vengono eseguiti di routine ma solo nel caso in cui si sospetti la presenza di CAP grave (*Lim et al., 2009*).

- **Trattamento**

Ai pazienti ricoverati con CAP non grave è consigliata la somministrazione di un β -lattamico associato a un macrolide o in alternativa una monoterapia con un fluorochinolone respiratorio. Nel caso il paziente sia affetto da CAP grave è possibile attuare una terapia di associazione di un β -lattamico con un macrolide o un β -lattamico con un fluorochinolone respiratorio. I pazienti con fattori di rischio per MRSA o *P. aeruginosa* devono essere trattati con una terapia empirica. I pazienti con CAP grave possono anche essere trattati con corticosteroidi.

In caso di positività all'influenza è consigliata la somministrazione di un antivirale come l'oseltamivir. Se si sospetta una coinfezione può essere somministrata una terapia batterica in associazione alla terapia virale (*Metlay et al., 2019*).

Complicanze

L'insorgenza delle complicanze può dipendere dall'età del paziente, dalla presenza di patologie respiratorie e/o cardiovascolari, da una mancata risposta al trattamento o da una terapia sbagliata; possono manifestarsi anche in seguito ad infezioni nosocomiali.

Le principali complicanze che si possono verificare negli adulti sono:

- sepsi e/o insufficienza respiratoria;
- empiema e ascesso polmonare;
- infezione da *C. difficile* associato ad antibiotici;

- eventi cardiovascolari come insufficienza respiratoria, infarto del miocardio, embolia polmonare (*Ramirez JA, 2023*).

Prevenzione

Per prevenire l'insorgenza della CAP è molto importante mettere in atto comportamenti che riducono i fattori di rischio come smettere di fumare e mantenere uno stile di vita sano.

È fondamentale sottoporsi alla vaccinazione pneumococcica e antinfluenzale. Attualmente esistono due tipi di vaccini contro lo pneumococco per gli adulti: il vaccino pneumococcico polisaccaridico 23-valente (PPV23) e il vaccino pneumococcico coniugato 13-valente (PCV13) che sono entrambi raccomandati negli adulti di età ≥ 65 anni (*Torres et al., 2021*).

1.1.3 Polmonite acquisita in comunità (CAP) nei bambini

Incidenza e mortalità

Tra i bambini l'incidenza della polmonite è elevata e rimane tra le principali cause di morte a livello globale in soggetti di età inferiore ai 5 anni. La maggior parte dei decessi si verifica nei paesi in via di sviluppo, in particolare in India, Nigeria, Pakistan, Repubblica Democratica del Congo ed Etiopia (*Kassaw et al., 2023*). Nonostante nel 2019 la CAP abbia causato più di 700.000 decessi, i dati degli ultimi anni rivelano una diminuzione del tasso di mortalità (*Cao et al., 2023*). Come riportato nei dati del Global Burden Disease dal 1990 al 2017 la riduzione dei decessi per la polmonite pneumococcica è aumentato di molto nei bambini rispetto agli adulti di età superiore ai 70 anni (*Global Burden Disease, 2018*).

Fattori di rischio

Nei bambini al di sotto dei 5 anni l'affollamento, la mancanza di allattamento esclusivo al seno, l'immunizzazione incompleta e la malnutrizione sono i principali fattori predisponenti alla CAP (*Srivastava et al., 2015*).

Eziologia

Anche nei bambini lo *S. pneumoniae* è l'agente eziologico più diffuso. Colpisce tutte le fasce d'età ma soprattutto quella prescolare e scolare. Nei bambini fino ad un anno di età invece è maggiormente diffuso il *Virus respiratorio sinciziale* (RVS). Altri agenti eziologici frequenti

nei bambini sono gli stessi che causano la CAP negli adulti. Il *Mycoplasma pneumoniae* è tra i batteri più diffusi che causano polmonite nei bambini di età superiore ai 5 anni (Boza Costagliola ML, 2020). Un'epidemia di *M. pneumoniae* è stata registrata nella zona di Shanghai nel 2023 (Zhang et al., 2024).

Diagnosi e gestione del paziente pediatrico con polmonite acquisita in comunità

- **Diagnosi clinica**

La diagnosi per CAP nei bambini è difficoltosa poiché varia in base all'età, all'agente eziologico e alla gravità della malattia. In generale i sintomi considerati sono: febbre e disturbi respiratori. La diagnosi viene fatta sulla base di una valutazione complessiva tramite l'anamnesi, una valutazione radiologica ed esami di laboratorio (Quin et al., 2015). Secondo le linee guida della Pediatric Infectious Diseases Society e della Infectious Diseases Society of America un bambino o un neonato deve essere ricoverato se presenta segni di distress respiratorio e ipossiemia che indicano una CAP moderata o grave.

1. Tachipnea, frequenza respiratoria, respiri/min a
Età 0-2 mesi: >60
Età 2-12 mesi: >50
Età 1-5 anni: >40
Età >5 anni: >20
2. Dispnea
3. Retrazioni (soprasternali, intercostali o sottocostali)
4. Grugniti
5. Dilatazione nasale
6. Apnea
7. Stato mentale alterato
8. Misurazione della pulsossimetria <90% sull'aria ambiente

Figura 5. Criteri per distress respiratorio nei bambini con polmonite (Bradley et al., 2011).

La tachipnea non è un segno specifico ma si ritiene sia il più importante in quanto se associato a ipossiemia è un indicatore di prognosi sfavorevole della malattia (*Bradley et al., 2011*).

- **Esami di laboratorio**

Gli esami di laboratorio generalmente richiesti sono la conta delle cellule del sangue, la misurazione della VES, della proteina C reattiva e della procalcitonina. Nonostante un aumento della PCR e della procalcitonina possa essere utile per identificare un'infezione batterica, i risultati possono essere molto variabili, dunque non è effettivamente un metodo così affidabile per distinguere una polmonite batterica da una virale. Tali parametri potrebbero piuttosto essere utilizzati per valutare il decorso della malattia (*Bradley et al., 2011*).

- **Esami microbiologici**

Sui pazienti pediatrici con CAP grave vengono effettuate emocolture, colorazione e coltura di Gram dell'espettorato, test di rilevamento dell'antigene urinario, test per agenti virali e batteri atipici. Nonostante le emocolture possano essere utili per la somministrazione di un trattamento adeguato non sempre sono efficienti nel rilevare l'agente eziologico e talvolta possono risultare positive per la presenza di patogeni contaminanti. La coltura dell'espettorato invece viene poco utilizzata nei bambini per le difficoltà nel reperire un campione di espettorato. Inoltre la procedura potrebbe risultare troppo invasiva (*Bradley et al., 2011*).

- **Trattamento**

Il trattamento per i pazienti pediatrici è abbastanza simile nelle diverse fasce di età mentre le dosi variano tra i pazienti di età inferiore o superiore ai 5 anni. L'amoxicillina è l'antibiotico che viene generalmente somministrato per la polmonite batterica. Per la polmonite atipica vengono utilizzati macrolidi in particolare l'azitromicina. Per la polmonite virale, la terapia consiste nella somministrazione dell'oseltamivir (*Bradley et al. 2011*).

Complicanze

Nei bambini le principali complicanze causate dalla CAP sono: il versamento pleurico, la polmonite necrotizzante, lo pneumatocele e l'ascesso polmonare (*Meyer Sauter PM, 2023*).

Prevenzione

Nei bambini la prevenzione contro la CAP viene attuata tramite la copertura vaccinale contro *Haemophilus influenzae* tipo b, *Bordetella pertussis* e morbillo, oltre che con i vaccini pneumococcici coniugati 10-valente e 13-valente (Boza Costagliola ML, 2020).

1.2 Il Point-of-Care Testing (POCT)

Il termine Point Of Care Testing (POCT) definisce tutti quei test che non vengono eseguiti in laboratorio ma vicino al letto del paziente. Possono essere utilizzati dal personale ospedaliero ma anche in ambienti esterni all'ospedale come farmacie, studi medici o a domicilio da parte dei pazienti stessi (Venner et al., 2021). All'interno dell'ospedale possono essere inseriti in contesti come la terapia intensiva, la radiologia, la sala parto, il dipartimento di emergenza (Larsson et al., 2015). Sono strumenti diagnostici *in vitro* in grado di fornire risultati in tempi rapidi (Manmana et al., 2021). I POCT vengono talvolta definiti con altri termini tra cui test al capezzale, test decentralizzati, test esentati (Hansen GT, 2020).

La diagnostica point-of-care ha un'ampia gamma di target diagnostici. Tra i principali bersagli ci sono: proteine (ormoni, anticorpi), metaboliti presenti nel sangue (glucosio, colesterolo, trigliceridi), acidi nucleici, cellule umane del sangue, batteri, virus e parassiti, farmaci e droghe ma anche contaminanti alimentari. Tali molecole possono essere identificate a partire da campioni di urine, sangue, saliva, sudore e da campioni alimentari e ambientali. Questi test sono molto utili per il monitoraggio di alcune patologie e per l'identificazione delle malattie infettive (Gubala et al, 2011). Alcuni POCT frequentemente utilizzati sono i test di gravidanza, test della glicemia, test dell'HIV, test per la concentrazione dell'emoglobina e dei marcatori cardiaci (Li CZ, 2019). Il primo POCT risale agli anni '50 ed era un dipstick utilizzato per misurare il glucosio nelle urine (Kumar et al., 2021). Oggi il test della glicemia utilizza strisce reattive che misurano i livelli di glucosio a partire da sangue intero (Park HD, 2021).

I dispositivi diagnostici *in vitro* sono regolati dal regolamento sulla diagnostica *in vitro* (IVDR) del 2017, entrata in vigore nel 2022. L'IVDR ha il fine di classificare e valutare gli IVD tramite l'ausilio di autorità sanitarie (Rithzaupt et al., 2020).

La FDA definisce gli IVD come “quei reagenti, strumenti e sistemi destinati all'uso della diagnosi di malattie o altre condizioni, compresa la determinazione dello stato di salute, al fine di curare, mitigare, trattare o prevenire malattie o le loro sequele” e li classifica sulla base dei

criteri della Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) in tre classi in base al rischio (FDA, 2021). La CLIA definisce i test di basso rischio come ‘test esentati’ e ‘test non esentati’ quelli di medio e alto rischio. I POCT rientrano generalmente nella definizione di test esentati anche se alcuni con complessità più alta vengono considerati test non esentati (CDC, 2018).

I test point-of-care presenti in ambiente ospedaliero o ambulatoriale possono essere soggetti ad accreditamento ISO. In particolare un laboratorio già accreditato dalla norma ISO 15189, può essere accreditato dalla norma ISO 22870 applicabile ai point-of-care test sulla base di alcuni requisiti di competenza e qualità (Oliver et al., 2019).

L’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stabilito dei criteri che caratterizzano il POCT ideale, i quali vengono riassunti attraverso l’acronimo ‘ASSURED’. Ogni lettera indica una caratteristica: accessibile, sensibile e specifico, facile da usare, rapido e robusto, privo di apparecchiature, consegnabile (all’utente finale) e monouso. I test a flusso laterale (LFA) sembrano essere quelli che meglio soddisfano i criteri ASSURED (Naseri et al., 2021).

È stato stimato che la diagnostica point-of-care ha generato nel mercato globale un’entrata di 45,4 miliardi di dollari ed è destinata a crescere fino a 75,5 miliardi di dollari entro il 2027. In particolare i test a flusso laterale e i test per le malattie infettive sono la principale componente che determina tale crescita (MarketsandMarkets, 2022).

1.2.1 Tecnologie point-of-care test e tipologie di strumenti

Esiste un grandissimo numero di test point-of-care disponibili. È possibile suddividerli in due grandi gruppi in base alle dimensioni: piccoli point-of-care portatili e grandi point-of-care da banco (St John et al., 2014).

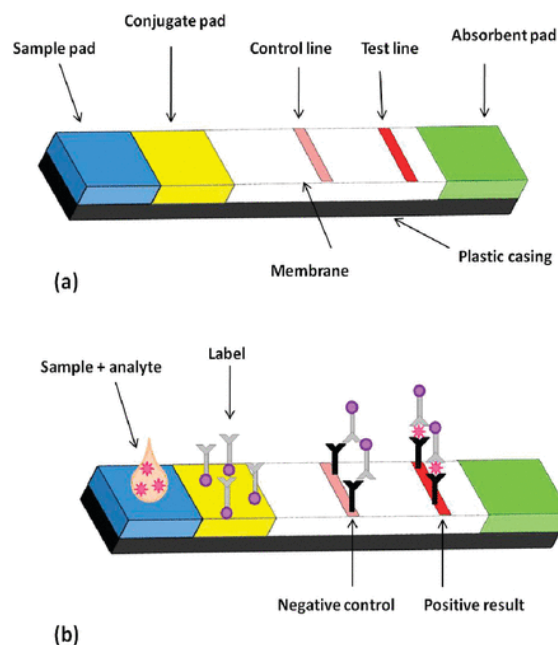
I POCT utilizzano come metodo di rilevamento i biosensori, ovvero sistemi sensibili alla presenza dell’analita in grado di emettere un segnale. I sistemi di rilevazione possono essere di diverso tipo: elettrochimici, colorimetrici, a fluorescenza, basati su SERS, a chemiluminescenza, magnetici, basati su SPR.

Per quanto riguarda i dispositivi, nel corso degli anni sono stati sviluppati diverse tipologie di point-of-care testing che si differenziano in base al materiale, al meccanismo e al metodo di rilevamento utilizzato (Wang et al., 2021).

- **Strisce reattive:** queste strisce sono costituite da matrici porose asciutte sulle quali vengono inseriti elementi di supporto che quando interagiscono con l’analita in presenza

di un reagente generano una reazione chimica che determina il cambiamento di colore (ad esempio le strisce reattive per le urine) (Larkins et al., 2023).

- **Test a flusso laterale (LFA):** questo tipo di test è costituito da una membrana porosa suddivisa in diverse sezioni. Da un lato del test si inserisce il campione liquido contenente l'analita, il quale se presente si lega agli anticorpi coniugati con particolari materiali per la rilevazione (di solito particelle d'oro). Il sistema antigene-anticorpo migra lungo il test per capillarità fino a raggiungere la linea del test per la positività. In assenza dell'analita si visualizzerà solo la banda di controllo negativa. Questo sistema è molto utilizzato per la rilevazione della gonadotropina corionica umana (hCG) in gravidanza (Gubala et al., 2012).



*Figura 6. Raffigurazione delle diverse componenti del test a flusso laterale (a) e del meccanismo di funzionamento (b)
(Gubala et al., 2012)*

- **Microfluidica basata su carta (μ PAD):** i dispositivi μ PAD si basano sull'utilizzo di carta a base di cellulosa o nitrocellulosa sulla quale vengono creati dei canali idrofilici nei quali scorre il liquido con delle barriere idrofobiche per non farlo uscire. Essendo un sistema microfluidico ha la caratteristica di utilizzare piccoli volumi di fluidi. La membrana di carta contiene dei reagenti. Ogni canale serve per l'identificazione di un

analita. In base al tipo di risultato si possono avere test colorimetrici, elettrochimici o spettrofotometrici. Il μ PAD bidimensionale ha portato allo sviluppo di test più complessi tridimensionali, attraverso l'utilizzo di più strati di carta impilati uno sopra l'altro per permettere ai fluidi di andare in tutte le direzioni generando una rete di canali molto più numerosa (Nishat et al., 2021).

- **Lab-on-chip (LOC) e Lab-on-a-disc (LOAD):** si tratta di dispositivi microfluidici automatizzati che svolgono tutte le fasi del test di preparazione del campione, amplificazione e rilevamento direttamente sul chip o sul disco. In particolare il lab-on-a-disc è un sistema che controlla il movimento del fluido sfruttando la forza centrifuga che si genera dalla rotazione del disco e non necessita di un pompaggio esterno. Entrambi utilizzano un volume ridotto di campione e sono più rapidi rispetto ai metodi tradizionali (Wang et al., 2021).
- **Dispositivi che usano l'amplificazione isoterma degli acidi nucleici (INAA):** questi tipi di dispositivi utilizzano una tecnica che rispetto alla PCR non necessita di cicli di temperatura. È un sistema chiuso dove l'amplificazione degli acidi nucleici avviene in condizione isoterma. Sono state sviluppate diverse tecniche di amplificazione isoterma: amplificazione dello spostamento del filamento (SDA), del cerchio rotante (RCA), amplificazione della polimerasi ricombinasi (RPA), amplificazione isoterma mediata da loop (LAMP), reazione di amplificazione degli enzimi di restrizione (NEAR) (Zhu et al., 2020).

