



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**TEST SIEROLOGICI SARS-CoV-2:
METODICHE A CONFRONTO**

Relatore
Dott.ssa Marinella Balercia

Tesi di Laurea di
Caterina Sabbatini

Anno Accademico 2019/2020

Ai Medici e ai Ricercatori

“Lo so. È tutto sbagliato. Noi non dovremmo nemmeno essere qui. Ma ci siamo. È come nelle grandi storie, padron Frodo. Quelle che contano davvero. Erano piene di oscurità e pericoli, e a volte non volevi sapere il finale. Perché come poteva esserci un finale allegro? Come poteva il mondo tornare com'era dopo che erano successe tante cose brutte? Ma alla fine è solo una cosa passeggera, quest'ombra. Anche l'oscurità deve passare. Arriverà un nuovo giorno. E quando il sole splenderà, sarà ancora più luminoso. Quelle erano le storie che ti restavano dentro, che significavano qualcosa, anche se eri troppo piccolo per capire il perché. Ma credo, padron Frodo, di capire, ora. Adesso so. Le persone di quelle storie avevano molte occasioni di tornare indietro e non l'hanno fatto. Andavano avanti, perché loro erano aggrappate a qualcosa.”
“Noi a cosa siamo aggrappati, Sam?”
“C'è del buono in questo mondo, padron Frodo. È giusto combattere per questo.”

Da Il Signore degli anelli: Le Due Torri

Sommario

1. Introduzione:.....	3
SARS-CoV-2: Struttura.....	5
Epidemiologia	7
Trasmissione.....	9
Aspetti clinici	10
Trattamento.....	10
Associazione Lopinavir-Ritonavir	11
Remdesivir	11
Cloroquina e idrossicloroquina	11
Tocilizumab	12
Eparine	12
Steroidi	12
Plasma iperimmune.....	13
Anticorpi monoclonali di origine sintetica	13
Prevenzione	13
Vaccino.....	14
Diagnosi di laboratorio.....	15
2. Scopo della tesi	23
3. Materiali e metodi.....	24
Classificazione dei fenomeni di luminescenza.....	24
Le ftalilidrazidi: Il luminolo e suoi derivati.....	26
I diossetani	27
Gli esteri di acridinio.....	27
Il trisbipiridil-rutenio.....	27
Il segnale analitico.....	28
Analisi della cinetica delle reazioni chemiluminescenti	29
L'automazione nei dosaggi immunochemiluminescenti commerciali.....	30
iFlash 1800 – Pantec.....	31
Pantec – iFlash 1800 e gli esteri di acridinio	31
Liaison XI – Diasorin	33
Diasorin – Liaison XI e l'isoluminolo	33
Cobas e 411 – Roche	35

Roche – Cobas e411 e il trisbipiridil-rutenio	35
Architect i2000 – Abbott.....	37
Abbott – Architect e gli esteri di acridinio.....	37
4. Analisi dei dati	40
Analisi iFlash 1800 – Pantec e Cobas e411 – Roche	48
Analisi iFlash 1800 – Pantec e Liaison XI – Diasorin	49
Analisi Liaison XI – Diasorin e Cobas e411 – Roche.....	50
Analisi Liaison XI – Diasorin e Architect i2000 – Abbott	51
Analisi Cobas e411 – Roche e Architect i2000 – Abbott	52
Analisi iFlash 1800 – Pantec e Architect i2000 – Abbott	53
5. Conclusioni	54
6. Bibliografia e Sitografia.....	56
7. Ringraziamenti.....	61

1. Introduzione:

I coronavirus (sottofamiglia Orthocoronavirinae, famiglia Coronaviridae, sottordine Cornidovirineae, ordine Nidovirales) sono un genere di virus a RNA responsabili, nell'uomo, di patologie di differente gravità, da sindromi respiratorie che possono coinvolgere le alte e basse vie respiratorie, a sindromi enteriche, epatiche, encefaliti sino ad evolvere, nei casi più gravi, a patologie multiorgano. Negli anni 2000 due sono state le sindromi respiratorie gravi a carattere epidemico: la SARS (sindrome respiratoria acuta grave, Severe Acute Respiratory Syndrome) e la MERS (sindrome respiratoria mediorientale, Middle East Respiratory Syndrome). A gennaio 2019 si aggiunge come patologia "Covid-19" causata dal nuovo SARS-CoV-2.

