

## Esami di laboratorio per SARS-CoV-2 nella gestione in ambito occupazionale della pandemia COVID 19

### MATERIALE SUPPLEMENTARE

Guo e coll (4) hanno condotto uno studio volto a indagare il ruolo della risposta umorale nella SARS-CoV-2 esaminando 208 soggetti di due distinte coorti. La prima di 101 soggetti con sintomatologia COVID *like* sottoposta sia a tampone su saliva che a prelievo ematico: per 43 soggetti la diagnosi di COVID-19 è stata fatta mediante tecnica *deep sequencing* (tecnica diagnostica rapida o con PCR quantitativa o real-time; 58 soggetti sono invece risultati negativi per infezione da SARS-CoV-2 utilizzando entrambe le tecniche diagnostiche. Nella prima coorte sono stati effettuati 169 prelievi ematici (100 nei pazienti con diagnosi di COVID-19 e 69 in pazienti con sospetta infezione da SARS-CoV-2). La seconda coorte ha incluso 39 pazienti ospedalizzati con diagnosi di COVID-19 per i quali è stata prevista la raccolta di un campione ematico tra la 1° e la 39° giornata dall'esordio della sintomatologia compatibile con COVID-19. Sono stati anche raccolti in modo retrospettivo 150 campioni di plasma risalenti all'anno 2018 e 2019 da soggetti adulti dello stesso distretto di Whuan, con diagnosi d'infezione acuta del tratto respiratorio inferiore.

Metodo di analisi: le proteine purificate ricombinanti (rNPs) del Coronavirus sono state ottenute da plasma umano e analizzate con tecnica Western blot al fine di valutare la cross reattività delle rNPs con gli anticorpi utilizzati. È stata utilizzata la tecnica ELISA indiretta per la rilevazione di anticorpi IgM, IgA e IgG contro SARS-CoV-2 utilizzando come antigeni di rivestimento. Si sono ottenuti i seguenti risultati:

- si è osservata una cross reattività tra le rNPs per SARS-CoV e SARS-CoV-2 (il 90,5% delle sequenze amminoacidiche ha mostrato omologia con SARS-CoV).
- il rapporto osservato di IgM positività per SARS-CoV-2 è del 75,6% (62/82) nei casi COVID-19 confermati e del 93,1% (54/58) nei casi sospetti d'infezione da SARS-CoV-2.
- la PCR è risultata positiva nel 90% dei soggetti a distanza di 1-3 giorni dall'insorgenza dei sintomi e nell'80% (IC 95%, 57,1-95,7) dei soggetti al sesto giorno dall'insorgenza dei sintomi e in meno del 50% (IC 95 % 23,7-59,5) dei soggetti dopo 14 giorni dall'insorgenza dei sintomi.

Complessivamente, il tasso di rilevazione (rapporto soggetti positivi al test / soggetti COVID-19 ndr) per qPCR

era superiore al test ELISA IgM entro i primi 5,5 giorni dall'insorgenza dei sintomi, mentre l'efficienza di rilevazione (*detection efficiency*) con ELISA IgM è stata risultata superiore a quella del metodo PCR dopo i primi 5,5 giorni dall'insorgenza dei sintomi. Il tasso di rilevazione (inteso come positività in alternativa rispettivamente al test molecolare o al test immunoenzimatico) è risultato del 51,9% per un singolo test PCR e del 98,6% utilizzando la strategia combinata (esecuzione ELISA IgM in soggetti con PCR negativa).