La tecnologia NEAR utilizza un'endonucleasi di restrizione che invece di tagliare entrambi i filamenti del DNA come le normali endonucleasi, taglia solo uno dei due filamenti.

Esistono diversi tipi di endonucleasi ma quella più comune è la Nt. BstNBI ottenuta dal *Bacillus stearothermophilus*.

Per la reazione, oltre all'enzima di restrizione, sono necessari la DNA polimerasi e primer. I primer vengono sviluppati con una regione che lega il bersaglio, una regione stabilizzante e una regione che contiene un sito di restrizione. Ad una certa temperatura il primer si lega al filamento bersaglio e la DNA polimerasi inizia a sintetizzare il doppio filamento. A questo punto l'endonucleasi riconosce il sito di restrizione presente sul primer e taglia solo uno dei due filamenti. La DNA polimerasi sintetizza un nuovo filamento spostando il filamento intermedio appena sintetizzato. Questo filamento contiene una sequenza legante il bersaglio al quale si lega un altro primer (Primer 2).

Dal Primer 2 la DNA polimerasi inizia ad estendersi fino a che l'endonucleasi non taglia il filamento nel sito di restrizione. Il filamento iniziale è stato rigenerato ed è nuovamente disponibile per iniziare un nuovo ciclo (Quian *et al.*, 2019).

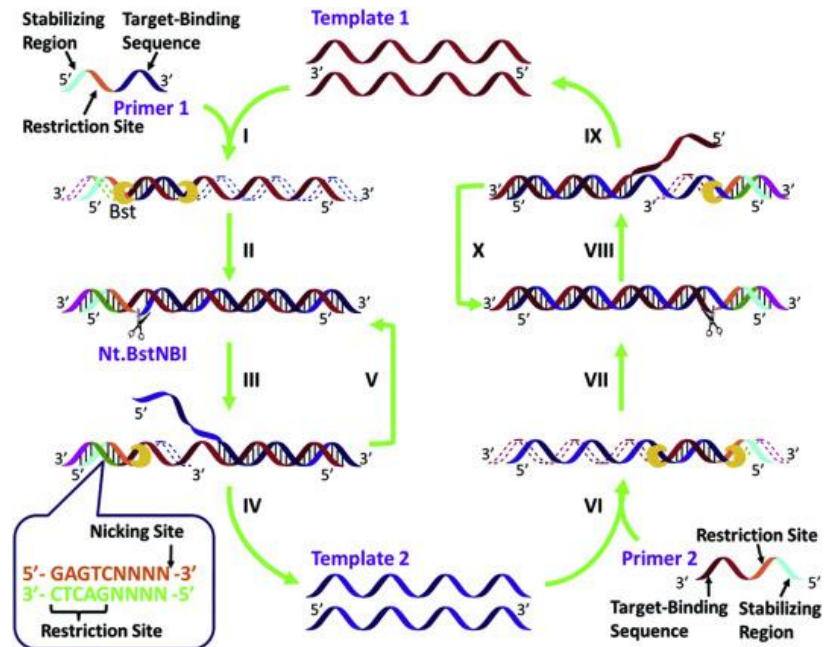


Figura 7. Schema di funzionamento della reazione di amplificazione con enzimi di restrizione (NEAR) (Qian *et al.*, 2019).

- **Dispositivi indossabili:** sono stati recentemente sviluppati dispositivi POCT indossabili come tatuaggi, orologi, cerotti, occhiali che sono in grado di rilevare biomolecole a partire da sangue, sudore, ferite e lacrime (Manmana *et al.*, 2021).
- **Smartphone:** sono state sviluppate nuove funzionalità per il telefono cellulare applicabili in campo medico. Tramite il collegamento con i dispositivi POCT il telefono può essere utilizzato per il rilevamento colorimetrico, elettrochimico o a fluorescenza (Manmana *et al.*, 2021).

1.2.2 I point-of-care test nella diagnostica delle malattie infettive

La RT-PCR è da sempre considerata la metodica standard per l'identificazione delle malattie infettive.

La pandemia da COVID-19 ha dimostrato come tale tecnica renda difficoltoso il processamento di un elevato numero di campioni. Sono quindi stati sviluppati numerosi POCT utili non solo in ambito pandemico ma anche per il monitoraggio di malattie ancora molto diffuse come l'AIDS, la tubercolosi e l'epatite B (*Kumar et al., 2021*).

Uno studio che ha analizzato la diffusione e l'utilizzo dei POCT per la diagnostica delle malattie infettive in Europa ha osservato che ci sono ancora molte lacune e poche informazioni a riguardo (*Hocking et al., 2021*).

Lo sviluppo di nuovi POCT sarebbe vantaggioso soprattutto nei paesi in via di sviluppo dove le malattie infettive come il virus dell'Ebola, il virus del Dengue e il virus Zika che causano ogni anno milioni di casi di infezione e migliaia di morti (*Kumar et al., 2021*).

1.2.3 Implementazione di un POCT in ambito ospedaliero

L'implementazione di un POCT implica la creazione di un programma organizzativo che assicuri l'uso appropriato del test point-of-care e la gestione dei rischi. L'organizzazione varia a seconda del luogo di collocamento dello strumento. Per la gestione dello strumento e del flusso di lavoro vengono individuati un Laboratorio di riferimento e diverse figure professionali tra cui il Direttore del Servizio di Medicina di Laboratorio e un POCT Manager Clinico in Laboratorio. Inizialmente deve essere valutata la strumentazione: il collocamento del test e dei materiali; gli obiettivi che si vogliono ottenere dal suo utilizzo; devono essere verificate le prestazioni analitiche dello strumento per garantire risultati affidabili ai pazienti. Tutti coloro che utilizzeranno lo strumento devono essere adeguatamente addestrati tramite corsi di formazione (D. G. R. del 28/02/23, n. 265). L'impiego del POCT si articola in tre fasi: una pre-analitica di raccolta e preparazione del campione, una analitica di esecuzione del test da parte dello strumento e una post-analitica che consiste nel rilascio dei risultati e la loro interpretazione. Per questo motivo la formazione del personale è importante, soprattutto per la gestione della fase pre-analitica, la quale risulta essere la più critica poiché l'inadeguata manipolazione dei campioni può generare risultati anomali (*Larkins et al., 2023*). Oltre alle valutazioni iniziali, lo strumento deve essere sottoposto nel tempo a continue verifiche per

garantire le adeguate garanzie di qualità. Ad esempio il controllo qualità dei nuovi lotti e reagenti.

Un altro punto importante è che lo strumento sia interfacciato con il sistema informativo del laboratorio (LIS) per la gestione di archiviazione dei dati e la condivisione dei risultati (*Venner et al., 2021*). La connessione dello strumento con il LIS è utile anche per l'esecuzione di un referto firmato dal Direttore di Laboratorio (D. G. R. del 28/02/23, n. 265). Infine è necessario valutare i costi per assicurarsi che l'applicazione del test sia davvero conveniente, considerando sia costi diretti che indiretti ed eseguendo un'analisi comparativa tra i costi del POCT e quelli del metodo tradizionale (*Gavina et al., 2023*).

I vantaggi che si possono ottenere dall'implementazione di un point-of-care testing sono numerosi. In un flusso di lavoro che utilizza un test di laboratorio il campione, dopo essere stato raccolto, viene imballato, trasportato al laboratorio e processato, in seguito viene rilasciato il referto e solo a questo punto i risultati sono disponibili. Tutto il processo sopra descritto può impiegare fino a qualche ora. Con l'utilizzo del POCT, invece, il test viene eseguito immediatamente e i risultati sono disponibili in pochi minuti. La rapidità con cui il POCT rilascia i risultati influisce positivamente sul processo decisionale clinico e sulla diagnosi. I vantaggi maggiori sono riscontrabili all'interno del pronto soccorso:

- il POCT può essere utile per ridurre i tempi di attesa dei pazienti e ridurre l'affollamento delle sale d'attesa;
- è possibile valutare tempestivamente i pazienti che giungono in PS in condizioni d'emergenza;
- la diagnosi precoce permette di velocizzare il ricovero, la dimissione e la somministrazione di un trattamento adeguato evitando lo spreco di risorse con cure inefficaci (*Larsson et al., 2015*).

Lo studio svolto da *Abualenain et al.* sull'effetto dei test point-of-care al triage, ha ritenuto utile l'inserimento di un POCT in un contesto di pronto soccorso per migliorare la gestione delle cure (*Abualenain et al., 2018*).

Anche lo studio svolto da *Olanrewaju et al.* ha valutato positivamente l'uso di un test point-of-care all'interno di un triage per il trattamento di pazienti ad alto rischio (*Olanrewaju et al., 2013*).

1.3 Malattia respiratoria acuta da SARS-CoV-2 (COVID-19)

A dicembre 2019 nella città di Wuhan in Cina sono stati registrati i primi casi di polmonite causati da un nuovo coronavirus, il SARS-CoV-2. Il virus si è diffuso prima localmente e poi in tutto il mondo. L'infezione respiratoria causata da SARS-CoV-2 è stata chiamata COVID-19 (*Corona Virus disease*). L'11 marzo l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha dichiarato l'inizio della pandemia (ISS, 2021). I dati dell'OMS aggiornati a gennaio 2024 riportano oltre 700 milioni di casi e oltre 7 milioni di decessi (WHO, 2024). I coronavirus sono un gruppo di virus in grado di causare infezioni respiratorie di diversa gravità; ad oggi se ne conoscono sette capaci di infettare l'uomo e gli animali. Altre due epidemie sono state causate dai coronavirus: la SARS-CoV (*Severe acute respiratory syndrome*) nel 2002 e la MERS-CoV (*Middle East respiratory syndrome*) nel 2012 (ISS, 2020).

I coronavirus fanno parte della famiglia *Coronaviridae* che comprende quattro generi: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*; sono virus a RNA a singolo filamento positivo (+ssRNA) (Pal et al., 2020).

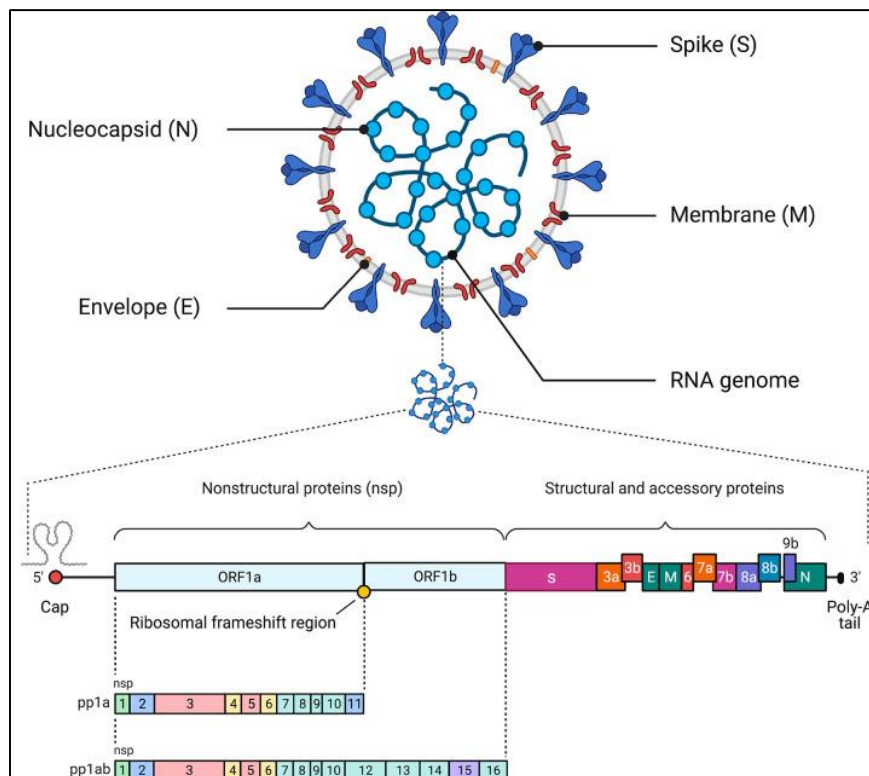


Figura 6. Struttura e genoma del virus Sars-CoV-2 (da Silva et al., 2022).

Il virione ha una struttura sferica con un diametro di circa 80-160 nM. Il genoma ha circa 30 kilobasi ed è costituito da una struttura 5'-cap e da una coda 3'-poli-A. Contiene i geni ORF1a e ORF1b per la codifica di proteine non strutturali (nps) coinvolte nella replicazione virale e i geni per la codifica delle proteine strutturali coinvolte nell'assemblaggio del virione: proteina spike (S), nucleocapside (N), membrana (M), involucro (E) (*da Silva et al., 2022*).

In particolare la proteina spike (S) è la componente che conferisce la caratteristica forma a corona da cui prende il nome il virus disponendosi a formare trimeri sulla superficie del virione (*Pal et al., 2020*).

Gli studi sul genoma del virus hanno evidenziato una somiglianza del 97-98% con il genoma di un virus ritrovato nei pipistrelli. Tuttavia tale somiglianza non è stata rilevata nei pipistrelli analizzati vicino a Wuhan. L'origine del virus non è quindi stata confermata ma è stata formulata l'ipotesi di possibili ospiti intermedi come ad esempio il pangolino malese poiché il virus ritrovato nell'animale ha riportato un'elevata somiglianza con la SARS-CoV-2 (*Singh et al., 2021*).

1.3.1 Caratteristiche cliniche dell'infezione da Sars-CoV-2

La trasmissione del virus da persona a persona avviene generalmente tramite il contatto con le goccioline respiratorie presenti nell'aria o dal contatto con una superficie infetta. Altre modalità meno comuni di infezioni comprendono il passaggio del virus dalla madre al feto o il contatto di feci e urine di persone malate. La trasmissione del virus può avvenire sia da persone sintomatiche che asintomatiche (*Ochani K., 2021*). In base alla temperatura e alla percentuale di umidità il virus è in grado di sopravvivere nell'ambiente anche per diversi giorni (*Pal et al., 2020*).

Il periodo di incubazione del virus prima della manifestazione dei sintomi varia da 2 a 5 giorni (*Singh et al., 2021*).

L'invasione del virus SARS-CoV-2 inizia con il riconoscimento da parte della proteina spike (S) del recettore cellulare ACE2 (enzima 2 di conversione dell'angiotensina) molto espresso nelle cellule respiratorie. Nello specifico la proteina S è costituita da due subunità: S1 e S2.

- La subunità S1 contiene il dominio di legame del recettore (RBD) che si lega ad ACE2
- La subunità S2 determina la fusione con la cellula ospite.

Le due subunità vengono quindi scisse dalla serina proteina 2 transmembrana (TMPRSS2) che ha un ruolo cruciale nell'attivazione e nell'ingresso del virus nella cellula.

È molto importante anche il sito di clivaggio polibasicco (PRRAR) presente tra S1 e S2 che aumenta la patogenicità del virus.

Successivamente attraverso cambiamenti strutturali complessi il virus si fonde con la membrana cellulare e rilascia l'RNA virale. Il genoma viene prima tradotto per ottenere il complesso di replicazione e l'RNA polimerasi nsp12 RNA-dipendente (RdRP). A questo punto il genoma viene replicato, trascritto e vengono sintetizzate le proteine strutturali che migrano nel reticolo endoplasmatico (RE) e nell'apparato di Golgi dove si assemblano in nuovi virioni, i quali escono dalla cellula tramite esocitosi (*V'kovski et al., 2021*).