Il nome di questi virus è legato alla morfologia dei virioni se osservati al microscopio elettronico: sono dotati di proiezioni sulla superficie dell'*envelope*, costituite dalla glicoproteina S (*spike*), che conferiscono loro il caratteristico aspetto a corona. I coronavirus sono tra i virus a RNA di maggiore lunghezza, circa 30 Kb.

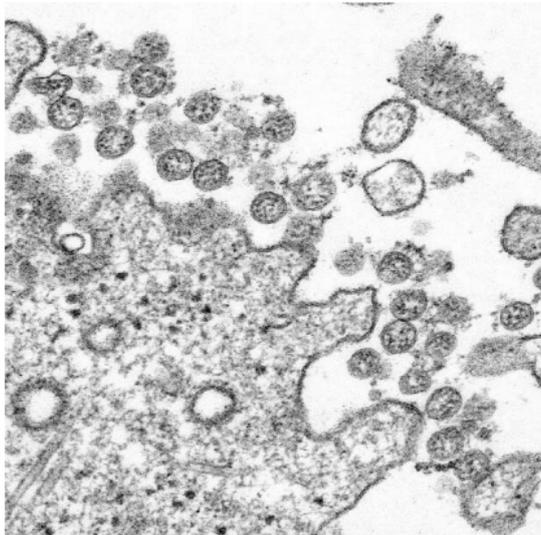


Figura 1. Immagine al microscopio elettronico delle particelle virali in un paziente infettato dal SARS-CoV-2

I coronavirus sono in grado di infettare anche animali come roditori, felini, polli, cammelli e pipistrelli e, in determinate circostanze, possono compiere “un salto di specie” e infettare l’uomo.

Sono stati identificati a partire dagli anni Sessanta e possono essere classificati in:

- Coronavirus umani comuni: 229E (alpha-coronavirus), NL63 (alpha-coronavirus), OC43 (beta-coronavirus), HKU1 (beta-coronavirus)
- Altri coronavirus umani: MERS-CoV (beta-coronavirus che causa la Middle East respiratory syndrome), SARS-CoV (beta-coronavirus che causa la Severe acute respiratory syndrome) e SARS-CoV-2 (denominato in precedenza 2019-nCoV).

Il SARS-CoV-2 è stato sequenziato per la prima volta da ricercatori cinesi a metà gennaio e, successivamente, in altri laboratori. In Italia il primo isolamento è stato effettuato da parte dell’Istituto Nazionale per le Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani.¹

Avere un virus isolato è un punto di partenza imprescindibile perché permette di averlo in grandi quantità facilitando il suo sequenziamento. Infatti, per una maggiore conoscenza delle caratteristiche peculiari del virus, la disponibilità dell’intera sequenza genomica del virus e degli isolati virali è un presupposto fondamentale. Il virus diffusosi dalla Cina al resto del mondo ha la stessa sequenza del virus originariamente isolato a Wuhan. Secondo uno studio condotto da *Los Alamos National Laboratory*, negli Stati Uniti si è diffuso un ceppo virale che presenta, nel suo genoma, una mutazione a livello della proteina S. Tale mutazione sembra determinare una maggiore efficienza nel legame del virus con la cellula bersaglio che si traduce in un comportamento più aggressivo del patogeno.²

SARS-CoV-2: Struttura

Sars-CoV-2 è un virus dotato di *envelope* e presenta un genoma a singolo filamento di RNA a polarità positiva. È costituito da 16 proteine non strutturali e 4 proteine strutturali: *spike* (S), *envelope* (E), di membrana (M), del nucleocapside (N).³

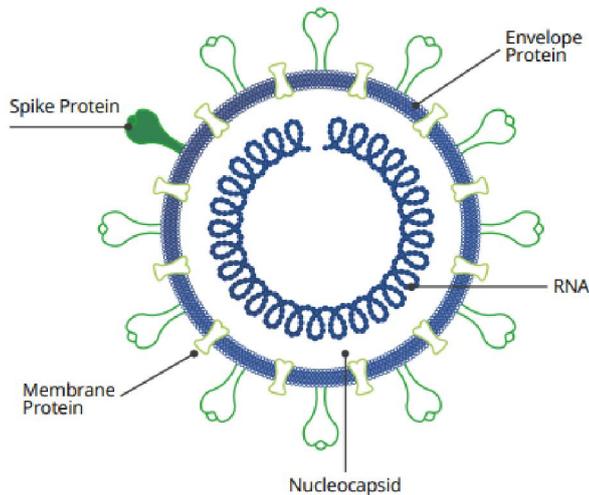


Figura 2. Struttura SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 lega con alta affinità il recettore ACE2 presente sulle cellule target umane.⁴ Il legame tra il virus e il recettore ACE2 avviene mediante la caratteristica glicoproteina transmembrana spike.