Amanat e coll (1) riportano come i betacoronavirus SARS-CoV-2 esprimano una glicoproteina di 140 KDa denominata "spike" o "S" che è responsabile del legame con le cellule dell'ospite anche grazie alle interazioni con il recettore dell'enzima convertente l'angiotensina (ACE di tipo II). La proteina S ha caratteristiche di forte immunogenicità, ovvero è in grado di elicitare una risposta immunologica da parte dell'antigene. Gli Autori riportano come i soggetti infettati da coronavirus possano sviluppare anticorpi neutralizzanti che potrebbero conferire una protezione per un periodo non definito di tempo. Gli Autori riportano come abbiano generato in vitro due varianti della proteina "S": una corrispondente alla versione "completa" della proteina e una caratterizzata dalla sola presenza di un dominio denominato RBD (*receptor-binding domain*). Entrambe le sequenze sono state ottenute dal sequenziamento del genoma del virus "Wuhan-Hu-1", conosciuto e reso disponibile in termini di sequenza genomica dal 10 gennaio 2020. Gli Autori hanno analizzato 59 campioni di siero umano con storia di infezioni virali quali Hantavirus, virus Dengue, coronavirus NL639, confermate in laboratorio. I campioni di siero sono stati utilizzati con metodologia ELISA per testare la reattività "di fondo" nei confronti di SARS-CoV-2 nella popolazione generale degli Stati Uniti d'America quando il SARS-CoV-2 non aveva circolazione locale. I campioni di siero sono stati raccolti ai giorni 2, 4, 6, e 20 in seguito alla comparsa di sintomatologia compatibile con COVID-19. Quattro campioni di plasma / siero da 3 soggetti COVID19 sono stati utilizzati per determinare la risposta immunologica degli individui con infezione da SARS-CoV-2 all'RBD e alla proteina "S" completa.

Il metodo ELISA prevedeva diluizioni progressive, al fine di quantificare la risposta immunologica quantitativa nei confronti dei due domini "S" e RBD. La risposta anticorpa-

le dei pazienti COVID-19 è stata maggiore nei confronti della proteina *spike* "S" di dimensioni maggiori. Gli Autori riportano come non siano state osservate (o siano trascurabili) cross reazioni con altri coronavirus umani pure reattivi con i recettori ACE-2. Quindi, gli anticorpi mostrano una reattività soddisfacente sia nei confronti della proteina "S" in toto sia nei confronti del dominio RDB (che rappresenta il principale bersaglio per gli anticorpi neutralizzanti per la famiglia dei coronavirus), con una risposta anticorpale caratterizzata da IgG3 maggiore rispetto a quella della sottoclasse IgG1, a differenza di ciò che avviene in risposta ai virus influenzali stagionali. Vi è differenza tra le due sottoclassi anticorpali per l'emivita (circa 7 giorni per la classe 3 e circa 23 giorni per la classe 1): questa osservazione potrebbe avere importanti implicazioni in termini di limiti temporali di sicuro protezione per SARS-CoV-2. Gli Autori (in una versione del lavoro "not peer-reviewed") sottolineano come la velocità della metodica utilizzata e la riproducibilità della stessa possano essere punti di forza per l'utilizzo di questa tecnica in prima battuta negli operatori sanitari.

Liu e coll (6) nella parte introduttiva del loro lavoro riportano come i CoV, contengano quattro principali proteine strutturali denominate: *spike* (S), di membrana (M), *envelope* (E) e nucleocapside (N). La proteina S è necessaria per il legame con i recettori cellulari dell'ospite, le proteine E e M sono coinvolte nelle fasi di assemblaggio del virus, mentre la proteina N ha ruolo di confezionamento del genoma virale incapsulato nel virione agendo anche da silenziatore dell'RNA virale con effetto replicativo per i coronavirus. Viene sottolineato come la proteina N abbia un'elevata immunogenicità e come sia sovra-espressa in corso d'infezione da coronavirus. Nello studio hanno utilizzato la tecnica ELISA saggiata su un frammento ricombinante di SARS-CoV-2 della proteina N, esaminando 238 soggetti confermati COVID-19 o sospetti d'infezione da SARS-CoV-2. Di questi per 53 soggetti avevano era stata confermata una diagnosi di COVID-19 tramite tempone faringeo (analizzato con RT-PCR), mentre 85 soggetti sono stati definiti come fortemente sospetti in base a criteri clinici. Sono stati inclusi anche 120 pazienti come gruppo di controllo.