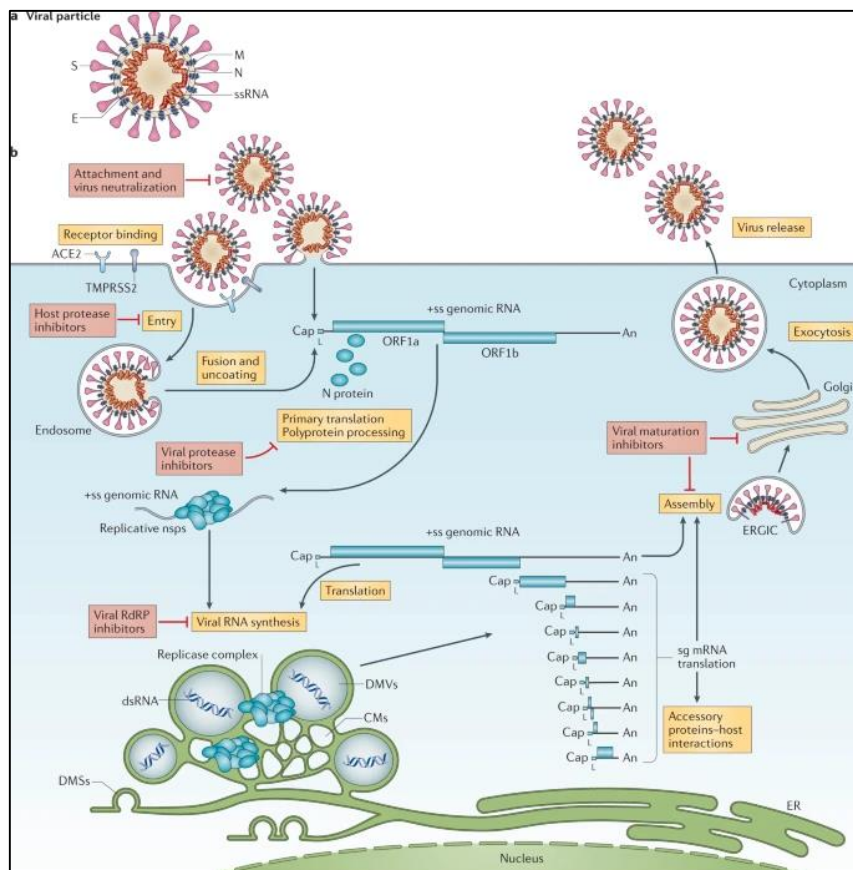


Figura 7. Ciclo di replicazione di SARS-CoV-2 (*V'kovski et al., 2021*).

L'infezione da SARS-CoV-2 può essere asintomatica: un paziente può risultare positivo al test per SARS-CoV-2 senza sviluppare sintomi. La maggior parte dei soggetti asintomatici sono pazienti giovani e bambini (*Acosta et al., 2022*).

Quando l'infezione è sintomatica i sintomi più comuni sono: febbre, tosse secca, mal di gola, affaticamento, difficoltà di respirazione. Altri sintomi comprendono: perdita di gusto e olfatto, diarrea e vomito, mialgia, congiuntivite, manifestazioni cutanee (*Mehta et al., 2020*).

La malattia può manifestarsi in maniera lieve oppure progredire a malattia grave con il peggioramento di diversi parametri respiratori come la saturazione dell'ossigeno che può scendere anche sotto il 94% (*Acosta et al., 2022*).

I fattori di rischio per COVID-19 grave sono: l'età avanzata, il sesso maschile, l'obesità e la presenza di malattie cardiovascolari e polmonari, il diabete, l'immunocompromissione (*Borkzuc et al., 2022*).

L'evoluzione della malattia dipende dalla risposta immunitaria dell'organismo nei confronti del virus. Vengono coinvolte sia l'immunità innata che quella adattativa. Nello specifico l'entrata del virus viene riconosciuto dai recettori toll-like (TLR) che si attivano e innescano la risposta infiammatoria. Viene attivato NF-kB che porta alla sintesi dell'interferone di tipo I (IFN), essenziale nella risposta antivirale. Un'alterata o una mancata risposta dell'interferone innesca un meccanismo proinfiammatorio che può far progredire la malattia verso una forma grave (*da Silva et al., 2022*). In generale in seguito ad una risposta dell'immunità innata iniziale segue l'immunità adattativa che coinvolge linfociti T CD8⁺. La presenza di entrambe le risposte permette alla malattia di mantenersi lieve.

In presenza di uno squilibrio a favore dell'immunità innata si verifica uno stato proinfiammatorio che determina una cascata di citochine tra cui IL-1 β , IL-1RA, TNF- α , G-CSF, CCL7, CXCL1, CXCL8, CXCL11 e CXCL12a. Vengono ridotti i linfociti T CD8⁺ e vengono coinvolti i macrofagi proinfiammatori; aumentano i neutrofili a bassa densità che promuovono la formazione di trappole extracellulari dei neutrofili (NET) che a loro volta stimolano la produzione di citochine. In generale si verifica quindi un'enorme e complessa risposta infiammatoria che risulta alla base del danno tissutale che caratterizza l'infezione da SARS-CoV-2 (*Borkzuc et al., 2022*). L'endotelio polmonare si indebolisce determinando la fuoriuscita di liquidi con formazione di edema (*da Silva et al., 2022*). Pazienti con polmonite da COVID-19 possono sviluppare complicanze gravi come la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS).

L'ARDS è la complicanza più comune e si manifesta in seguito all'elevato danno, edema alveolare e dell'interstizio polmonare. L'elevato stato infiammatorio causa distruzione degli alveoli e formazione di strutture fibrose. Tale condizione viene confermata dalla presenza di ipossiemia grave e infiltrati in entrambi i polmoni (*Acosta et al., 2022*).

Oltre alle complicanze respiratorie possono verificarsi complicanze extrapolmonari a carico di diversi organi, provocate probabilmente dall'espressione dell'ACE2 anche in altri tessuti come

l'intestino tenue, il cuore, i reni, e a bassi livelli nel cervello, nel sangue, nel midollo osseo, nella milza e nei muscoli (*da Silva et al., 2022*).

Le complicanze cardiovascolari sono molto diffuse e causano danno al miocardio, infarto e insufficienza cardiaca (*John et al., 2021*) ma anche aritmie e cardiopatie (*Kermani et al., 2020*). A livello neurologico sono state riscontrate convulsioni e confusione (*Yang et al., 2021*); lo stato infiammatorio generale può inoltre causare fenomeni trombotici e ictus. Questi ultimi possono verificarsi in tutto l'organismo in particolare sotto forma di tromboembolia venosa e/o arteriosa (*John et al., 2021*). Gravi complicanze al sistema endocrino si possono verificare in pazienti diabetici. Altre complicanze comprendono danno renale e danno epatico e danni a carico del sistema gastrointestinale. Il coinvolgimento di più organi può portare all'insufficienza multiorgano (*Kermani et al., 2020*).

Con il termine “*long-COVID*” o “*sindrome post-COVID*” si intende una serie di sintomi legati all'infezione da SARS-CoV-2 che persistono per settimane o mesi dopo la malattia. I sintomi possono essere strascichi della malattia che si protraggono nel tempo o nuovi sintomi che si manifestano in seguito. Affaticamento, stanchezza, problemi respiratori, dolori muscolari e articolari sono stati evidenziati come principali sintomi del “*long-COVID*”. Le cause possono essere molteplici e dipendono da come si è evoluta l'infezione nel soggetto (*Raveendran et al., 2021*).

Pazienti in terapia intensiva con bassa ossigenazione possono essere sottoposti a terapia con ossigeno supplementare, a ventilazione non invasiva (INV) e a ventilazione meccanica invasiva (IMV). Le terapie respiratorie di supporto sono state molto utilizzate durante la pandemia. Tuttavia alcuni studi hanno evidenziato che alcuni tipi di ventilazione non invasiva possono causare la diffusione del virus nell'ambiente circostante. Altri studi hanno evidenziato un alto tasso di mortalità nei pazienti sottoposti a questo trattamento (*Zhu et al., 2023*).

Sono disponibili diverse terapie farmacologiche.

Le terapie antivirali utilizzano farmaci che vanno ad agire e ad inibire la replicazione del virus. Il *remdesivir* è tra gli antivirali maggiormente utilizzato ed è un inibitore dell'RNA polimerasi. Il *lopinavir* è un agente antivirale che agisce come inibitore della proteasi molto spesso utilizzato in associazione con il *ritonavir*, in quanto l'associazione è risultata essere più efficace nel trattamento del COVID-19. Tra gli inibitori della trascrittasi inversa nucleosidica c'è il *Molnupiravir*, il quale è risultato molto utile nel ridurre le ospedalizzazioni (*Yuan et al., 2023*). Un'altra tipologia di terapia comprende tre gruppi di farmaci immunomodulanti che agiscono sulla risposta immunitaria causata dall'eccessivo rilascio di citochine. Comprendono

glucocorticoidi, inibitori della Janus chinasi (JAK) e inibitori del recettore dell'interleuchina-6: svolgono tutti un'azione antinfiammatoria andando ad agire ed inibire le vie di segnalazione che portano al rilascio delle citochine (*Narayanan et al., 2022*).

Un ultimo gruppo di terapie coinvolge l'utilizzo di anticorpi. In particolare la terapia con il plasma convalescente consiste nel prelevare il plasma da pazienti guariti dall'infezione da SARS-CoV-2 e somministrarlo ai pazienti malati. In questo modo gli anticorpi presenti nel plasma possono andare ad agire nei confronti del virus. Gli anticorpi monoclonali invece vengono prodotti dai linfociti B per agire contro un determinato bersaglio. Vengono poi somministrati al paziente e possono essere diretti verso mediatori dell'infiammazione o verso componenti del virus (*Niknam et al., 2022*).

1.3.2 Test diagnostici per il COVID-19

All'inizio dell'emergenza sanitaria causata dal COVID-19 la Food and Drug Administration ai sensi della sezione 564 della legge federale su alimenti, farmaci e cosmetici (FD&C) ha concesso l'autorizzazione all'uso di emergenza (EUA) di dispositivi medici non approvati. È stata concessa l'EUA a dispositivi per la protezione individuale e dispositivi diagnostici in vitro (IVD) per l'identificazione del COVID-19. Tali dispositivi sono rimasti attualmente in uso (*FDA, 2023*).

Tra i molti dispositivi autorizzati dall'EUA alcuni strumenti utilizzati per la diagnostica del COVID-19 si basano su tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici (NAT):

- amplificazione non isotermica che comprende diverse tipologie di RT-PCR (RT-PCR in tempo reale, RT-PCR sul punto finale, RT-PCR digitale, qSTAR)
- amplificazione isotermica
- tecniche di sequenziamento tra cui sequenziamento di Sanger, dove ad una fase di amplificazione tramite PCR segue una fase di sequenziamento del genoma di SARS-CoV-2 e Next-generation-Sequencing (NGS).

I geni bersaglio comunemente rilevati dai NAT sono *Orf1ab*, *RdRp*, *S*, *M*, *N*, *E*, *Orf8*.

La RT-PCR è ancora considerata la metodica di riferimento per la diagnostica del COVID-19. Per l'amplificazione dell'RNA virale utilizza una trascrittasi inversa che dal filamento di RNA sintetizza un filamento singolo di DNA complementare (cDNA). Il cDNA viene convertito in DNA a doppio filamento dalla DNA polimerasi (dsDNA). Il DNA a questo punto va incontro

alle tre fasi della PCR: denaturazione, appaiamento ed estensione. Queste fasi vengono ripetute per diversi cicli. L'identificazione del patogeno avviene grazie ad una sonda fluorescente.

Il risultato quantitativo viene misurato tramite i cicli soglia (Ct). Il ciclo soglia è quel numero del ciclo della PCR per cui viene rilevata la fluorescenza. Più è basso, maggiore è la carica virale (Yu et al., 2021).

Un'altra tipologia di test autorizzata dall'FDA sono i test sierologici utilizzati per rilevare la presenza degli anticorpi prodotti in seguito all'infezione da SARS-CoV-2. Le IgM sono le prime ad essere prodotte, le IgG invece rimangono in circolo anche per diversi mesi. Questo test è quindi utile per differenziare un'infezione pregressa da una in corso. Molti test sierologici vengono usati come POCT (Illiescu et al., 2021).

Un altro tipo di test rapidi sono quelli a flusso laterale: sembrano essere i più vantaggiosi e possono rilevare sia gli anticorpi IgG/IgM sia gli antigeni del virus. La procedura di esecuzione del test è rappresentata nella Figura 8.

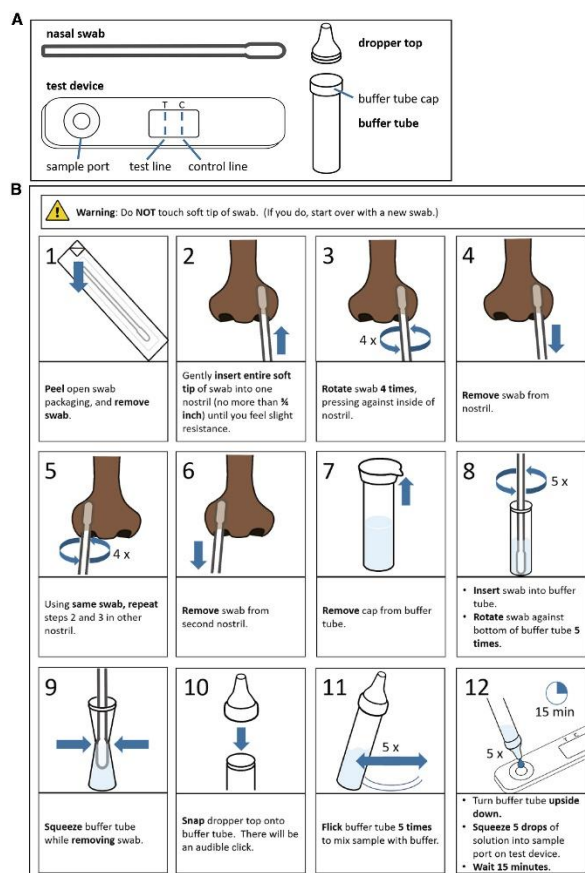


Figura 8. Test a flusso laterale per il rilevamento di SARS-CoV-2 (Farmer et al., 2021).

Anche molti POCT basati sulla microfluidica sono stati adattati per la diagnostica del COVID-19 (*Illiescu et al., 2021*).

1.3.3 Gestione e prevenzione del COVID-19

La pandemia da COVID-19 ha generato un enorme impatto economico e sociale in tutto il mondo.

Le problematiche economiche si sono verificate, oltre che in ambito sanitario, anche nel mondo del lavoro a causa delle rigide misure restrittive che hanno portato le attività commerciali a chiudere per diversi mesi. Nella popolazione la pandemia ha causato elevati danni psicologici a causa dello stress e dell'isolamento sociale preventivo (*Shrestha et al., 2020*).

Per limitare la diffusione del virus le principali istituzioni hanno consigliato il lavaggio frequente delle mani e il distanziamento interpersonale e hanno introdotto altre azioni di prevenzione obbligatorie tra cui indossare le mascherine in luogo pubblico e la quarantena per le persone che risultavano positive al COVID-19 (*Ahmad et al., 2022*).

In Italia è stato istituito un sistema di sorveglianza nazionale per raccogliere e monitorare i casi positivi al COVID-19 e il numero di pazienti ricoverati. I pazienti venivano testati presso laboratori autorizzati tramite la tecnica molecolare e i dati venivano trasmessi e raccolti dall'Istituto Superiore di Sanità (*ISS, 2022*).

In seguito alla diminuzione dei casi e al miglioramento della situazione generale, il 5 maggio 2023 l'OMS ha dichiarato la fine dell'emergenza sanitaria del COVID-19 (*WHO, 2023*).

Già nei primi mesi del 2020, quando è stata rilasciata la sequenza genomica di SARS-CoV-2, le principali aziende farmaceutiche hanno iniziato a sviluppare i primi vaccini contro il COVID-19, anche sulla base di vaccini già esistenti.

In meno di un anno, nel dicembre 2020, il primo vaccino è stato approvato dall'European Medicine Agency (EMA) in Europa e dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) in Italia.

Normalmente lo sviluppo e l'approvazione dei vaccini dura anni; infatti questi ultimi devono essere valutati mediante studi sperimentali divisi in tre fasi, nelle quali diversi gruppi di volontari sani si sottopongono alla vaccinazione.