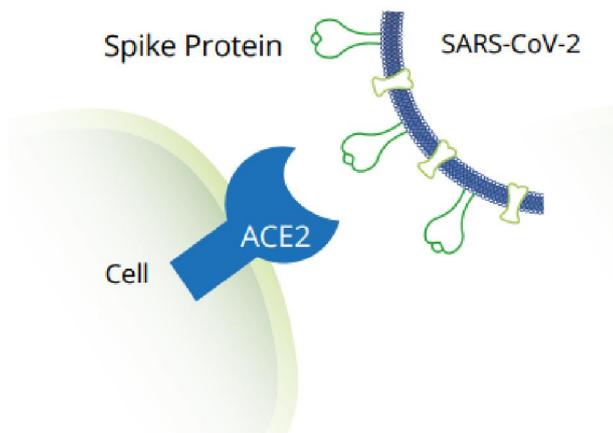


Figura 3. Legame SARS-Cov-2 e proteina umana ACE2

La glicoproteina S è una proteina trimerica di fusione di classe 1: esiste in una conformazione di pre-fusione metastabile che subisce un sostanziale riarrangiamento strutturale volto alla fusione della membrana del virus con quella della cellula ospite. Questo processo viene attivato quando la subunità

S1 lega il recettore della cellula ospite. Il legame con il recettore destabilizza il trimero di pre-fusione, determinando la perdita della subunità S1 e la transizione della subunità S2 in una conformazione post-fusione stabile. Per occupare il recettore della cellula ospite, il dominio di legame del recettore (RBD) di S1 subisce movimenti conformazionali “a cerniera” che nascondono o espongono transitoriamente i determinanti del legame del recettore. Questi due stati vengono definiti conformazione “down” e conformazione “up”, dove “down” corrisponde allo stato inaccessibile del recettore e “up” allo stato accessibile, che si pensa sia meno stabile. Per la funzione indispensabile della proteina S, questa rappresenta un bersaglio per la neutralizzazione mediata da anticorpi. Allo stesso modo, la caratterizzazione della struttura della proteina S di pre-fusione fornirebbe informazioni a livello atomico fondamentali per guidare la progettazione e lo sviluppo del vaccino.

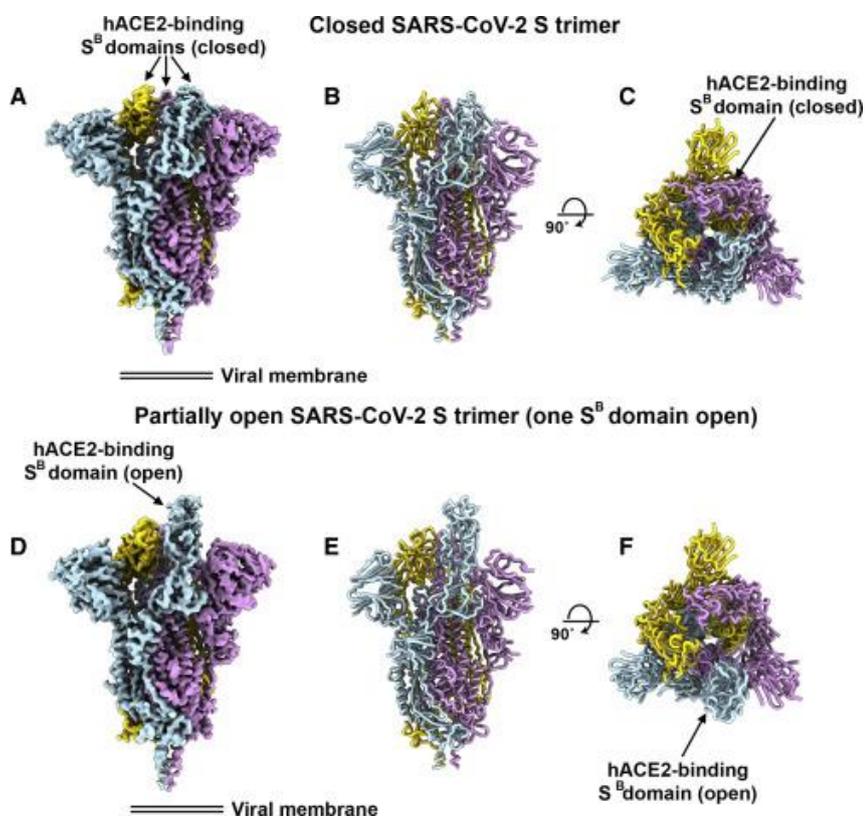


Figura 4. Struttura della glicoproteina S del SARS CoV-2. A) Trimero S parzialmente chiuso. B) e C) vista ortogonale laterale (B) e apicale (C) del modello