L'età media dei soggetti inclusi nello studio era di 55 anni (IQR, 38,3-65), 38 (58,0%) dei soggetti erano di genere maschile. Tra i soggetti inclusi nello studio, 63 erano ipertesi (26,5%), 25 (10,5%) erano diabetici e 24 (10,1%) avevano disturbi cardiovascolari non meglio specificati. I sintomi più comuni all'esordio della malattia sono stati riportati essere: febbre 206 (86,6%), tosse secca 128 (53,8%), astenia n 78 (32,8%), addominalgie 1 (0,4%), emesi 3 (1,3%), e vertigini 4 (1,7%). Leucocitopenia era presente in 41 (17,2%) dei soggetti, e leucocitosi in n=21 (8,8%); in 125 (52,5%) linfocitopenia, mentre in nessun soggetto è stata riscontrata linfocitosi; neutropenia in 28 soggetti (11,8%), mentre in 32

(13,4%) i è stata riscontrata neutrofilia; 235 pazienti (98,7%) hanno avuto riscontro di opacità a vetro smerigliato e / o ombreggiatura irregolare all'esecuzione della tomografia computerizzata. Gli anticorpi (classe IgG e/o IgM) nella coorte selezionata sono risultati dosabili in 194 soggetti (81,5%) a fronte dei 153 (64,3%) soggetti COVID-19 positivi con RT-PCR. Non sono state riscontrate differenze significative in relazione alla rilevazione di IgM e/o IgG tra i soggetti con diagnosi di COVID-19 (83,0%, 127/153) ed i soggetti con sospetta infezione da SARS-CoV-2 (78,8%, 67/85). Gli autori concludono come la tecnica RT-PCR eseguita su campione biologico sia più efficace per la diagnosi di COVID-19 nei primi 11 giorni successivi all'insorgenza dei sintomi, per poi diminuire, in seguito alla comparsa della risposta anticorpale. Suggestiscono inoltre di utilizzare la tecnica ELISA per la rilevazione degli anticorpi di classe IgM e/o IgG in pazienti che presentano sintomi da più di 10 giorni. Nello studio viene riportato come il 50% dei casi non diagnosticati con RT-PCR ma diagnosticati con criteri clinici abbia presentato concentrazioni rilevabili di IgM e/o IgG, ipotizzando quindi una strategia combinata ELISA e RT-PCR anche nelle prime fasi dell'infezione da SARS-CoV-2.

Wang To e coll (8) hanno selezionato una coorte di soggetti COVID-19 positivi in due nosocomi di Hong Kong. Sono state eseguite analisi su campioni salivari orofaringei, ematici, urinari, e su campioni mucosali rettali. La carica virale è stata indagata tramite tecnica RT-quantitative PCR. I titoli anticorpali nei confronti di SARS-CoV-2 sono stati analizzati tramite immunotest enzimatico (EIA) nei confronti della nucleoproteina interna (NP) e, dello specifico dominio della nucleoproteina RDB. La coorte selezionata include 30 soggetti arruolati tra il 22 gennaio e il 12 febbraio 2020. È stato osservato come la carica virale abbia raggiunto livelli massimali nella prima settimana successiva all'insorgenza dei sintomi compatibili con COVID-19, (fino 25 gg in 1 soggetto) per poi decrescere; l'età avanzata è stata riferita essere correlata ad una maggiore carica virale (correlazione di Spearman  $r = 0,48$ , 95% CI 0,074-0,75;  $p = 0,020$ ). In 16 soggetti è stata effettuata un'analisi sul siero a 14 giorni dalla comparsa del quadro sintomatologico. Sono stati osservate IgG anti-NP in 15 soggetti (94%); IgM anti-NP in 14 soggetti (88%); sono state osservate IgG anti-RBD in n = 16 soggetti (100%) e IgM anti-RBD in n=15 soggetti (94%). Non sono state osservate mutazioni del genoma virale. Gli Autori hanno anche descritto l'andamento della carica virale in relazione alla comparsa dei sintomi osservando che questa è apparsa maggiore in prossimità della comparsa degli stessi, questo dato è stato interpretato anche nel contesto della rapida diffusione di SARS-CoV-2. Gli Autori sottolineano come il dosaggio sierologico anticorpale possa essere uno strumento di supporto per la diagnosi di COVID-19 come integrazione della RT-qPCR.