Durante l'emergenza sanitaria l'EMA ha velocizzato tali fasi utilizzando la cosiddetta 'autorizzazione condizionata' che ha permesso in poco tempo l'immissione in commercio e l'utilizzo dei vaccini (*ISS, 2024*).

Sono state sviluppate quattro principali tipologie di vaccini:

- vaccino a mRNA: contiene un frammento di mRNA che codifica per una proteina virale la quale una volta prodotta viene riconosciuta come estranea all'organismo e scatena la risposta immunitaria con la produzione di anticorpi.

I vaccini che si basano su questa tecnologia sono il Pfizer-BioNTech (BNT162b2) e il Moderna mRNA (mRNA 1273) e sono stati i primi ad essere autorizzati dall'EMA.

Nello specifico l'mRNA di Moderna codifica per la proteina spike mentre l'mRNA di Pfizer codifica per il dominio RBD (*Hillary et al., 2023*);

- vaccino a vettore virale: contiene un virus non patogeno e non replicante che contiene un vettore virale ricombinante codificante per un antigene che attiva la risposta immunitaria. I vaccini a vettore virale sono: Vaxzevria (ex AstraZeneca) e Jcovden (ex Janssen Johnson & Johnson). Questi vaccini non sono più disponibili in Italia (*ISS, 2024*);
- vaccino a subunità proteica: contiene subunità proteiche prodotte in vitro tra cui la proteina spike. I vaccini autorizzati sono Nuvaxovid (Novovax) e VidPrevtyn Beta (Sanofi);
- vaccino a virus inattivato: il vaccino Valvena è stato autorizzato ma non ancora commercializzato (*ISS, 2024*).

In tutto il mondo sono stati sviluppati altri vaccini che utilizzano queste tecnologie ma che non sono stati approvati dall'EMA, ad esempio lo Sputnik V (Gam-COVID-Vac), il Sinopharm (BBIBP), il CoronaVac (SinoVac) (*Hillary et al., 2023*).

Dall'inizio della pandemia ad oggi il genoma del virus ha subito delle mutazioni che hanno causato lo sviluppo di varianti: cinque varianti definite 'problematiche' (COV) come Alpha, Beta, Omicron; otto varianti definite 'di interesse' (VOI) come Epsilon, Kappa, Teta. L'OMS e il CDC monitorano costantemente le nuove varianti, le caratterizzano e le classificano (*Hillary et al., 2023*). Poiché lo sviluppo di varianti può inficiare sull'efficacia dei vaccini, questi ultimi vengono continuamente modificati ed adattati (*ISS, 2024*).

In Italia la campagna vaccinale è stata svolta previa la creazione di un piano nazionale, il quale ha previsto la somministrazione dei vaccini inizialmente ad alcune categorie di persone tra cui il personale sanitario e delle RSA, le persone anziane o con comorbidità (*ISS, 2024*).

I vaccini contro il COVID-19 sono stati utili nel prevenire lo sviluppo della malattia da COVID-19 grave, ridurre i ricoveri e le morti. Tuttavia non sono stati utili nel ridurre la trasmissibilità del virus (*ISS, 2024*).

1.4 Influenza A e B

I virus dell'influenza fanno parte della famiglia degli *Orthomyxoviridae* e hanno un genoma a RNA a singolo filamento negativo. Esistono quattro tipi di virus dell'influenza: A e B che causano la cosiddetta 'influenza stagionale', dove il ceppo A è quello predominante. Infettano sia l'uomo che gli animali, in particolare per il ceppo A gli uccelli sono il principale serbatoio. Il ceppo C causa sintomi più lievi e il ceppo D infetta solo gli animali (*Javanian et al., 2021*). I ceppi A e B sono simili e possono avere una forma sferica o filamentosa (*Nuwarda et al., 2021*). In particolare la superficie del virione dell'Influenza A è ricoperta da due glicoproteine: emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA); il virione è anche costituito da proteine del canale ionico della matrice (M2), dalla proteina della matrice M1 e dalle proteine NS1 e NS2. Nel nucleo contiene otto segmenti di RNA a singolo filamento legati a nucleoproteine (NP). La RNA polimerasi RNA-dipendente è costituita da un acido della polimerasi (PA), da una polimerasi base 1 (PB1) e una polimerasi base 2 (PB2) e quando si lega al segmento di RNA forma la ribonucleoproteina virale (vRNP) (*Eichberg et al., 2022*).

Esistono 18 varianti della proteina HA e 11 della proteina NA. Dalla combinazione delle varianti di NA e HA si generano i diversi sottotipi dell'influenza A ad esempio A/H3N2.

Dell'Influenza B ci sono invece due linee principali: B/Yamagata e B/Victoria (*Nuwarda et al., 2021*).

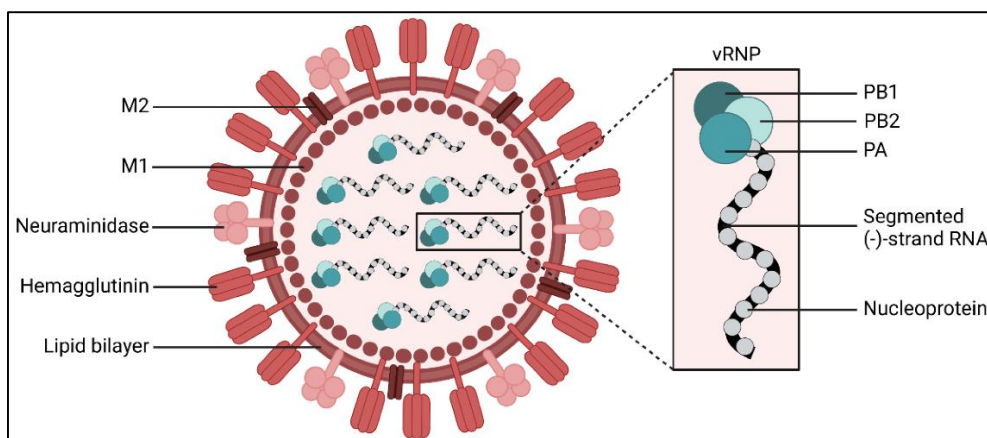


Figura 9. Struttura del virus dell'Influenza A (*Eichberg et al., 2022*).

Le varianti antigeniche di HA e NA si generano durante la replicazione causando un fenomeno chiamato deriva antigenica. Si tratta di una modifica post-traduzionale che determina eventi di glicosilazione, in particolari regioni di HA e NA. Questi cambiamenti possono modificare la risposta immunitaria al virus nonché la risposta del trattamento (*Nuwarda et al., 2021*).

Ogni anno l'influenza causa epidemie e milioni di malati con picchi di infezione che si verificano nei mesi più freddi. La malattia si manifesta come un'infezione respiratoria non grave con sintomi quali febbre, tosse e dolori muscolari, che si presentano entro un paio di giorni dall'infezione. La malattia si risolve generalmente entro una settimana. La principale complicanza respiratoria è la polmonite che si verifica soprattutto nei soggetti anziani (*Gaitonde et al., 2019*).

Durante i periodi di maggior diffusione del virus i pazienti che giungono in pronto soccorso non vengono solitamente testati per l'influenza ma la diagnosi viene fatta tramite una valutazione dei sintomi. Solo in alcuni casi, come il ricovero, il paziente viene sottoposto al test dell'influenza.

Anche per l'influenza, oltre alla RT-PCR, sono stati sviluppati molti test diagnostici point-of-care molto vantaggiosi per le motivazioni discusse in precedenza. Sono stati sviluppati inoltre test multiplex in grado di rilevare contemporaneamente il virus dell'Influenza A, B e SARS-CoV-2.

In caso di positività al virus dell'influenza, il paziente viene sottoposto alla terapia con uno dei quattro farmaci antivirali autorizzati dalla FDA: *oseltamivir*, quello maggiormente utilizzato, *zanamivir*, *peramivir* e *baloxavir*. Si tratta di inibitori della NA e secondo diversi studi, dimostrano una maggiore efficacia se somministrati entro 36 ore dalla comparsa dei sintomi (*Gaitonde et al., 2019*).

Durante la pandemia da COVID-19 all'inizio del 2020 è stata osservata una diminuzione dell'attività influenzale che si è protratta fino alla fine del 2021. La riduzione della diffusione del virus è stata determinata dall'introduzione delle misure di isolamento sociale e dall'utilizzo dei dispositivi di protezione individuale. In seguito all'allentamento delle restrizioni l'attività del virus è aumentata nuovamente. A causa dell'enorme impatto che il virus genera a livello sanitario, è importante ridurre il carico della malattia tramite la prevenzione vaccinale.

La vaccinazione antinfluenzale viene fatta nuovamente ogni anno in quanto i vaccini vengono modificati ed adattati sulla base delle nuove varianti genetiche.

I vaccini antinfluenzali contengono una certa quantità di antigeni dell'emoagglutinina che varia a seconda del tipo di vaccino. Contengono sempre due ceppi dell'influenza A (H1N1 e H3N2) e a seconda se si trovano associati ad uno o due ceppi dell'influenza B vengono commercializzati come quadrivalenti o trivalenti (*Uyeki et al., 2022*). I vaccini disponibili sono:

- vaccino antinfluenzale inattivato (IIV) che viene fatto crescere su uova di gallina o cellule e successivamente estratto e inattivato chimicamente;
- vaccino antinfluenzale vivo attenuato (LAIIV) che è sviluppato con virus adattati al freddo e viene somministrato per via intranasale;
- vaccino HA ricombinante che è stato sviluppato tramite il trasferimento della sequenza che codifica per l'antigene HA in un *baculovirus* tramite la tecnica del DNA ricombinante (*Nuwarda et al., 2021*).

2. Scopo del lavoro

La pandemia da COVID-19 ha messo in luce le numerose mancanze presenti in ambito sanitario. La necessità di testare un grande numero di pazienti con strumenti di laboratorio ha causato molte difficoltà nelle tempistiche e nella gestione dei pazienti malati. L'emergenza sanitaria ha quindi evidenziato la necessità di aumentare ed implementare in ambito ospedaliero il numero di test rapidi ed affidabili per la gestione delle malattie infettive.

Lo studio è stato svolto presso il Pronto Soccorso pediatrico e la S.C. Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria. Durante la pandemia da COVID-19 i pazienti positivi venivano gestiti secondo le procedure riportate sul Documento a Valenza Aziendale n° 103 dell'Ospedale di Alessandria. Tale documento riportava che “ai pazienti e agli accompagnatori (genitori/tutor) che necessitano di ricovero verrà eseguito il test molecolare. Nel caso in cui il paziente o il genitore, o entrambi, risultino positivi il ricovero avverrà in settore covid.” (DVA 103 dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria).

Lo studio clinico, denominato POCT-FLUCO, ha lo scopo di valutare le performance analitiche del point-of-care test ID NOW COVID-19 2.0 (Abbott Rapid Diagnostic srl) nel rilevamento del COVID-19 e dell'Influenza A e B rispetto alla metodica di riferimento utilizzata presso la S.C. Microbiologia e Virologia: la Real-Time PCR. E successivamente di inserire definitivamente lo strumento presso il Pronto Soccorso Pediatrico sostituendolo alla metodica tradizionale. Tale implementazione ha l'obiettivo di:

- ottenere più velocemente i risultati rispetto alla metodica di riferimento
- ridurre il numero di campioni da trasportare dal Pronto Soccorso al laboratorio
- migliorare il flusso di lavoro
- velocizzare la diagnosi di malattie infettive con eventuale isolamento del paziente malato

Un ulteriore obiettivo futuro è quello di utilizzare lo strumento per ridurre l'uso di antibiotici.

Lo scopo del lavoro è stato raggiunto tramite la realizzazione di un piano di lavoro e la collaborazione del personale dei diversi reparti coinvolti.

3. Materiali e metodi

3.1 Progettazione dello studio

Lo studio è uno studio monocentrico osservazionale prospettico che è stato svolto con una durata di arruolamento dei pazienti di circa tre mesi. Sono stati arruolati per lo studio tutti i pazienti con età ≤ 18 anni che sono giunti al Pronto Soccorso nel periodo da dicembre 2022 e febbraio 2023. Sono stati inclusi nello studio solo i pazienti per cui la pratica clinica richiedeva un tampone molecolare.

L'iter diagnostico prevedeva per ogni paziente arruolato la raccolta di due tamponi in parallelo per l'identificazione di COVID-19, Influenza A, Influenza B ed eventuali coinfezioni: un tampone nasale per il test molecolare rapido da eseguire sul point-of-care test ID NOWTM COVID-19 2.0 e un tampone nasofaringeo per il test molecolare da eseguire con la tecnica di riferimento Real Time PCR.

Lo studio ha ottenuto il parere favorevole del Comitato etico interaziendale dell'Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria e la relativa autorizzazione della Direzione Aziendale cui afferisce il centro di sperimentazione.

3.2 Addestramento del personale sanitario

Prima dell'inizio dello studio il personale sanitario è stato addestrato all'utilizzo dello strumento ID NOWTM COVID-19 2.0 da tutor abilitati.

Durante lo studio al personale del Pronto Soccorso che ha utilizzato lo strumento è stato consegnato un breve questionario al fine di valutare il loro livello di soddisfazione nell'utilizzo del POCT, la sua sicurezza e praticità ai fini diagnostici.

3.3 Arruolamento del paziente

Il paziente che è giunto al Pronto Soccorso Pediatrico è stato sottoposto alle procedure svolte dal personale infermieristico del triage. Sono stati raccolti alcuni dati quali informazioni personali, motivo di accesso al Pronto Soccorso, eventuali terapie in corso e allergie seguiti da una prima valutazione del paziente tramite la misurazione dei parametri vitali.

Il paziente è stato sottoposto al test antigenico rapido con l'utilizzo di LumiraDx SARS-CoV-2 Ag Test. Il test è un POCT che utilizza una tecnologia a immunofluorescenza microfluidica per la rilevazione qualitativa dell'antigene in campioni nasali o nasofaringei.

Il paziente è stato visitato da un medico, il quale ha richiesto eventuali esami: di laboratorio (ematici, urinocoltura, film array, emocoltura) e strumentali (radiografia, ecografia).

Il test antigenico rapido è stato effettuato su tutti i pazienti che hanno fatto l'accesso al Pronto Soccorso mentre solo in caso di ricovero è stato effettuato il tampone molecolare.

Simultaneamente al tampone molecolare, al paziente è stato effettuato un tampone nasale processato su ID NOW™ COVID-19 2.0 dal personale sanitario.

Il test è stato effettuato solo in seguito all'ottenimento del consenso alla partecipazione allo studio tramite firma di un genitore.

3.4 Test molecolare ID NOW™

L' ID NOW™ è un test point-of-care prodotto dall'azienda Abbott Rapid Diagnostics srl. Si avvale di un sistema isotermico basato su strumento per il rilevamento qualitativo rapido delle malattie infettive. Utilizza la tecnologia di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT), in particolare la reazione di amplificazione da enzimi di restrizione (NEAR) (descritta brevemente nel paragrafo 1.2.1.). È utilizzato per la diagnosi di infezioni da: COVID-19, Influenza A e B, Streptococco A, Virus Respiratorio Sinciziale (RVS). La regione di amplificazione dell'RNA è il segmento RdRp per il SARS-CoV-2, PB2 per l'Influenza A, PA per l'Influenza B. I target amplificati vengono rilevati grazie a molecole segnale fluorescenti.



Figura 10. Strumento ID NOW™ collegato con l'apposita stampante per la stampa dei risultati e la pistola per scansione il barcode del paziente presente sul campione.

3.4.2 Materiale utilizzato per l'esecuzione del test

- Strumento ID NOW™
- Materiale fornito dal kit:
 - base per test: costituita da due tubi con i reagenti liofilizzati nei quali avvengono le reazioni di amplificazione e identificazione dell'RNA virale.
 - supporto campione: contiene 2.5 mL di soluzione tampone con un acido debole, un detergente, sali e un agente antimicrobico.
 - cartuccia di trasferimento: usata per trasferire 2 x 100 µL di campione dal supporto campione alla base per test.
 - tampone sterile per la raccolta del campione
 - foglietto illustrativo

Altri materiali non presenti nel kit:

- Provetta vuota
- Guanti monouso

I kit sono stati conservati ad una temperatura compresa tra 2 C° e 30 C° e utilizzati entro la data di scadenza riportata sulla scatola. I tamponi sono stati processati direttamente sullo strumento subito dopo il prelievo senza eluizione in liquido di trasporto o in alternativa conservati a secco in una provetta vuota a temperatura ambiente e processati entro 1 ora.