atomico del trimero S chiuso. D) Trimero S parzialmente aperto. E) e F) vista ortogonale laterale (E) e apicale (F) del modello atomico del trimero aperto.

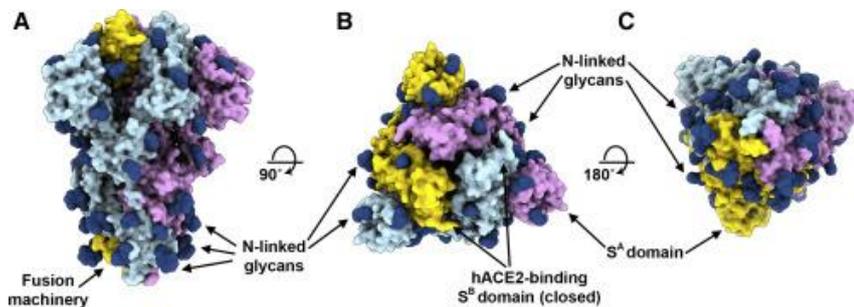


Figura 5. Organizzazione degli N-glicani della glicoproteina S del SARS-CoV-2. I trimeri S presentano numerosi N-glicani, che sporgono dalla superficie. Gli oligosaccaridi sono importanti per una corretta piegatura, per modulare l'accessibilità alle proteasi dell'ospite e per la neutralizzazione degli anticorpi.⁵

Epidemiologia

Il 31 dicembre 2019 è stato comunicato da parte delle autorità sanitarie cinesi che nella città di Wuhan (provincia di Hubei, Cina centro-orientale) si era sviluppato un focolaio epidemico di casi di polmonite atipica a eziologia non nota. Il 9 gennaio 2020 il Center for Disease Control and Prevention (CDC) cinese comunica al mondo di aver identificato l'agente eziologico della malattia: un nuovo coronavirus, inizialmente denominato 2019-nCoV e poi ufficialmente chiamato SARS-CoV-2 dall'International Committee on Taxonomy of Viruses (11 febbraio 2020). Il virus è stato isolato, il suo genoma rapidamente sequenziato e messo a disposizione della comunità scientifica. Solo successivamente però, è stata confermata la possibilità di trasmissione interumana del virus. La prima sintesi disponibile si riferisce a 72.314 pazienti del focolaio cinese. Tra i 44.672 casi confermati (solo il 62% per l'insufficienza della disponibilità del test) la distribuzione per sottogruppi era la seguente:

- Età: <10 anni 1%; 10-19 anni 1%; 20-29 anni 8%; 30-79 anni 87%; ≥80 anni 3%

- Gravità della malattia: lieve 81%, grave 14%, critica 5%
- Letalità generale 2,3%, casi critici 49%
- Letalità per età: ≥ 80 anni 14,8%; 70-79 anni 8%

Il SARS-CoV-2, secondo l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), causa una malattia lieve in circa l'80% dei casi e la maggior parte di questi guarisce, il 14% dei casi sviluppa una patologia più grave e il 6% dei casi ha una malattia critica. Occorre, inoltre, sottolineare l'alto numero di operatori sanitari contagiati: in data 11 maggio 2020 l'ISS segnalava che, solo in Italia, erano 25.071.¹

L'età e il sesso sono fattori di rischio ben definiti: oltre il 90% dei decessi nel Regno Unito sono legati a persone di età superiore a 60 anni e, nel 60% dei casi, i decessi si sono verificati negli uomini. Viene riportato che condizioni preesistenti sono correlate ad un aumentato rischio, soprattutto in caso di malattie cardiovascolari, ipertensione, diabete, obesità, malattie respiratorie e tumori. I rischi associati al fumo sono controversi: se inizialmente è stato segnalato un aumento dei rischi per questa categoria, studi recenti suggeriscono che i fumatori sono sottorappresentati tra coloro che sono stati colpiti da una forma più grave della malattia, e viene inoltre riportato un potenziale meccanismo protettivo della nicotina.⁶