Li e coll (5) hanno sviluppato e proposto un test sierologico rapido al fine di fornire uno strumento di supporto nell'identificazione su larga scala di soggetti asintomatici con infezione da SARS-CoV-2, dopo aver premesso che RT-PCR e diagnostica per immagini rappresentano i principali strumenti per la diagnosi d'infezione da SARS-CoV-2. Richiamano però i principali e noti limiti della RT-PCR: tempi di prelievo e analisi dei campioni, numero di laboratori in grado di effettuarla, sensibilità del test non ottimale (falsi negativi). Gli Autori hanno sviluppato un test immunologico rapido con tecnica LFIA (*lateral flow immunoassay*) al fine di rilevare IgM e IgG su sangue in tempi rapidi (15 minuti circa). La metodica utilizza l'antigene ricombinante (MK201027) come dominio di legame del recettore della proteina; "S" per SARS-CoV-2 mediante anticorpi IgG-IgM ottenuti da uomo/animali.

La presenza di anticorpi IgG e IgM anti SARS-CoV-2 è indicata da una linea rossa / viola nella regione delle bande d'identificazione del dispositivo. Le bande d'identificazione sono caratterizzate da anticorpi monoclonali anti-siero umano di topo (anti-IgG e anti-IgM). Il meccanismo del test si basa sull'idratazione e sul trasporto dei reagenti (es., Ig di coniglio) mentre interagiscono con il campione. Al fine di saggiare la specificità del test proposto hanno condotto uno studio multicentrico in 8 differenti nosocomi cinesi che ha incluso 397 soggetti COVID-19 (diagnosi con PCR positiva), e 128 soggetti senza diagnosi d'infezione da SARS-CoV-2. 352 soggetti (352/397 - 88,66% di sensibilità) sono risultati positivi al test rapido e 12 (12/128 - 9,37% specificità 90,63%) sono risultati positivi senza documentata infezione da SARS-CoV-2. 256 soggetti COVID-19 (256/397 - 64,48%) presentavano sia IgM che IgG.

Gli Autori stessi nella discussione sottolineano che il test non è utilizzabile per la diagnosi d'infezione da SARS-CoV-2, ma che può essere utilizzato per identificare infezioni di recente acquisizione. Non state condotte stratificazioni per *timing* d'esecuzione dei test rapidi in relazione all'esecuzione dei tamponi e della comparsa del quadro sintomatologico. Non sono state studiate possibili cross-reazioni con altri coronavirus e con i virus influenzali.

Xiao e coll. (7) hanno condotto uno studio per indagare il profilo degli anticorpi specifici per SARS-CoV-2 in una popolazione di 34 soggetti arruolati tra il 1° febbraio e il 29 febbraio 2020 con diagnosi di COVID-19. La tecnica utilizzata prevede l'analisi di IgM e IgG anti SARS-CoV-2 mediante test immunologico in chemiluminescenza per IgM e IgG anti SARS-CoV-2 dopo 2, 3, 4, 5, 7 settimane dall'esordio dei sintomi. A 3 settimane dall'insorgenza del quadro clinico, tutti i soggetti sono risultati positivi per IgM e IgG anti SARS-CoV-2, con un valore medio rispettivamente di 322,80 AU (unità di assorbimento) / ml e 112,40 AU / ml (riferimento: <10 AU / ml). Nella quarta settimana (dalla com-

parsa della sintomatologia COVID-19 *like*), tutti i soggetti erano ancora positivi per IgM e IgG. Le IgM hanno registrato trend decrementale mentre le IgG hanno registrato un trend incrementale, con un valore medio rispettivamente di 147,92 AU/ml e 157,01 AU /ml. Nella quinta settimana dalla comparsa della sintomatologia COVID-19 *like*, tutti i soggetti erano positivi per le IgG, mentre 2 pazienti sui 12 testati (16,7%) hanno ottenuto risultati negativi per le IgM. Il livello di IgM ha continuato a diminuire (78,03 AU /ml) e le IgG hanno continuato a registrare valori maggiori (163,56 AU / ml). Al termine del periodo di osservazione (7 settimane), 2 pazienti sui n=6 testati (33,3%) hanno ottenuto risultati negativi per IgM, mentre tutti i pazienti sono risultati positivi per IgG, con un valore medio rispettivamente di 21,83 AU / ml e 167,16 AU / ml.