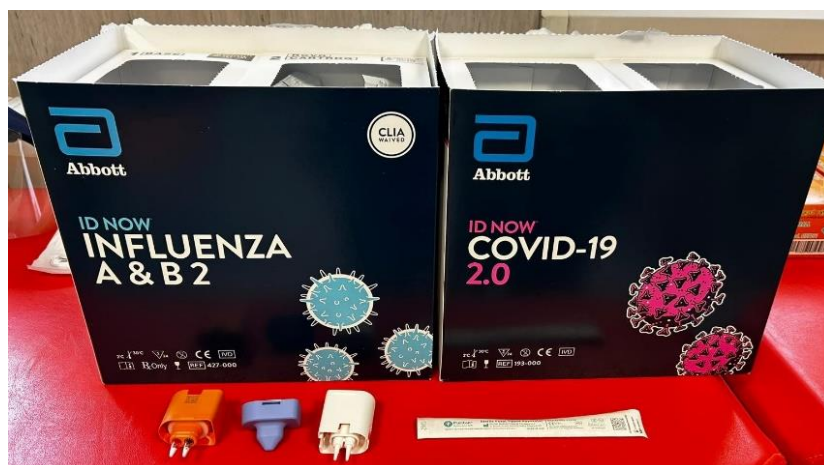


Figura 11. Scatole contenenti i kit per l'esecuzione dei test dell'Influenza A & B e del COVID-19.

3.4.3 Procedura per l'esecuzione del test

1. Accendere l'ID NOW™ premendo il bottone sul lato dello strumento.
2. Inserire ID Utente e password dello strumento.
3. Toccare su “Esegui Test”.
4. Scegliere il test da eseguire selezionando “COVID-19”.

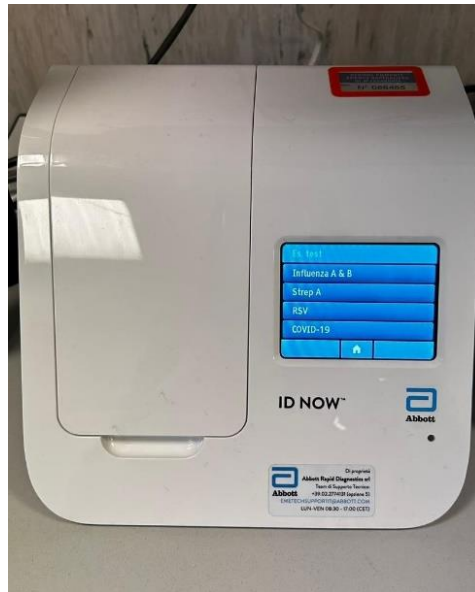


Figura 12. Schermata dello strumento per la scelta del test da eseguire.

5. A questo punto l'operatore inserirà l'ID Paziente manualmente oppure scannerizzando il barcode corrispondente al paziente e confermerà l'operazione.
6. Lo strumento chiederà di aprire il coperchio e inserire la base test arancione sull'apposito supporto arancione.
7. Successivamente, dopo aver confermato l'inizio del test, lo strumento chiederà all'operatore di inserire il ricevitore campione blu sul supporto per il ricevitore campione del colore corrispondente.



Figura 13. Fase iniziale del test con inserimento della base test.

8. A questo punto il display mostrerà il tempo necessario al ricevitore campione per riscaldarsi (circa 3 minuti). Durante il riscaldamento l'operatore non deve rimuovere nessun componente o chiudere il coperchio.



Figura 14. Riscaldamento del ricevitore campione.

9. Una volta terminato il tempo di riscaldamento si dovrà rimuovere la pellicola dal ricevitore campione e inserire il tampone nasale all'interno del liquido per 10 secondi.

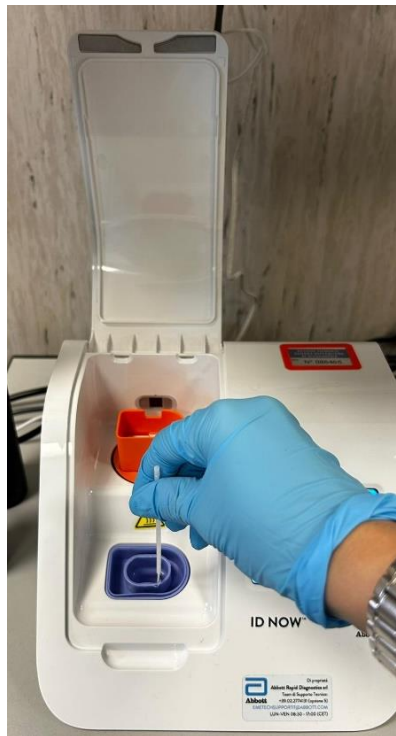


Figura 15. Diluizione del campione nel ricevitore campione.

10. Il campione verrà trasferito alla base test tramite la cartuccia di trasferimento bianca; premendo la cartuccia prima sul ricevitore campione per raccogliere il campione e premendo nuovamente la cartuccia nella base test per dispensarlo. È importante che il campione venga dispensato correttamente affinché il test risulti valido.



Figura 16. Trasferimento del campione nella base test.

11. Lo strumento chiederà di chiudere il coperchio e di attendere dai 6 ai 12 minuti per i risultati. I risultati saranno disponibili in 6 minuti in caso di positività e in 12 minuti in caso di negatività. Sullo schermo apparirà il risultato del test eseguito: Negativo, Positivo o Invalido. In caso di risultato Invalido è possibile ripetere il test utilizzando lo stesso ricevitore campione. Il risultato verrà stampato alla fine di ogni test dall'apposita stampante collegata allo strumento.



Figura 17. Schermata dello strumento con i risultati dei test.

12. Una volta completato il test “COVID-19”, l’operatore, tramite l’opzione ‘Azioni’, selezionerà “COMBO: COVID-19 + Flu A & B” che permetterà di eseguire il test dell’Influenza A e B in maniera sequenziale al test del COVID-19 utilizzando lo stesso tampone e ricevitore campione. Per l’esecuzione del test vedere punti 6; 10; 11.
13. Alla fine del test l’operatore smaltirà le componenti utilizzate per eseguire il test seguendo le indicazioni presenti sul display.



Figura 18. Rimozione delle componenti dallo strumento per lo smaltimento.

3.4.4 Controlli qualità dei test

Lo strumento include un Controllo Procedurale ovvero un controllo interno che esegue ad ogni test per verificare il corretto funzionamento dello strumento, l’integrità dei reagenti e la mancanza di inibizione del campione. Se il test viene eseguito correttamente lo schermo mostra la scritta ‘Controllo Procedurale Valido’.

I controlli esterni sono stati eseguiti ad ogni nuovo lotto. Per i controlli positivi sono stati utilizzati i tamponi di controllo positivi presenti all’interno dei kit; tamponi sterili per i controlli negativi.

3.5 Rilevamento di Sars-CoV-2 e di Influenza A e B tramite la tecnica di riferimento: RT-PCR

Per l'esecuzione del tampone molecolare al paziente è stato prelevato un campione nasofaringeo tramite l'utilizzo di Copan Universal Transport Medium® (UTM®-RT) System. È utilizzato per la raccolta, il trasporto e il mantenimento di componenti per la diagnostica molecolare di virus. Contiene proteine per la stabilizzazione del virus, antibiotici che impediscono la crescita di batteri e lieviti e una soluzione tampone che mantiene un pH neutro. Sul campione è stata applicata l'etichetta corrispondente al paziente ed è stato inviato al laboratorio della S.C. Microbiologia e Virologia.

Presso il laboratorio il campione è stato processato utilizzando due strumenti diversi.

- **Standard™ M10 – SD BIOSENSOR** per l'identificazione di SARS-CoV-2.



Figura 19. Strumento SD BIOSENSOR – STANDARD M10 costituita da sei moduli per l'inserimento delle cartucce contenenti il campione.

È un test molecolare che utilizza la tecnica di amplificazione degli acidi nucleici, la Real Time PCR, per l'identificazione dell'RNA virale di SARS-CoV-2. Il test si basa sull'uso di cartucce STANDARD™ M10 SARS-CoV-2 che contengono reagenti per l'amplificazione e l'estrazione dell'acido nucleico. Lo strumento è in grado rilevare i geni ORF1ab e E con i rispettivi cicli soglia (Cyclethreshold). I risultati sono disponibili entro 60 minuti.

Per l'esecuzione del test si rimuove la linguetta di sicurezza della cartuccia, si preme sul coperchio per forare la cartuccia sigillata. Si apre il coperchio, si prelevano 600 μ L di campione e si inseriscono nella camera campione.



Figura 20. Procedimento per la preparazione del campione da testare.

Si scannerizza sull'M10 il codice a barre del tampone e il QR Code della cartuccia e la si inserisce in uno dei moduli disponibili dello strumento.

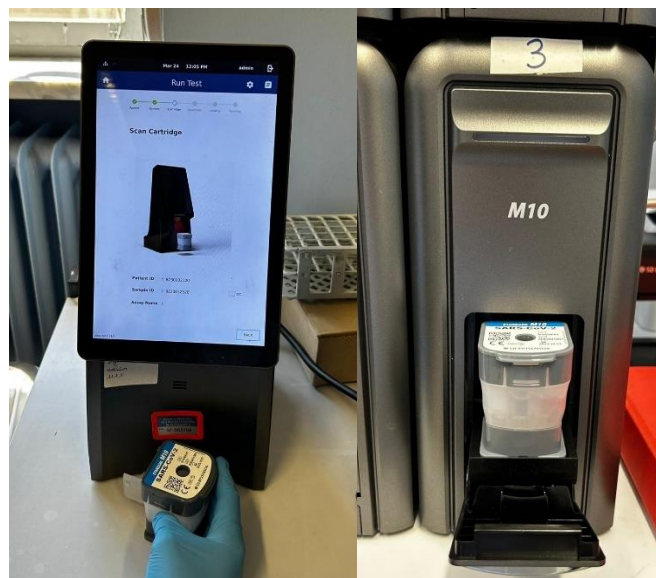


Figura 21. Inserimento della cartuccia con il campione nello strumento.

- **GeneXpert System – Cepheid** per l'identificazione di Influenza A e Influenza B.

Lo strumento utilizza la tecnologia di amplificazione degli acidi nucleici tramite l'utilizzo di cartucce Xpert® Xpress Flu/RSV che contengono enzimi, tra cui la Taq Polimerasi, primer e sonde per sequenze specifiche e controlli interni. Lo strumento è in grado di identificare i geni Flu A (per l'Influenza A), Flu B (per l'Influenza B), RVS (per il Virus Respiratorio Sinciziale).

Per l'esecuzione del test si preleva una certa quantità di campione e la si inserisce all'interno della cartuccia.

Si scannerizza il codice a barre del campione e il QR Code della cartuccia e la si inserisce in uno dei moduli disponibili dello strumento.

I risultati sono disponibili entro 20 minuti circa.

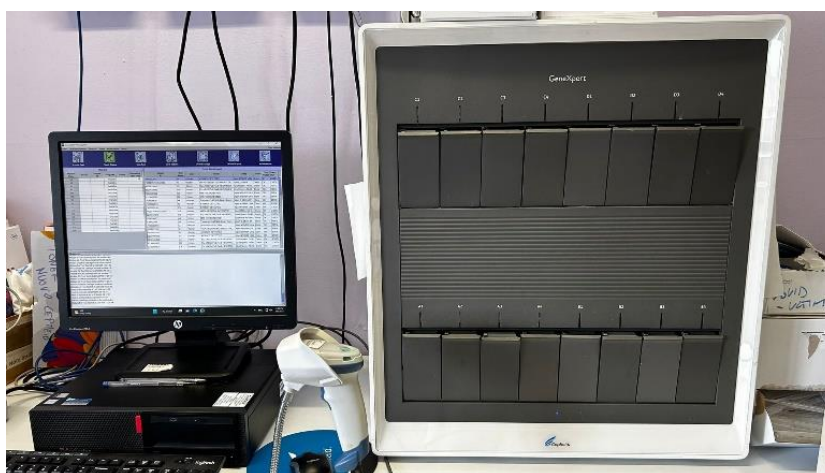


Figura 22. Strumento GeneXpert System con 16 moduli collegato al computer per la visualizzazione dei risultati.

3.7 Raccolta dei dati

La gestione e la raccolta dei dati dei pazienti arruolati si sono svolte in diverse fasi.

- Gestione e raccolta dei dati: le informazioni personali dei pazienti sono state ottenute dalla consultazione della cartella clinica e dalla scheda di accettazione del Pronto Soccorso; i risultati dei test processati su Standard™ M10 e GeneXpert System sono stati caricati sul

sistema TrakCare, il sistema di archiviazione cartelle dell’Ospedale di Alessandria; i risultati dei test eseguiti su ID NOW™ sono stati raccolti tramite la creazione di fogli di lavoro sui quali sono stati riportati i risultati rilasciati dallo strumento alla fine di ogni test.

AOAL Dipartimento di Servizi Ospedalieri S.C. Microbiologia e Virologia		LISTA DI LAVORO TAMPONI ID NOW ABBOTT COVID-19		Mod. MCR 052/A
		STRUMENTO.....		Rev. 00 del 15/12/2020
		Data.....		
N°	ETICHETTA	NOME	COGNOME	DATA DI NASCITA
	Test COVID-19 ID paziente: prova1 Data: 17Mar2022 Ora: 10:30 COVID-19: Negativo Contr. procedurale valido N. lotto: 3306425 ID test: 28-8470-026-01 ID lab: 100-503040 ID ut.: admin Num. di serie strumento: 2204010 ID NOW			
	Test influenza A e B ID paziente: prova1 Data: 17Mar2022 Ora: 10:43 Influenza A: Negativo Influenza B: Negativo Contr. procedurale valido N. lotto: M22105 ID test: 172296-747-4f ID lab: ac7b-est4014015a ID ut.: admin Num. di serie strumento: 23184010 ID NOW			

Figura 23. Tabella di lavoro sulla quale inserire le etichette con risultati dei test, il nome, il cognome e la data di nascita del paziente

- Sviluppo del database: è stato sviluppato il database utilizzando la piattaforma REDCap (Research Electronic Data Capture) che è un programma per la creazione e la gestione di sondaggi e database online in sicurezza.
- Inserimento dei dati sul database: i dati sono stati inseriti sul database alla fine dello studio dal Dipartimento di Attività Integrate Ricerca e Innovazione.