Un importante parametro epidemiologico è il fattore R_0 (numero di riproduzione di base, basic reproductive number), che rappresenta il numero medio di infezioni secondarie determinate da ciascun individuo infetto in una popolazione completamente suscettibile a un nuovo patogeno. È, dunque, indice della trasmissibilità potenziale di una malattia infettiva. Maggiore è il valore di R_0 , più elevato è il rischio di diffusione dell'epidemia. R_0 dipende dalla probabilità di trasmissione per singolo contatto tra una persona infetta e una suscettibile, dal numero dei contatti della persona infetta e dalla durata dell'infettività. La riduzione del fattore R_0 è legata a tre specifiche variabili: la probabilità di trasmissione, la durata dell'infettività, la diagnosi tempestiva del caso. Le prime due sono variabili immodificabili in assenza di un vaccino

o di una terapia.¹ Altri parametri chiave da valutare nell'ambito di un'indagine epidemiologica sono: le distribuzioni dell'intervallo di generazione (tempo che intercorre tra eventi di infezione in una coppia infetto-infettato), intervallo seriale (tempo trascorso tra l'insorgenza di sintomi in una coppia infetto-infettato), periodo di incubazione (tempo che intercorre tra il momento dell'infezione e l'insorgenza dei sintomi). Le stime del numero di riproduzioni e le distribuzioni dell'intervallo di generazione possono fornire informazioni importanti sulla velocità con cui si diffonderà una malattia. Le stime della distribuzione del periodo di incubazione possono aiutare a determinare i periodi di quarantena appropriati.⁷

Trasmissione

Il virus può essere trasmesso secondo diverse modalità. Prima tra tutte è la trasmissione attraverso goccioline di saliva e aerosol delle secrezioni delle vie aeree superiori. Si parla quindi di *droplets*, che vengono veicolati da tosse e starnuti. Soprattutto la nebulizzazione di saliva e secrezioni generate dal tratto respiratorio di un soggetto infetto, a distanze brevi (inferiori di 1 metro) può fungere da vettore del virus. La trasmissione per via aerogena mediata da particelle di dimensioni inferiori a 5 µm propagabili a distanza maggiore di un metro non è stata dimostrata per i coronavirus, incluso il SARS-CoV-2, fatta eccezione per delle specifiche procedure realizzate esclusivamente in ambiente sanitario come, ad esempio, intubazioni, tracheotomie, ventilazioni forzate. Inoltre, il virus può essere trasmesso anche per contatto diretto (strette di mano) e contatto indiretto (toccando superfici o oggetti contaminati dalle secrezioni respiratorie di un soggetto affetto e in seguito toccandosi con le mani contaminate le mucose di naso, bocca e occhi). Infine, il virus può essere trasmesso per via oro-fecale.¹

Basandosi sui dati al momento disponibili, l'Organizzazione Mondiale della Sanità afferma che il motore principale della trasmissione del SARS-CoV-2 è il contatto con casi sintomatici, ovvero soggetti che hanno contratto l'infezione e che già ne manifestano i sintomi. Tuttavia, è probabile che sia presente una trasmissione legata a soggetti asintomatici, la quale potrebbe

essere rara e, quindi, non uno dei motori principali della trasmissione. Sono in corso molti studi per ampliare le conoscenze circa le modalità di trasmissione del recente SARS-CoV-2.⁸

Aspetti clinici

Una tipica infezione da SARS-CoV-2, dopo un tempo di incubazione compreso tra i 2 e i 14 giorni (mediamente 5), inizia con tosse secca e febbre di basso grado (38,1°C – 39°C), spesso accompagnata da sintomi neurologici quali alterazione del gusto e dell'odorato. Nella maggior parte dei casi l'infezione si manifesta con sintomi lievi o moderati e che si risolvono entro una settimana; i pazienti, dunque, si riprendono a casa. Il 10% dei pazienti rimane sintomatico per la seconda settimana. Più a lungo i sintomi persistono, maggiore è il rischio di andare incontro ad un decorso clinico di maggiore entità, che potrebbe richiedere il ricovero ospedaliero, la terapia intensiva, la ventilazione invasiva. Successivamente, i pazienti potrebbero accusare dispnea e necessitare della ventilazione meccanica. Soprattutto nei pazienti più anziani e con comorbidità, la prognosi è spesso imprevedibile. È possibile, dunque, asserire che il quadro clinico è variabile: può prevedere casi completamente asintomatici o decorsi rapidamente devastanti.⁹