Bin Lou e coll. (2) hanno condotto uno studio volto ad identificare la risposta anticorpale nei confronti di SARS-CoV-2 sia in relazione alla comparsa dei sintomi COVID-19 *like* sia in relazione all'esposizione a casi confermati (per sintomi NAATn RT-PCR rx torace), su 80 soggetti ospedalizzati per COVID-19. Complessivamente sono stati inclusi nello studio n=80 soggetti. La metodica ELISA per misurare gli anticorpi anti SARS-CoV-2 ha prevedeva tre saggi (ELISA-Ab, ELISA-IgM ed ELISA-IgG), tre test "*lateral flow immunoassay*" (LFIA-Ab, LFIA-IgM e LFIA-IgG) e due test immunologici di microparticelle in chemiluminescenza (CMIA-Ab e CMIA-IgM). La rilevazione di anticorpi nei pazienti COVID-19 anti SARS-CoV-2 è risultata essere nell'ordine di comparsa: Ab, IgM e quindi IgG, con un tempo d'insorgenza medio rispettivamente di 9, 10 e 12 giorni. Il tasso di sierconversione per Ab, IgM e IgG è stato rispettivamente del 98,8% (79/80), 93,8% (75/80) e 93,8% (75/80). La sierconversione per Ab è stata significativamente più rapida di quella di IgM e IgG ( $p < 0,001$ ). La curva di sierconversione cumulativa ha mostrato che il tasso ha raggiunto il 100% al 16° successivo all'insorgenza dei sintomi giorno per Ab e al 21° giorno per le IgM mentre ha raggiunto il 97,1% al 29° giorno per le IgG. In parallelo alla comparsa dei differenti titoli anticorpali è stato osservato un decremento della carica virale (saggiata con PCR su tampone ndr). Per quanto riguarda la valutazione della risposta anticorpale in relazione all'esposizione a casi di COVID-19 (45/80) confermati i dati riportati hanno mostrato un tasso cumulativo di sierconversione pari a 45,5% al 14° giorno dall'esposizione e pari al 75% al 20° giorno post-esposizione. Il periodo mediano di incubazione (tempo intercorso dall'esposizione alla comparsa dei sintomi) è stato osservato essere di 5 giorni (IQR, da 2 a 10), molto simile a quanto precedentemente riportato in letteratura. Il tempo necessario (mediana) per la sierconversione nei confronti di SARS-CoV-2 per i soggetti con un lungo periodo di incubazione (definito come maggiore di 5 giorni) è risultato es-

tere di 21 giorni mentre per i soggetti con un breve periodo di incubazione (definito come minore o uguale a 5 giorni) è stato osservato pari a 13 giorni. Gli Autori sottolineano come i test sierologici non possano sostituire, ad oggi, i test molecolari sottolineando tuttavia l'importanza del *follow-up* clinico e sierologico nelle due settimane successive ai primi 14 giorni post-esposizione (periodo di quarantena) al fine di limitare la possibile diffusione dell'infezione da parte di pazienti COVID-19.