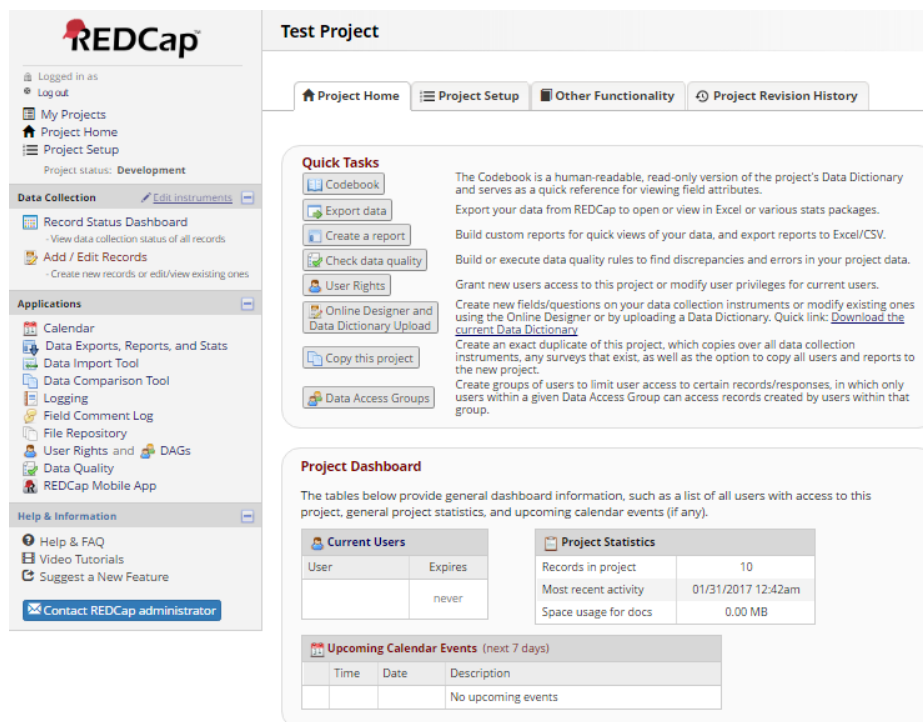


Figura 24. Schermata principale del sistema REDCap

- **Dati anagrafici del paziente:** nome, cognome, sesso, nazionalità, data di nascita, età
- **Dati di accesso al pronto soccorso:** data di accesso, patologia in entrata, sintomi simil-influenzali, durata della sintomatologia, temperatura corporea (°C)
- **Dati sui test effettuati:** risultato tampone antigenico, risultato tampone molecolare per COVID-19 e relativi cicli soglia, risultato tampone molecolare per Influenza A e B e relativi cicli soglia, risultato tampone eseguito su ID NOW™, risultato tampone per il virus respiratorio sinciziale (RVS) e relativi cicli soglia
- **Esame del sangue**
- **Prestazioni eseguite:** radiografia al torace, film-array respiratorio, consulenza infettivologica
- **Informazioni sul ricovero:** tipo di trattamento farmacologico, durata del trattamento, posologia
- **Complicanze**
- **Informazioni sulla dimissione:** data della dimissione, modalità (spostato in un altro ospedale, a domicilio, deceduto), diagnosi alla dimissione, indicazioni farmacologiche

Figura 25. Variabili raccolte e inserite nel database

3.8 Analisi statistica dei dati

Le variabili continue sono state espresse come mediana e intervallo interquartile (IQR), le variabili categoriali come numeri assoluti e percentuali. Sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (PPV), valore predittivo negativo (NPV) sono stati espressi con intervalli di confidenza al 95% (IC 95%). Le analisi statistiche sono state eseguite con il software Jamovi (Versione 2.3).

4. Risultati

4.1 Popolazione

In questo studio sono stati arruolati 234 pazienti di cui 40 sono stati esclusi. Sono stati inclusi nello studio solo i pazienti per i quali erano presenti i risultati di tutti i test. I risultati mancanti per i tamponi molecolari erano: 13 per il COVID-19, 26 per Influenza A e Influenza B. Mentre per l'ID NOW™ COVID-19 2.0 mancava il risultato di 1 tampone. Il numero di pazienti finali inclusi nello studio è stato 194.

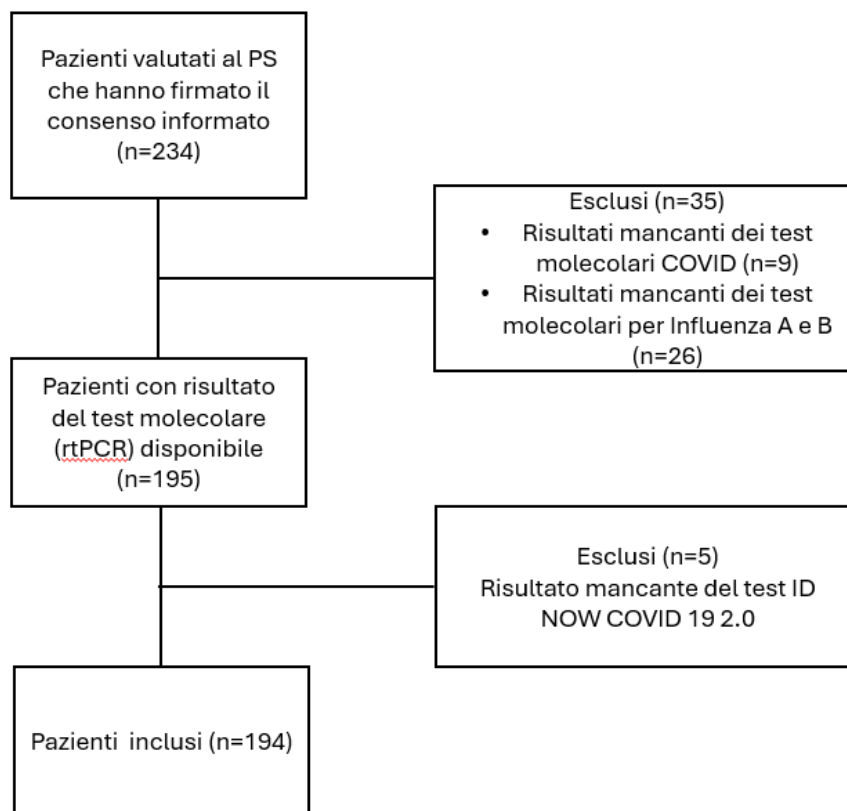


Figura 26. Diagramma di flusso dei pazienti inclusi ed esclusi dallo studio.

La popolazione era costituita da 123 maschi (63.4%) e 71 femmine (36.6%) e l'età mediana era di 2.92 (IQR: 0.89-5.83). Essendo l'età mediana molto bassa la popolazione è stata suddivisa in due gruppi di età: un gruppo da 0 a 3 anni, un gruppo > 3 anni. Il numero di pazienti per le due classi di età era rispettivamente 101 (52.1%) e 93 (47.9%).

Nella Tabella 1 sono riportate le diagnosi al momento di accesso al Pronto Soccorso della popolazione totale espresse in frequenze e in percentuale.

Diagnosi in entrata	Frequenze	% del totale
Altra patologia non definita	17	8.8%
Convulsioni/alterazioni della coscienza - neurologica	9	4.6%
Difficoltà respiratoria	31	16.0%
Dolore addominale- Gastroenterica	2	1.0%
Febbre	105	54.1%
Tosse	25	12.9%
Vomito/diarrea	5	2.6%

Tabella 1. Diagnosi in entrata al Pronto Soccorso

Al momento di accesso al Pronto Soccorso il 92,3% della popolazione aveva sintomi simil-influenzali con una temperatura esterna mediana di 37.4 °C (IQR: 36.4-38.2).

I sintomi maggiormente presenti sono stati: febbre, tosse, rinorrea/rinite, vomito, dispnea. Mal di testa, congiuntivite, dolori muscolari, stanchezza, nausea e diarrea sono stati riscontrati con meno frequenza. Il 22,7 % dei pazienti aveva altri sintomi non specificati.

	Totale popolazione (n°)	0-3 anni (n°)	>3 anni (n°)	p-value
Totale	234	117	117	
Sintomi all'accesso in PS				
<i>Febbre</i>	158 (81.4%)	80 (41.2%)	78 (40.2%)	0.40
<i>Brividi</i>	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
<i>Tosse</i>	130 (67%)	75 (38.7%)	55 (28.4%)	0.025
<i>Congiuntivite</i>	5 (2.6%)	3 (1.5%)	2 (1.0%)	>0.99
<i>Rinorrea/rinite</i>	52 (26.8%)	36 (18.6%)	16 (8.2%)	0.004
<i>Mal di testa</i>	5 (2.6%)	0 (0.0%)	5 (2.6%)	0.024
<i>Dolori muscolari</i>	5 (2.6%)	1 (0.5%)	4 (2.1%)	0.20
<i>Stanchezza</i>	6 (3.1%)	3 (1.5%)	3 (1.5%)	>0.99
<i>Nausea</i>	1 (0.5%)	0 (0.00%)	1 (0.5%)	0.48
<i>Vomito</i>	50 (25.8%)	20 (10.3%)	30 (15.5%)	0.048
<i>Diarrea</i>	13 (6.7%)	8 (4.1%)	5 (2.6%)	0.48
<i>Dispnea</i>	48 (24.7%)	31 (16.0%)	17 (8.8%)	0.045
<i>Altro</i>	44 (22.7%)	23 (11.9%)	21 (10.8%)	0.97

Tabella 2. Sintomi all'accesso in pronto soccorso della popolazione totale, nel gruppo da 0 a 3 anni e nel gruppo >3 anni.

Dall'analisi della sintomatologia dei due gruppi si è osservato che i sintomi febbre, tosse, rinorrea/rinite, vomito e dispnea sono stati riscontrati con elevate frequenze. Un'elevata percentuale per entrambi i gruppi ha riportato altri sintomi non specificati (11,9% da 0 a 3 anni, 10,8% > 3 anni). I sintomi che hanno riportato differenze statisticamente significative tra i due gruppi sono stati: tosse, rinorrea/rinite, mal di testa, vomito, dispnea (vedi tabella 2).

4.2 Esami strumentali

Per 161 (83.0%) pazienti sono stati richiesti gli esami del sangue. Di tutti i parametri del sangue misurati sono stati utilizzati per l'analisi dello studio solo quei parametri utili nella valutazione

della malattia: proteina C reattiva (PCR), leucociti, granulociti neutrofili, granulociti eosinofili, granulociti basofili, linfociti, monociti.

Nella tabella 3 sono riportate le variabili raccolte per la popolazione totale e per i due gruppi da 0 a 3 anni e >3 anni, con i relativi p-value.

Variabili (mediana)	Popolazione totale	0-3 anni	> 3 anni	p- value
Proteina C reattiva	1.280 (0.307-4- 492)	1.130 (0.290- 3.350)	1.920 (0.395- 5.800)	0.11
Leucociti	10.200 (6.450- 13.968)	10.555 (7.105- 13.982)	9.735 (6.125- 13.705)	0.36
Granulociti neutrofili	59.400 (46.200- 75.300)	50.450 (42.025- 61.325)	72.750 (58.200- 83.400)	<0.001
Granulociti eosinofili	0.500 (0.200- 0.925)	0.500 (0.225- 1.325)	0.350 (0.100- 0.700)	0.014
Granulociti basofili	0.400 (0.200- 0.600)	0.400 (0.300- 0.600)	0.300 (0.200- 0.600)	0.055
Linfociti	25.950 (14.450- 38.350)	35.150 (24.675- 43.025)	17.350 (8.525- 26.000)	<0.001
Monociti	6.300 (4.200- 8.900)	7.400 (5.500- 10.575)	4.900 (3.425- 7.075)	<0.001

Tabella 3. Valori dei parametri del sangue raccolti.

Dall'analisi dei dati raccolti si è osservato che: 35 pazienti hanno eseguito il film array respiratorio, 64 la radiografia al torace e per 3 pazienti è stata richiesta una consulenza infettivologica.

131 pazienti sono stati ricoverati dei quali il 59.5% è stato trattato con antibiotici.

4.3 Risultati dei test

4.3.1 Accuratezza diagnostica del test ID NOW™ per il COVID-19

Nella tabella 8 è descritto il confronto tra il test ID NOW™ e la RT-PCR considerando l'intera popolazione.

		Test ID NOW™		Totale
		Positivo	Negativo	
RT-PCR	Positivo	7	3	10
	Negativo	2	178	180
	Presunto positivo	0	4	4
Totale		9	185	194

Tabella 8. Accuratezza diagnostica del test ID NOW™ per il COVID-19 sulla popolazione totale.

L'ID NOW ha rilevato 185 negativi (185/194) e 9 positivi (9/194) con una prevalenza del 5.2%.

Dall'analisi con la RT-PCR, lo strumento Standard™ M10 ha rilevato 180 test negativi (180/194), 10 positivi (10/194) e 4 presunti positivi (4/194).

I 4 casi presunti positivi sono risultati negativi all'ID NOW. I cicli soglia sono disponibili solo per 1 caso su 4: 35.67.

Dal confronto tra i due test si è osservato che lo strumento ID NOW™ ha rilevato 2 falsi positivi e 3 falsi negativi.

			Test ID NOW™		
			Positivo	Negativo	Totale
RT-PCR	0-3 anni	Positivo	4	1	5
		Negativo	2	92	94
		Presunto positivo	0	2	2
		Totale	6	95	101
	>3 anni	Positivo	3	2	5
		Negativo	0	86	86
		Presunto positivo	0	2	2
		Totale	3	90	93

Tabella 9. Accuratezza diagnostica del test ID NOW™ per il COVID-19 sui due gruppi da 0 a 3 anni e >3 anni.

Analizzando i due gruppi nel gruppo da 0 a 3 anni l'ID NOW™ ha identificato erroneamente 3 test (2 falsi positivi e 1 falso negativo), nel gruppo >3 ha identificato erroneamente 2 test (2 falsi negativi).

La sensibilità e la specificità dello strumento sono stati rispettivamente di 70.0% e 98.9%. Il valore predittivo positivo e il valore predittivo negativo sono rispettivamente di 77.8% e 98.4%.

I due geni del virus SARS-CoV-2 ORF1a ed E avevano un ciclo soglia mediano rispettivamente di 25.8 (IQR: 23.1-27.4) e 25.7 (IQR: 22.9- 32.6).

La concordanza misurata mediante Kappa di Cohen è di 0.589 – discreta ($p < 0.001$).

4.2.2 Accuratezza diagnostica del test ID NOW™ per Influenza A

Nella tabella 4 è descritto il confronto tra il test ID NOW™ e la RT-PCR considerando l'intera popolazione.

		Test ID NOW™		Totale
		Positivo	Negativo	
RT-PCR	Positivo	27	3	30
	Negativo	0	164	164
Totale		27	167	194

Tabella 4. Accuratezza diagnostica del test ID NOW™ per l'Influenza A sulla popolazione totale

Il test ID NOW™ ha rilevato 27 positivi (27/194) pazienti e 167 negativi (167/194) con una prevalenza del 15.5%.

Dall'analisi con la RT-PCR per l'influenza A sono risultati positivi 30 (30/194) pazienti e negativi 164 (164/194).

Confrontando i risultati dei due test si osserva che l'ID NOW ha rilevato correttamente 164 negativi, 27 veri positivi ed erroneamente 3 negativi.

Per i casi positivi i cicli soglia mediani per i geni A1 e A2 erano di 20.0 (IQR: 17.7-22.6) e 22.4 (IQR: 19.5-24.1).

			Test ID NOW™		Totale
			Positivo	Negativo	
RT-PCR	0-3 anni	Positivo	13	3	16
		Negativo	0	85	85
		Totale	13	88	101
	>3 anni	Positivo	14	0	14
		Negativo	0	79	79
Totale		14	79	93	

Tabella 5. Accuratezza diagnostica del test ID NOW™ per l'Influenza A sui due gruppi da 0 a 3 anni e >3 anni.

Andando a valutare i risultati nelle due classi di età si può osservare che tutti i test nei bambini di età >3 anni sono stati processati correttamente. I 3 casi risultati falsi negativi sono stati rilevati nel gruppo di età da 0 a 3 anni.

Lo strumento ID NOW™ ha una sensibilità e specificità rispettivamente del 90% (IC 95%: 73.5% - 97.9%) e del 100% (IC 95%: 97.8% - 100.0%). Il valore predittivo positivo è del 100.0% e il valore predittivo negativo è del 98.2%

La concordanza misurata mediante Kappa di Cohen è di 0.938 – ottima ($p < 0.001$).

Per i casi positivi i cicli soglia mediani per i geni A1 e A2 erano di 20.0 (IQR: 17.7-22.6) e 22.4 (IQR: 19.5-24.1).

4.3.3 Accuratezza diagnostica del test ID NOW™ per l'Influenza B

Nella tabella 6 è descritto il confronto tra il test ID NOW™ e la RT-PCR considerando l'intera popolazione.

		Test ID NOW™		
		Positivo	Negativo	Totale
RT-PCR	Positivo	27	0	27
	Negativo	1	166	167
Totale		28	166	194

Tabella 6. Accuratezza diagnostica del test ID NOW™ per l'Influenza B sulla popolazione totale.

L'ID NOW™ ha rilevato 28 positivi (28/194) e 166 negativi (166/194) con una prevalenza del 13.9%.

La Real time PCR ha rilevato 27 pazienti positivi (27/194) e 167 negativi (167/194).

Diversamente da quanto osservato per l'influenza A il test rapido molecolare ha identificato correttamente 116 negativi e 27 positivi ed erroneamente 1 falso positivo.