Trattamento

Nelle linee guida sull'assistenza ai pazienti non ci sono terapie consigliate, ma sono indicate solo terapie di supporto. Occorre quindi affermare che il trattamento dell'infezione è al momento aspecifico, sintomatico, volto al controllo della temperatura corporea, alla reidratazione e al supporto della funzionalità respiratoria. L'utilizzo degli antibiotici è solo ed esclusivamente legato a situazioni di sovra-infezioni batteriche. Si parla di sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) quando la compromissione delle funzioni respiratorie è particolarmente grave. In questi casi, oltre alla respirazione assistita, è possibile ricorrere all'ossigenazione extracorporea a membrana (ECMO). Al momento sui pazienti vengono utilizzati farmaci già in uso o in sperimentazione per altre patologie. Lo scenario dei farmaci utilizzati si è rapidamente evoluto in questi pochi mesi passando attraverso varie

associazioni di farmaci: Lopinavir-Ritonavir, Remdesivir, Cloroquina, Tocilizumab, Eparine, Steroidi e Plasma.¹

Associazione Lopinavir-Ritonavir

Il Lopinavir e il Ritonavir sono farmaci inibitori della proteasi del virus dell'HIV, utilizzati in associazione perché particolarmente efficaci nell'attenuazione dei sintomi dell'ARDS.¹⁰

Uno studio controllato e randomizzato cinese ha però dimostrato che la combinazione dei due farmaci non ha evidenziato alcuna efficacia. In realtà, lo studio venne condotto su una popolazione di 199 pazienti con malattia avanzata, in particolare SaO₂ <94%, necessità di ricorrere all'ossigenoterapia o a tecniche di ventilazione meccanica e che hanno manifestato i sintomi della patologia da più di 12 giorni. I protocolli attualmente in uso tendono quindi ad utilizzare molto poco queste associazioni di farmaci salvo nelle fasi più precoci della malattia e in pazienti meno compromessi.¹¹

Remdesivir

Valido e promettente, questo farmaco agisce inibendo a largo spettro le RNA polimerasi virali. È stata dimostrata una certa efficacia sia in vitro che in modelli animali di SARS e MERS-CoV.¹² È presente un caso di un paziente negli Stati Uniti trattato con Remdesivir guarito.¹³ Il Wuhan Institute of Virology ha annunciato di aver ottenuto risultati favorevoli in vitro, quindi in colture cellulari, attraverso un'associazione tra Remdesivir e Cloroquina, ma la sua efficacia resta da dimostrare.¹⁴ Lo studio di maggiore entità, non controllato, coinvolge 61 pazienti COVID-19 gravi. L'AIFA ha reso disponibile il farmaco attraverso due studi clinici autorizzati in soggetti con malattia COVID-19 moderata o severa e anche tramite la fornitura per uso compassionevole in soggetti gravi ricoverati in terapia intensiva.¹⁵

Cloroquina e idrossicloroquina

Presumibilmente la cloroquina può interferire con il meccanismo di legame tra il virus e i recettori di superficie ACE2 presenti nel polmone, intestino, cuore e rene, e con la capacità di acidificare i lisosomi e attivare autofagosomi. Inoltre, la cloroquina potrebbe avere un'azione, positiva e

indiretta, coinvolta nella riduzione delle citochine proinfiammatorie e nell'attivazione dei CD8+ anti-SARS-COV-2.¹⁶

Per un'azione antinfiammatoria volta alla risoluzione dell'interstiziopatia peculiare della polmonite virale da SARS-CoV-2, viene impiegata l'idrossiclorochina. Studi in vitro hanno dimostrato che questo farmaco è in grado anche di ridurre la replicazione virale per cui si parla di ipotesi di efficacia sempre legata alle fasi iniziali della malattia.¹⁷

Tocilizumab

È in corso uno studio sull'efficacia e sicurezza nel trattamento di pazienti con polmonite da COVID-19 con il Tocilizumab, un principio attivo utilizzato nel trattamento di altre patologie come l'artrite reumatoide. Si tratta di un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore dell'interleuchina 6, mediatore dell'infezione conseguente alla risposta immunitaria messa in atto nei confronti del virus a livello alveolare. La risposta immunitaria particolarmente violenta, affiancata dalla "tempesta citochinica", è responsabile del danno parenchimale e della compromissione della funzionalità respiratoria.¹⁸