Cheng e collaboratori (3) hanno condotto rassegna non sistematica (*narrative review*) con lo scopo di mappare i test diagnostici oggi disponibili per SARS-CoV-2. Gli Autori riportano come i test basati su RT-PCR rappresentino lo standard di riferimento per la diagnostica per SARS-CoV-2. Una diagnostica accurata atta a identificare e isolare i soggetti contagiosi rappresenta nell'attuale contesto l'unico strumento disponibile per ridurre la trasmissione di SARS-CoV-2, anche in considerazione dell'assenza di terapie ben definite e dell'assenza di preparati vaccinali efficaci. Gli Autori riportano come uno degli sforzi che ha contribuito a rallentare la trasmissione dell'infezione in Korea del Sud sia stata l'implementazione di strategie basate sull'esecuzione di test diagnostici molecolari nella popolazione generale. Singapore ha adottato una strategia per l'*infection control* basandosi principalmente sul *contact tracing*. Singapore, Taiwan e Hong Kong hanno utilizzato approcci basati su test diretti a pazienti con polmoniti e patologie simil-influenzali sia negli ospedali sia nelle strutture di assistenza primaria. Per ognuna di queste strategie di *infection control* l'obiettivo è risultato essere quello di orientare le attività assistenziali in base al risultato che il test utilizzato era in grado di fornire. Nonostante la notevole rapidità con cui sono stati sviluppati e resi disponibili test diagnostici per SARS-CoV-2, gli Autori riportano come gli strumenti attuali soddisfino solo parzialmente le diverse esigenze in ambito assistenziale. Lo sviluppo di test diagnostici deve tener conto dell'*outcome* che si intende indagare (es., il test è finalizzato a rilevare in modo diretto l'infezione tramite la rilevazione del virus stesso o il test ha la finalità di rilevare in modo indiretto l'infezione tramite la rilevazione di anticorpi specifici). Inoltre, l'indicazione ad eseguire determinati test deve considerare anche la capacità di analisi degli stessi (*throughput*), la necessità di disporre di un numero minimo di campioni prima dell'esecuzione test (*batch*), nonché la riproducibilità della tecnica d'analisi. Gli Autori riportano come, ad esempio, i test che rilevano il virus respiratorio sinciziale o gli antigeni del virus dell'influenza stagionale mediante test immunologico siano disponibili da molti anni pur con il limite di possedere bassa sensibilità a fronte di una bassa complessità e rapidità di analisi; analoghe problematiche si riflettono anche nei confronti di SARS-CoV-2 con l'obiettivo prioritario di una corretta interpretazione di questi test indiretti. I test sierolo-

gici sono meno complessi dei test molecolari e possono avere indicazioni circa il loro utilizzo in determinate circostanze. Tuttavia, la loro utilità diagnostica per infezioni acute è probabilmente limitata nel periodo di insorgenza dei sintomi, quando il rischio di diffusione e di trasmissione sembrano essere più elevati. Le risposte anticorpali all'infezione richiedono infatti giorni se non settimane per essere rilevabili in modo affidabile. Inoltre, risultati negativi non escluderebbero l'infezione da SARS-CoV-2, in particolare nei casi con recente esposizione/infezione. Un altro aspetto critico riguarda la reattività crociata degli anticorpi nei confronti degli antigeni (o delle proteine specifiche) non SARS-CoV-2, per cui i risultati positivi possono essere dovuti ad esposizioni pregresse ad altri coronavirus. Gli autori riportano come i test sierologici potrebbero avere un loro razionale utilizzo in scenari di pazienti con complicazioni tardive da COVID-19 o quando la RT-PCR possa essere falsamente negativa, in considerazione del fatto che lo *shedding* virale diminuisce nel tempo. La disponibilità di test sierologici accurati in termini diagnostici, in grado di confermare l'immunità /susceptibilità per SARS-CoV-2, risulterà essenziale per la conduzione di studi epidemiologici anche retrospettivi, e per lo sviluppo di preparati vaccinali e, potenzialmente, per la valutazione del rischio negli operatori sanitari. Nella *review* è riportato come i test immunologici siano presenti sul mercato in alcuni Paesi, sebbene la loro accuratezza diagnostica e un loro razionale utilizzo rimangono attualmente ancora non ben definiti.

La stessa rassegna riporta un ulteriore studio condotto da un gruppo di esperti del CDC che ha indagato l'accuratezza di differenti test sierologici per SARS-CoV-2. Gli Autori descrivono l'utilizzo di test sierologici per la rilevazione di anticorpi con ELISA nei confronti della proteina N e dei domini della proteina S, tra cui la subunità S1, e il dominio di legame del recettore (RBD) di SARS-CoV-2 (identificati come le maggiormente immunogeni). Le coorti selezionate hanno incluso soggetti COVID-19 (confermati con PCR) e soggetti con infezione da altri coronavirus stagionali e altri patogeni respiratori (confermati con PCR). Tale selezione è stata condotta per studiare la specificità di questi test indiretti per evitare risultati falsi positivi in considerazione del fatto che la maggior parte dei soggetti possiede anticorpi rilevabili nei confronti dei 4 coronavirus umani endemici (229E, HKU1, NL63 e OC43) e in considerazione del fatto che i coronavirus zoonotici (SARS-CoV e MERS-CoV sono beta-coronavirus come SARS-CoV-2) possono, potenzialmente, aumentare la cross-reattività. In linea con i precedenti dati della letteratura (studi condotti su MERS-CoV) la subunità S1 è risultata essere l'antigene più specifico per i test sierologici nei confronti di SARS-CoV-2. La specificità di S1 o del suo RBD per la rilevazione di anticorpi SARS-CoV-2 non ha mostrato cross reazioni, ad eccezione