			Test ID NOW™		Totale
			Positivo	Negativo	
RT-PCR	0-3 anni	Positivo	3	0	3
		Negativo	0	98	98
		Totale	3	98	101
	>3 anni	Positivo	24	0	24
		Negativo	1	68	69
Totale		25	68	93	

Tabella 7. Accuratezza diagnostica del test ID NOW™ per l'Influenza B sui due gruppi da 0 a 3 anni e >3 anni.

Analizzando i risultati delle due classi di età tutti i 101 test del gruppo da 0 a 3 anni sono stati processati correttamente. 1 test falso positivo è stato rilevato nel gruppo > 3 anni (vedi tabella 7).

Lo strumento ID NOW™ ha rilevato l'influenza B con una sensibilità del 100.0% (IC 95%: 87.2% - 100.0%) e una specificità del 99.4% (IC 95%: 96.7% - 100.0%). Il valore predittivo positivo è di 96.4% mentre quello negativo è di 100.0%.

La concordanza misurata mediante Kappa di Cohen è di 0.979 – ottima ($p < 0.001$).

I cicli soglia mediani dei casi positivi erano di 18.6 (IQR: 16.7-21.7).

4.3 Descrizione dei casi discordanti

In questo paragrafo verranno descritti brevemente la sintomatologia e i cicli soglia dei pazienti risultati falsi negativi e falsi positivi nei test precedentemente esaminati.

- COVID-19

1° CASO FALSO POSITIVO

Il primo paziente risultato erroneamente positivo al test dell'ID NOW era un bambino di età <2 mesi che presentava tosse e dispnea. Il paziente era risultato positivo anche all'RSV.

2° CASO FALSO POSITIVO

Il secondo paziente aveva un'età < 2 mesi. Era giunto in PS con febbre. Il paziente presentava una co-infezione con l'Influenza A.

1° CASO FALSO NEGATIVO

Il bambino di 2 anni all'accesso aveva una diagnosi in entrata non specificata. Presentava febbre e rinorrea e co-infezione con RVS. I cicli soglia non sono disponibili.

2° CASO FALSO NEGATIVO

Il paziente di 16 anni aveva difficoltà respiratoria, febbre e dispnea. Era risultato positivo anche all'Influenza B. I cicli soglia non sono disponibili.

3° CASO FALSO NEGATIVO

Il paziente di 3 anni si è presentato al pronto soccorso con febbre alta, tosse e rinorrea. Presentava una co-infezione con Influenza A e RSV. I cicli soglia non sono disponibili.

- Influenza A

1° CASO FALSO NEGATIVO

Il primo paziente risultato erroneamente negativo all'ID NOW è un bambino di 2 anni giunto in pronto soccorso con diagnosi in entrata di tosse. Presentava febbre alta (38.10 °C) e convulsioni. I cicli soglia del campione erano molto alti (38.20).

2° CASO FALSO NEGATIVO

Il secondo paziente era un bambino di età <1 anno (7 mesi) giunto in pronto soccorso con febbre. I cicli soglia del campione erano bassi (14.60 e 16.30).

3° CASO FALSO NEGATIVO

Il terzo paziente era un bambino di 2 anni che all'accesso al pronto soccorso presentava febbre, tosse, rinorrea e otalgia. I cicli soglia per l'influenza A erano alti (37). Inoltre il paziente presentava co-infezione con COVID e RVS.

- Influenza B

1° CASO FALSO POSITIVO

Il paziente era un bambino di età > 3 anni che aveva diagnosi in entrata di vomito/diarrea. Non presentava altri sintomi simil-influenzali o co-infezioni con altri virus.

4.4 Virus respiratorio sinciziale (RVS) e co-infezioni

La cartuccia Xpert® Xpress Flu/RSV oltre ad identificare i geni dell'Influenza A e B, è in grado di rilevare, nel caso fossero presenti, anche i geni del Virus Respiratorio Sinciziale. Sono quindi stati raccolti anche i casi che risultavano positivi all'RVS: 62 pazienti su 194.

Inoltre sono state osservati dei casi di co-infezione rilevati dalla RT-PCR: 1 caso con COVID-19 e Influenza A, 2 casi con il COVID-19 e Influenza B, 2 casi con COVID-19, Influenza A e RVS.

Su 5 casi di co-infezione l>ID NOW™ ne ha rilevati solo 2.

5. Discussione

In questo studio i tamponi sono stati processati a secco direttamente sullo strumento ID NOW™ come raccomandato dal produttore in quanto l'eluizione nel liquido UTM potrebbe ridurre la carica virale; il produttore inoltre raccomanda di utilizzare tamponi nasofaringei per l'esecuzione del test. In questo caso, a differenza di quanto consigliato, è stato deciso di eseguire tamponi nasali affinché il prelievo non risultasse troppo fastidioso per i pazienti molto piccoli. Questa differenza potrebbe aver inficiato sulla sensibilità del test.

Valutando l'accuratezza diagnostica dello strumento per il COVID-19 si osserva che il test ha dimostrato un'elevata specificità (98.9%) ma una bassa sensibilità (70%). Questo risultato può essere spiegato considerando il numero elevato di falsi negativi in un contesto di bassa prevalenza del virus (5.2%). A causa della bassa prevalenza anche il valore predittivo positivo è risultato basso (77.2%).

Altri studi effettuati in precedenza sulla popolazione pediatrica hanno riportato una bassa prevalenza per il virus SARS-CoV-2: uno studio condotto in Polonia che ha coinvolto due ospedali pediatrici ha riportato che su 459 pazienti testati solo il 3,3% è risultato positivo a SARS-CoV-2 (*Kuchar et al., 2021*).

Un altro studio multicentrico svolto in Germania tra aprile e maggio 2020 ha incluso bambini da 1 a 10 anni di età. Su 2482 paziente testati solo lo 0.6% ha riportato positività per SARS-CoV-2 (*Tonshoff et al., 2021*).

Un altro punto importante è la valutazione dei casi discordanti negativi.

I dati sulla performance di ID NOW™ COVID-19 2.0 riportati sul manuale fornito dal produttore mostrano che la capacità di identificare SARS-CoV-2 da parte di ID NOW™ diminuisce con $Ct \geq 30$ e ≤ 32 e diminuisce ulteriormente a $Ct \geq 33$ (Abbott Diagnostic Scarborough, Inc.).

In uno studio di Fan et al. che ha valutato le performance diagnostiche di Abbott ID NOW™ COVID-19 in un pronto soccorso su 6773 test eseguiti, 175 sono risultati falsi negativi. Analizzando questi test tramite la RT-PCR è stato osservato che il 90% dei falsi negativi aveva un Ct mediano di 35 (*Fan et al., 2023*).

Anche Tu et al., ha osservato che i due risultati discordanti presenti nel suo studio avevano un Ct rispettivamente di 36.5 e 38.1 (*Tu et al., 2021*).

In generale la sensibilità diminuisce in presenza di tamponi con bassa carica virale (*Barnacle et al., 2021*).

Sulla base di quanto riportato dal produttore e dai risultati degli studi appena citati, possiamo dedurre che i casi discordanti rilevati dallo strumento ID NOW™ siano riconducibili a cicli soglia elevati e dunque ad una bassa carica virale. Tuttavia non disponendo dei cicli soglia dei campioni discordanti non possiamo affermare con certezza quanto appena detto.

Per quanto riguarda l'accuratezza diagnostica dello strumento molecolare rapido per l'Influenza A e B sono stati osservati elevati valori di sensibilità e specificità per entrambi i test: rispettivamente 90% e 100% per l'Influenza A e 100% e 99.4% per l'Influenza B.

La sensibilità e la specificità dell'Influenza A sono in linea con quelli dello studio di Kanwar et al.: rispettivamente 93.2% e >99%. Per l'Influenza B sono invece leggermente inferiori rispetto al nostro studio: 97%. Questa differenza potrebbe dipendere dal fatto che i campioni dello studio di Kanwar et al. sono stati diluiti su terreno di trasporto universale e congelati a -70°C prima di essere eseguiti su ID NOW™ (*Kanwar et al., 2020*).

Nel nostro studio tre test per l'Influenza A sono risultati falsi negativi. Due test su tre avevano un Ct \geq 37.

Allo stesso modo Farfour et al., nel suo studio, ha confrontato i campioni falsi negativi ottenuti all'ID NOW™ con la tecnica di riferimento RT-PCR e ha osservato che tutti i falsi negativi avevano un Ct >37 (*Farfour et al., 2020*).

È possibile quindi dedurre che il test non abbia rilevato il virus a causa della bassa carica virale.

L'unico caso discordante negativo con Ct basso può essere spiegato tenendo presente che il bambino testato aveva pochi mesi. È possibile quindi che l'operatore abbia riscontrato difficoltà nella raccolta del campione o abbia raccolto un campione insufficiente.

Inoltre lo strumento ha riportato sia per l'Influenza A sia per l'Influenza B un elevato valore predittivo negativo, ciò suggerisce che lo strumento potrebbe essere utilizzato nei test di screening per l'Influenza.

I casi discordanti positivi possono essere valutati considerando il contesto critico come quello di un pronto soccorso pediatrico ad alta prevalenza. Nonostante gli operatori siano stati formati per eseguire il test, si deduce una possibile contaminazione del campione.

6. Conclusioni

In conclusione si può dire che lo strumento ID NOW™ COVID-19 2.0, confrontato con la metodica di riferimento RT-PCR, ha mostrato un'ottima prestazione diagnostica in un contesto di pronto soccorso pediatrico.

Nonostante la metodica di riferimento rimanga la tecnica più sensibile in grado di rilevare correttamente tutti i pazienti malati, si conferma il fatto che i casi positivi non rilevati dallo strumento hanno una carica virale bassa e cicli soglia significativamente più alti rispetto a quelli che risultano positivi.

È possibile affermare che il test rapido molecolare ha soddisfatto i criteri 'ASSURED' elaborati dall'OMS che caratterizzano un POCT ideale; lo strumento è stato inoltre interfacciato con il Laboratorio della S.C. Microbiologia e Virologia.

Anche il questionario svolto dal personale sanitario coinvolto nello studio ha valutato positivamente l'introduzione del nuovo test ed ha riportato un elevato livello di soddisfazione.

Lo strumento è stato quindi implementato definitivamente nel triage del pronto soccorso.

Essendo lo strumento ID NOW™ un test al punto di cura, è importante che prima del suo utilizzo si tenga conto di alcune variabili come l'ambito di applicazione dello strumento, la popolazione coinvolta, possibili variazioni nella raccolta e nel processamento del campione e la tipologia del tampone utilizzato.

Per le ottime potenzialità di questi test, è fondamentale, continuare a svilupparne e implementarne un numero sempre maggiore al fine di migliorare ed ottimizzare le strategie diagnostiche delle malattie infettive.

7. Bibliografia

1. Abualenain J, Almarzouki A, Saimaldaher R, Zocchi MS, Pines JM. The Effect of Point-of-Care Testing at Triage: An Observational Study in a Teaching Hospital in Saudi Arabia. *West J Emerg Med.* 2018 Sep;19(5):884-888
2. Ahmad A, Rustam F, Saad E, Siddique MA, Lee E, Mansilla AO, Díez IT, Ashraf I. Analyzing preventive precautions to limit spread of COVID-19. *PLoS One.* 2022 Aug 24;17(8):e0272350.
3. Almirall J, Serra-Prat M, Bolívar I, Balasso V. Risk Factors for Community-Acquired Pneumonia in Adults: A Systematic Review of Observational Studies. *Respiration.* 2017;94(3):299-311.
4. Barnacle JR, Houston H, Baltas I, Takata J, Kavallieros K, Vaughan N, Amin AK, Aali SA, Moore K, Milner P, Gupta Wright A, John L. Diagnostic accuracy of the Abbott ID NOW SARS-CoV-2 rapid test for the triage of acute medical admissions. *J Hosp Infect.* 2022 May;123:92-99.
5. BMJ Best Practise. Community-acquired pneumonia (non COVID-19). -2024
6. Borczuk AC, Yantiss RK. The pathogenesis of coronavirus-19 disease. *J Biomed Sci.* 2022 Oct 26;29(1):87.
7. Boza Costagliola ML. Community-Acquired Pneumonia. *Pediatric Respiratory Diseases.* 2020 Feb 1:299–307.
8. Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C, Kaplan SL, Mace SE, McCracken GH Jr, Moore MR, St Peter SD, Stockwell JA, Swanson JT; Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2011 Oct;53(7):e25-76.
9. Calderaro A, Buttrini M, Farina B, Montecchini S, De Conto F, Chezzi C. Respiratory Tract Infections and Laboratory Diagnostic Methods: A Review with A Focus on Syndromic Panel-Based Assays. *Microorganisms.* 2022; 10 (9):1856.

10. Cao L, Ji Z, Zhang P, Wang J. Epidemiology and mortality predictors for severe childhood community-acquired pneumonia in ICUs: A retrospective observational study. *Front Pediatr.* 2023 Mar 23;11:1031423.
11. Centers for Disease Control and Prevention. *Test Complexities.* 2018
12. da Silva SJR, do Nascimento JCF, Germano Mendes RP, Guarines KM, Targino Alves da Silva C, da Silva PG, de Magalhães JJF, Vigar JRJ, Silva-Júnior A, Kohl A, Pardee K, Pena L. Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned. *ACS Infect Dis.* 2022 Sep 9;8(9):1758-1814.
13. Delibera della Giunta regionale del 28 febbraio 2023, n. 265 “Dispositivi Point of Care Testing (PoCT). Indicazioni regionali in merito all’organizzazione, all’utilizzo e all’accesso in merito SSN”.
14. Durrington HJ, Summers C. Recent changes in the management of community acquired pneumonia in adults. *BMJ.* 2008 Jun 21;336(7658):1429-33.
15. Eichberg J, Maiworm E, Oberpaul M, Czudai-Matwich V, Lüddecke T, Vilcinskas A, Hards K. Antiviral Potential of Natural Resources against Influenza Virus Infections. *Viruses.* 2022; 14(11):2452.
16. Fan SL. Application of Abbott ID NOW in the emergency department for SARS-CoV-2 detection: A medical center's perspective. *Clin Biochem.* 2023 Jul;117:30-33.
17. Farfour E, Roux A, Ballester M, Gagneur L, Renaux C, Jolly E, Vasse M. Improved performances of the second generation of the ID NOW influenza A&B 2® and comparison with the GeneXpert®. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020 Sep;39(9):1681-1686.
18. Farmer S, Razin V, Peagler AF, Strickler S, Fain WB, Damhorst GL, Kempker RR, Pollock NR, Brand O, Seitter B, Heilman SS, Nehl EJ, Levy JM, Gottfried DS, Martin GS, Greenleaf M, Ku DN, Waggoner JJ, Iffrig E, Mannino RG, F Wang Y, Ortlund E, Sullivan J, Rebolledo PA, Clavería V, Roback JD, Benoit M, Stone C, Esper A, Frank F, Lam WA. Don't forget about human factors: Lessons learned from COVID-19 point-of-care testing. *Cell Rep Methods.* 2022 May 23;2(5):100222.
19. Food and Drug Administration. *In Vitro Diagnostics EUAs.* - 2023.