Una revisione sistematica di 6 studi (2 retrospettivi e 4 studi di caso) rileva che il tocilizumab agisce riducendo i livelli di IL-6, ma non giunge a risultati conclusivi sull'efficacia del farmaco.¹⁹

Eparine

Secondo studi retrospettivi, la somministrazione di eparina per almeno 6/14 giorni può migliorare la sopravvivenza in presenza di parametri che indicano l'attivazione della coagulazione. Indipendentemente dalla gravità del quadro clinico e in assenza di controindicazioni specifiche, l'International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) raccomanda la profilassi con eparine a basso peso molecolare in tutti i pazienti ricoverati per COVID-19.²⁰

Steroidi

Nei pazienti critici affetti da sindrome respiratoria acuta grave causata dall'infezione da SARS-CoV-2, gli steroidi, generalmente il metilprednisolone e il desametasone vengono utilizzati nonostante i

contradditori dati circa gli effetti e la letalità. A causa della soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), il trattamento con steroidi può causare sintomi di ipercortisolismo, soprattutto in pazienti con ipersensibilità individuale o iposurrenalismo, a seguito dell'interruzione del farmaco. Sembra essere efficace nei pazienti più gravi ma inutile nei meno gravi. L'insufficienza surrenalica potrebbe potenzialmente aumentare il rischio di morbilità e mortalità. La maggior parte dei pazienti è trattata con farmaci antiretrovirali (come ad esempio il Ritonavir), la cui azione determina l'inibizione di enzimi del citocromo P4503A. Per questo motivo, la co-somministrazione degli antiretrovirali e dei corticosteroidi può incrementare l'esposizione di quest'ultimi, metabolizzati attraverso la via metabolica CYP450 CYP3A, e può determinarne un prolungamento dell'emivita, con conseguente soppressione più duratura dell'asse HPA.²¹

Plasma iperimmune

Si hanno buone speranze per il futuro. Al momento non è noto quale protezione nel tempo conferiscano gli anticorpi sviluppati in risposta all'infezione da SARS-CoV-2. Per trattare alcuni pazienti del focolaio cinese sono stati utilizzati, con risultati incoraggianti, derivati del sangue contenenti il plasma di pazienti che hanno superato la fase acuta. Tenendo conto di queste prove di efficacia, la Food and Drug Administration ha autorizzato l'impiego di questo derivato del sangue nei pazienti con COVID-19 grave. La Commissione Europea ha pubblicato le linee guida sulle modalità di raccolta, manipolazione, conservazione e trasfusione del plasma.²²

Anticorpi monoclonali di origine sintetica

Si tratta di immunoglobuline ingegnerizzate in laboratorio (prodotti biotecnologici di sintesi) che prodotte in massa potrebbero diventare potenti armi in grado di prevenire e curare la malattia.

Prevenzione

La procedura più semplice ed economica per contrastare le infezioni, compresa l'infezione da SARS-CoV-2, è rappresentata dall'igiene delle mani. La procedura deve essere eseguita per 40 secondi sfregando e

insaponando il palmo e il dorso delle mani, così come nello spazio tra le dita. Le mani devono essere sciacquate, di conseguenza, con acqua corrente. Qualora non sia possibile utilizzare l'acqua, viene raccomandato l'utilizzo di soluzioni alcoliche per 20-40 secondi. Nella circolare ministeriale del 22 febbraio 2020 si raccomanda di posizionare distributori di gel alcolici (60-85%) nei luoghi affollati (aeroporti, stazioni ferroviarie, porti, metropolitane, scuole, centri commerciali, mercati, centri congressuali, eccetera) e di esporre materiali informativi riguardanti l'igiene delle mani, l'igiene respiratoria e il distanziamento sociale.¹

Altre efficaci misure di prevenzione da applicare sia nell'ambito comunitario che sanitario, includono:

- Evitare di toccare gli occhi, il naso e la bocca con le mani;
- Tossire o starnutire all'interno del gomito con il braccio piegato o di un fazzoletto, preferibilmente monouso, che poi deve essere immediatamente eliminato;
- Indossare la mascherina chirurgica nel caso in cui si abbiano sintomi respiratori ed eseguire l'igiene delle mani dopo avere rimosso ed eliminato la mascherina;
- Evitare contatti ravvicinati mantenendo la distanza di almeno un metro dalle altre persone, in particolare con quelle con sintomi respiratori.