dei campioni di siero di pazienti con SARS-CoV. Tuttavia, in considerazione della non circolazione di SARS-CoV dall'anno 2003, gli Autori riportano come sia improbabile che i risultati interpretati come falsi positivi siano causati dalla reazione crociata con anticorpi SARS-CoV. Gli Autori riportano come la sierconversione IgG sia osservabile nella seconda settimana successiva alla comparsa della malattia clinica. A causa del numero limitato di dati longitudinali relativi al siero di pazienti COVID-19, è stato complicato valutare con precisione il tempo di sierconversione. Nei 3 test ELISA testati, gli ELISA RBD e N erano più sensibili dell'ELISA S1 nel rilevare gli anticorpi nei pazienti con infezione lieve e hanno mostrato una maggiore correlazione con i titoli PRNT50. Pertanto, potrebbe essere necessario rilevare anticorpi contro 2 diversi antigeni per confermare i risultati ed evitare risultati falsi negativi negli studi di sorveglianza epidemiologica. Complessivamente, i test sviluppati e validati in questo studio potrebbero essere impiegati per il tracciamento dei contatti di casi confermati, studi di siero sorveglianza e studi di valutazione dei vaccini. Poiché i vari studi saranno condotti in differenti laboratori, è fondamentale calibrare e standardizzare i test sviluppati utilizzando riferimenti ben definiti come parte della validazione del test diagnostico. Questa standardizzazione non è necessaria solo per ridurre la variabilità inter-test, ma anche per correlare i risultati ottenuti da diversi laboratori che utilizzano vari test. Si riporta come questo aspetto sia cruciale per un migliore confronto e interpretazione dei risultati di diversi studi, per lo sviluppo di preparati vaccinali e per consentire una valutazione puntuale e omogenea dell'immunogenicità e dell'efficacia; anche in ottica di una migliore comprensione di eventuali correlati di protezione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Amanat Fatima, Nguyen Thi H.O., Chromikova Veronika et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. medRxiv preprint. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.17.20037713>.
2. Bin Lou, Ting-Dong Li, Shu-Fa Zheng. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset. MedRxiv preprint doi: [org/10.1101/2020.03.23.20041707](https://doi.org/10.1101/2020.03.23.20041707).
3. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, Dittrich S, Yansouni CP. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related-Coronavirus-2: A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2020 Apr 13.
4. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang, Yang F, Dela Cruz CS, Wang Y, Wu C, Xiao Y, Zhang L, Han L, Dang S, Xu Y, Yang Q, Xu S, Zhu H, Xu Y, Jin Q, Sharma L, Wang L, Wang J. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 2020 Mar 21.
5. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, Sun R, Wang Y, Hu B, Chen W, Zhang Y, Wang J, Huang B, Lin Y, Yang J, Cai W, Wang X, Cheng J, Chen Z, Sun K, Pan W, Zhan Z, Chen L, Ye F. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol*. 2020 Feb 27.
6. Liu Lei, Wanbing Liu, Yaqiong Zheng et al. A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.06.20031856>.
7. Xiao DAT, Gao DC, Zhang DS. Profile of Specific Antibodies to SARS-CoV-2: The First Report. *J Infect*. 2020 Mar 21. pii: S0163-4453(20)30138-9. doi:10.1016/j.jinf.2020.03.012. [Epub ahead of print].
8. Wang To- Kelvin Kai, Owen Tak-Yin Tsang, Wai-Shing Leung e coll. Temporal Profiles of Viral Load in Posterior Oropharyngeal Saliva Samples and Serum Antibody Responses During Infection by SARS-CoV-2: An Observational Cohort Study. 2020 Mar 23 [Online ahead of print] *Lancet Infect Dis*.