20. Food and Drug Administration. Overview of IVD Regulation. 2021
21. Gaitonde DY, Moore FC, Morgan MK. Influenza: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2019 Dec 15;100(12):751-758.
22. Gavina K, Franco LC, Khan H, Lavik JP, Relich RF. Molecular point-of-care devices for the diagnosis of infectious diseases in resource-limited settings - A review of the current landscape, technical challenges, and clinical impact. *J Clin Virol*. 2023 Dec;169:105613.
23. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018 Nov 10;392(10159):1736-1788.
24. Gubala V, Harris LF, Ricco AJ, Tan MX, Williams DE. Point of care diagnostics: status and future. *Anal Chem*. 2012 Jan 17;84(2):487-515.
25. Hansen GT. Point-of-Care Testing in Microbiology: A Mechanism for Improving Patient Outcomes. *Clinical Chemistry*. 2020; 66 (1):124–137.
26. Hernandez Acosta RA, Esquer Garrigos Z, Marcelin JR, Vijayvargiya P. COVID-19 Pathogenesis and Clinical Manifestation. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2022; 36 (2):231-249.
27. Hillary VE, Ceasar SA. An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines. *Heliyon*. 2023 Mar;9(3):e13952.
28. Hocking L, George J, Broberg EK, Struelens MJ, Leitmeyer KC, Deshpande A, Parkinson S, Francombe J, Morley KI, de Carvalho Gomes H. Point of Care Testing for Infectious Disease in Europe: A Scoping Review and Survey Study. *Front Public Health*. 2021 Oct 20; 9:722943.
29. Iliescu FS, Ionescu AM, Gogianu L, Simion M, Dediu V, Chifiriuc MC, Pircalabioru GG, Iliescu C. Point-of-Care Testing-The Key in the Battle against SARS-CoV-2 Pandemic. *Micromachines (Basel)*. 2021 Nov 27;12(12):1464.
30. Istituto Superiore di Sanità. Cosa sono i coronavirus. 2020
31. Istituto Superiore di Sanità. I vaccini anti-COVID-19 – 2024

32. Istituto Superiore di Sanità. Piano strategico nazionale di vaccinazione COVID-19. – 2024.
33. Istituto Superiore di Sanità. Sistema di sorveglianza integrata COVID-19. - 2022
34. Istituto Superiore di Sanità. Sviluppo, valutazione e approvazione dei vaccini contro COVID-19. – 2024.
35. Istituto superiore di Sanità. Tutto sulla pandemia da SARS-CoV-2
36. Javanian M, Barary M, Ghebrehewet S, Koppolu V, Vasigala V, Ebrahimpour S. A brief review of influenza virus infection. *J Med Virol.* 2021 Aug;93(8):4638-4646.
37. John KJ, Nayar J, Mishra AK, Selvaraj V, Khan MS, Lal A. In-hospital clinical complications of COVID-19: a brief overview. *Future Virology* 2021; 16 (11): 717-723.
38. Kanwar N, Michael J, Doran K, Montgomery E, Selvarangan R. Comparison of the ID Now Influenza A & B 2, Cobas Influenza A/B, and Xpert Xpress Flu Point-of-Care Nucleic Acid Amplification Tests for Influenza A/B Virus Detection in Children. *J Clin Microbiol.* 2020 Feb 24;58(3):e01611-19.
39. Kassaw A, Kerebih G, Zeleke S, Chanie ES, Dessalegn N, Bante B, Teshome AA, Chekole B, Gelaw B, Bayih WA, Tesfaw A, Feleke DG, Kefale D, Azmeraw M, Chanie A, Awoke G, Moges N. Survival status and predictors of mortality from severe community-acquired pneumonia among under-five children admitted at Debre Tabor comprehensive specialized hospital: a prospective cohort study. *Front Pediatr.* 2023 Jun 5;11:1141366.
40. Kordzadeh-Kermani E, Khalili H, Karimzadeh I. Pathogenesis, clinical manifestations and complications of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Future Microbiol.* 2020 Sep;15:1287-1305.
41. Kuchar E, Załęski A, Wronowski M, Krankowska D, Podsiadły E, Brodaczewska K, Lewicka A, Lewicki S, Kieda C, Horban A, Kloc M, Kubiak JZ. Children were less frequently infected with SARS-CoV-2 than adults during 2020 COVID-19 pandemic in Warsaw, Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021 Mar;40(3):541-547

42. Kumar S, Nehra M, Khurana S, Dilbaghi N, Kumar V, Kaushik A, Kim KH. Aspects of Point-of-Care Diagnostics for Personalized Health Wellness. *Int J Nanomedicine*. 2021; 16: 383-402.
43. Larkins MC, Thombare A. Point-of-Care Testing. 2023 May 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan.
44. Larsson A, Greig-Pylypczuk R, Huisman A. The state of point-of-care testing: a European perspective. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2015 Mar;120 (1):1-10
45. Li Cz. Special Topic: Point-of-Care Testing (POCT) and In Vitro Diagnostics (IVDs). *J Anal Test*. 2019; 3:1–2.
46. Li R, Li J, Zhou X. Lung microbiome: new insights into the pathogenesis of respiratory diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Jan 17;9(1):19.
47. Lim WS, Baudouin SV, George RC, Hill AT, Jamieson C, Le Jeune I, Macfarlane JT, Read RC, Roberts HJ, Levy ML, Wani M, Woodhead MA; Pneumonia Guidelines Committee of the BTS Standards of Care Committee. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax*. 2009 Oct;64 Suppl 3:iii1-55.
48. Lim WS. Pneumonia—Overview. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. 2022:185–97.
49. Limper AH. Overview of Pneumonia. *Goldman's Cecil Medicine*. 2012:587–96.
50. Manmana Y, Kubo T, Otsuka K. Recent developments of point-of-care (POC) testing platform for biomolecules, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2021; 135: 116-160.
51. Mehta OP, Bhandari P, Raut A, Kacimi SEO, Huy NT. Coronavirus Disease (COVID-19): Comprehensive Review of Clinical Presentation. *Front Public Health*. 2021; 15 (8):582932.
52. Metlay JP, Waterer GW, Long AC, Anzueto A, Brozek J, Crothers K, Cooley LA, Dean NC, Fine MJ, Flanders SA, Griffin MR, Metersky ML, Musher DM, Restrepo MI, Whitney CG. Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society

- and Infectious Diseases Society of America. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Oct 1;200(7):e45-e67.
53. Meyer Sauter PM. Childhood community-acquired pneumonia. *Eur J Pediatr*. 2023 Dec 19.
54. Narayanan D, Parimon T. Current Therapeutics for COVID-19, What We Know about the Molecular Mechanism and Efficacy of Treatments for This Novel Virus. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 12;23(14):7702
55. Naseri M, Ziora ZM, Simon GP, Batchelor W. ASSURED-compliant point-of-care diagnostics for the detection of human viral infections. *Rev Med Virol*. 2022; 32(2):e2263.
56. Niknam Z, Jafari A, Golchin A, Danesh Pouya F, Nemati M, Rezaei-Tavirani M, Rasmi Y. Potential therapeutic options for COVID-19: an update on current evidence. *Eur J Med Res*. 2022 Jan 13;27(1):6.
57. Nishat S, Jafry AT, Martinez AW, Awan FA. Paper-based microfluidics: Simplified fabrication and assay methods. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2021; 336:129681.
58. Nuwarda RF, Alharbi AA, Kayser V. An Overview of Influenza Viruses and Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2021 Sep 17;9(9):1032.
59. Ochani RK, Asad A, Yasmin F, Shaikh S, Khalid H, Batra S, Sohail MR, Mahmood SF, Rajkumar Ochani, Arshad MH, Kumar A, Surani S. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. *Le Infezioni in Medicina*. 2021; 1:20-36.
60. Olanrewaju A, Soremekun, Elizabeth M, Datner, Simon Banh, Lance B. Becker, Jesse M. Pines, Utility of point-of-care testing in ED triage. *The American Journal of Emergency Medicine*. 2013; 31 (2): 291-296.
61. Oliver P, Fernandez-Calle P, Buno A. POCT Accreditation ISO 15189 and ISO 22870: Making the Point. *EJIFCC*. 2021; 32 (2):131-139.
62. Pal M, Berhanu G, Desalegn C, Kandi V. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update. *Cureus*. 2020 Mar 26;12(3): e7423

63. Park HD. Current Status of Clinical Application of Point-of-Care Testing. *Arch Pathol Lab Med.* 2021 Feb 1;145(2):168-175.
64. Perin J, Mulick A, Yeung D, Villavicencio F, Lopez G, Strong KL, Prieto-Merino D, Cousens S, Black RE, Liu L. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-19: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet Child Adolesc Health.* 2022 Feb;6(2):106-115.
65. Qian C, Wang R, Wu H, Ji F, Wu J. Nicking enzyme-assisted amplification (NEAA) technology and its applications: A review. *Analytica Chimica Acta.* 2019; 1050:1-15.
66. Qin Q, Shen KL. Community-acquired Pneumonia and its Complications. *Indian J Pediatr.* 2015 Aug;82(8):745-51.
67. Ramirez JA, Wiemken TL, Peyrani P, Arnold FW, Kelley R, Mattingly WA, Nakamatsu R, Pena S, Guinn BE, Furmanek SP, Persaud AK, Raghuram A, Fernandez F, Beavin L, Bosson R, Fernandez-Botran R, Cavallazzi R, Bordon J, Valdivieso C, Schulte J, Carrico RM; University of Louisville Pneumonia Study Group. Adults Hospitalized With Pneumonia in the United States: Incidence, Epidemiology, and Mortality. *Clin Infect Dis.* 2017 Nov 13;65(11):1806-1812.
68. Raveendran AV, Jayadevan R, Sashidharan S. Long COVID: An overview. *Diabetes Metab Syndr.* 2021; 15 (3):869-875.
69. Ritzhaupt A, Hayes I, Ehmann F. Implementing the EU in vitro diagnostic regulation - a European regulatory perspective on companion diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020 Jun;20(6):565-567.
70. Rivero-Calle I, Pardo-Seco J, Aldaz P, Vargas DA, Mascarós E, Redondo E, Díaz-Maroto JL, Linares-Rufo M, Fierro-Alacio MJ, Gil A, Molina J, Ocaña D, Martín-Torres F; NEUMOEXPERTOS group. Incidence and risk factor prevalence of community-acquired pneumonia in adults in primary care in Spain (NEUMO-ES-RISK project). *BMC Infect Dis.* 2016 Nov 7;16(1):645.
71. Shoar S, Musher DM. Etiology of community-acquired pneumonia in adults: a systematic review. *Pneumonia (Nathan).* 2020 Oct 5;12:11.
72. Shrestha N, Shad MY, Ulvi O, Khan MH, Karamelic-Muratovic A, Nguyen UDT, Baghbanzadeh M, Wardrup R, Aghamohammadi N, Cervantes D, Nahiduzzaman KM,

- Zaki RA, Haque U. The impact of COVID-19 on globalization. *One Health*. 2020 Dec 20;11:100180.
73. Simoes EAF, Cherian T, Chow J, et al. Acute Respiratory Infections in Children. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, et al., editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd edition. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2006. Chapter 25.
74. Singh S, Pandey R, Tomar S, Varshney R, Sharma D, Gangenahalli G. A brief molecular insight of COVID-19: epidemiology, clinical manifestation, molecular mechanism, cellular tropism and immuno-pathogenesis. *Mol Cell Biochem*. 2021 Nov;476(11):3987-4002.
75. Srivastava P, Mishra KA, Roy KA. Predisposing Factors of Community Acquired Pneumonia in Under-Five Children. *Lung Dis. Treat*. 2015. 1:1.
76. St John A, Price CP. Existing and Emerging Technologies for Point-of-Care Testing. *Clin Biochem Rev*. 2014 Aug; 35 (3):155-67.
77. Tönshoff B, Müller B, Elling R, Renk H, Meissner P, Hengel H, Garbade SF, Kieser M, Jeltsch K, Grulich-Henn J, Euler J, Stich M, Chobanyan-Jürgens K, Zernickel M, Janda A, Wölfle L, Stamminger T, Iftner T, Ganzenmueller T, Schmitt C, Görne T, Laketa V, Olberg S, Plaszczyca A, Cortese M, Bartenschlager R, Pape C, Remme R, Huzly D, Panning M, Weigang S, Giese S, Ciminski K, Ankerhold J, Kochs G, Schwemmler M, Handgretinger R, Niemeyer CM, Engel C, Kern WV, Hoffmann GF, Franz AR, Henneke P, Debatin KM, Kräusslich HG. Prevalence of SARS-CoV-2 Infection in Children and Their Parents in Southwest Germany. *JAMA Pediatr*. 2021 Jun 1;175(6):586-593.
78. Torres A, Cillóniz C, Blasi F, Chalmers JD, Gaillat J, Dartois N, Schmitt HJ, Welte T. Burden of pneumococcal community-acquired pneumonia in adults across Europe: A literature review. *Respir Med*. 2018 Apr;137:6-13.
79. Torres A, Cilloniz C, Niederman MS, Menéndez R, Chalmers JD, Wunderink RG, van der Poll T. Pneumonia. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Apr 8;7(1):25.

80. Tsoumani E, Carter JA, Salomonsson S, Stephens JM, Bencina G. Clinical, economic, and humanistic burden of community acquired pneumonia in Europe: a systematic literature review. *Expert Rev Vaccines*. 2023 Jan-Dec;22(1):876-884.
81. Tu YP, Iqbal J, O'Leary T. Sensitivity of ID NOW and RT-PCR for detection of SARS-CoV-2 in an ambulatory population. *Elife*. 2021 Apr 20;10:e65726.
82. Uyeki TM, Hui DS, Zambon M, Wentworth DE, Monto AS. Influenza. *Lancet*. 2022 Aug 27;400(10353):693-706.
83. Venner AA, Beach LA, Shea JL, Knauer MJ, Huang Y, Fung AWS, Dalton J, Provencal M, Shaw JLV. Quality assurance practices for point of care testing programs: Recommendations by the Canadian society of clinical chemists point of care testing interest group. *Clinical Biochemistry*. 2021; 88: 11-17.
84. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Mar;19(3):155-170.
85. Wang C, Liu M, Wang Z, Li S, Deng Y, He N. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. *Nano Today*. 2021 Apr; 37:101092.
86. World Health Organization. *Pneumonia in children*. - 2022.
87. World Health Organization. *Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic*. - 2023
88. Yang K, Wen G, Wang J, Zhou S, Da W, Meng Y, Xue Y, Tao L. Complication and Sequelae of COVID-19: What Should We Pay Attention to in the Post-Epidemic Era. *Front Immunol*. 2021 Sep 3;12:711741.
89. Yu CY, Chan KG, Yean CY, Ang GY. Nucleic Acid-Based Diagnostic Tests for the Detection SARS-CoV-2: An Update. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Jan 1;11(1):53.
90. Yuan Y, Jiao B, Qu L, Yang D, Liu R. The development of COVID-19 treatment. *Front Immunol*. 2023 Jan 26;14:1125246.
91. Zhang XB, He W, Gui YH, Lu Q, Yin Y, Zhang JH, Dong XY, Wang YW, Ye YZ, Xu H, Wang JY, Shen B, Gu DP, Wang LB, Wang Y. Current Mycoplasma

pneumoniae epidemic among children in Shanghai: unusual pneumonia caused by usual pathogen. *World J Pediatr.* 2024 Jan;20(1):5-10.

92. Zhu H, Zhang H, Ni S, Korabečná M, Yobas L, Neuzil P. The vision of point-of-care PCR tests for the COVID-19 pandemic and beyond. *Trends Analyt Chem.* 2020 Sep; 130:115984.
93. Zhu Y, Sharma L, Chang D. Pathophysiology and clinical management of coronavirus disease (COVID-19): a mini-review. *Front Immunol.* 2023 Aug 14;14:1116131.

8. Sitografia

1. <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c>.
2. <https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/point-of-care-diagnostic.asp#>.
3. <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-community-acquired-pneumonia-in-adults#disclaimerContent>.
4. <https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-201>.

9. Ringraziamenti

Vorrei dedicare questa tesi alle persone che mi hanno sostenuto fino alla fine di questo percorso.

Ringrazio il Dottor Andrea Rocchetti che mi ha dato la possibilità di svolgere il tirocinio presso l'Ospedale di Alessandria e di seguire lo studio clinico che è diventato l'argomento della mia tesi. Grazie a questa esperienza infatti ho potuto ampliare le mie conoscenze in ambito microbiologico e ho potuto confrontarmi con diversi ambiti ospedalieri e diverse figure professionali.

Ringrazio il mio relatore, il professor Elia Ranzato che ha accettato di seguirmi nel percorso di tesi ed è sempre stato molto disponibile nel chiarire ogni mio dubbio.

Ringrazio Manuel che c'è sempre stato in ogni momento e non ha mai smesso di credere in me.

Ringrazio mia sorella Valentina che più di tutti ha saputo capirmi e confortarmi nei momenti difficili.

Ringrazio i miei genitori che mi hanno permesso di arrivare fino a qui e di diventare la persona che sono oggi.