Per gli operatori sanitari sono necessarie precauzioni aggiuntive per preservare sé stessi e prevenire la trasmissione dell'agente virale. È fondamentale un corretto utilizzo dei DPI, un'adeguata sensibilizzazione e addestramento relativi alle modalità di utilizzo, alla vestizione e svestizione del personale sanitario.²³

Vaccino

Nonostante le moderne tecnologie possano accelerare il tempo per l'individuazione e la messa a punto di un vaccino, qualsiasi candidato

vaccinale deve seguire un determinato percorso della ricerca clinica che prevede:

- Studi di fase 1, relativi alla tossicità;
- Studi di fase 2, inerenti al dosaggio e alle modalità di somministrazione;
- Studi di fase 3, riguardanti l'efficacia clinica.

Dunque, si tratta di studi controllati e randomizzati che richiedono diversi mesi. Pur ribadendo l'attuale indisponibilità di un farmaco e la necessità di procedure di validazioni affidabili, la European Medicine Agency (EMA) ha dichiarato la propria disponibilità a coordinare e sostenere le attività di ricerca volte allo sviluppo di un vaccino contro SARS-CoV-2. Le proteine virali chiave per la progettazione e lo sviluppo di vaccini sono: la proteina S, in quanto in grado di evocare una risposta da parte di anticorpi neutralizzanti; la proteina N, essendo in grado di evocare una risposta anticorpale e cellulare. Al momento non è noto quale protezione nel tempo conferiscano gli anticorpi sviluppati in risposta all'infezione da SARS-CoV-2.¹

Diagnosi di laboratorio

Data la rapida ed acuta insorgenza del COVID-19, il test molecolare per la rilevazione dell'RNA SARS-CoV-2 eseguito presso il Laboratorio di Riferimento Nazionale dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) o dai Laboratori Regionali di Riferimento Autorizzati su campioni del tratto respiratorio rimane il test diagnostico prescelto per la valutazione dei pazienti sintomatici e non.

Presso il Laboratorio della Struttura Organizzativa Dipartimentale di Virologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona (laboratorio autorizzato alla diagnosi) vengono eseguiti test diagnostici a partire da campioni destinati al processo di estrazione dell'acido nucleico che devono essere raccolti in provette Universal Transport Medium o Amies o diluiti in 1-2 ml di soluzione fisiologica sterile, secondo le

indicazioni del laboratorio ed inviati obbligatoriamente mediante un sistema di triplo imballaggio, se spediti da centri di prelievo esterni, per impedire la fuoriuscita del contenuto. Il processo di conservazione delle provette prevede la conservazione a temperatura ambiente per un massimo di un giorno, meglio a +2°C / +8°C per un massimo di cinque giorni, a -20°C per un mese, a -70°C per tempi più lunghi. I campioni che possono essere analizzati sono di varie tipologie: tamponi naso-faringei, tamponi nasali e tamponi oro-faringei nel caso di campioni di raccolta delle alte vie respiratorie o in caso di situazioni particolari tipo pazienti ricoverati in Rianimazione o “reparti Covid”, i campioni biologici di preferenza sono quelli provenienti dalle basse vie respiratorie quali: lavaggio bronco-alveolare, aspirato endotracheale, escreato profondo. La preparazione del campione prevede l'estrazione dell'RNA virale attraverso l'utilizzo di sistemi di estrazione automatizzati in dotazione presso il Laboratorio di Virologia quali Abbott*m2000* Real Time System (che comprende *m2000sp* per l'estrazione e *m2000rt* per l'amplificazione), Qiasymphony - Qiagen, Ingenius ElitechGroup, Abbott Alinity-m.



Figura 6. Strumento *m2000sp* – Abbott.



Figura 7. Strumento Qiasymphony-Qiagen.



Figura 8. Strumento Ingenius ElitechGroup.



Figura 9. Strumento Alinity m – Abbott.

Estratto l'acido nucleico, si procede con l'esecuzione di una Real Time RT-PCR. I protocolli di Real Time PCR, adottati nell'ambito della diagnostica molecolare, a partire da gennaio 2020 furono dapprima quello di Charitè, Universitätsmedizin Berlin Institute of Virology, Berlin, Germany and German Centre for Infection Research, Berlin, Germany, seguito poi dal protocollo CDC 2019-nCoV Real Time RT-PCT, Atlanta, GA, USA.²⁴

Il primo protocollo prevede i seguenti passaggi: test di screening, utilizzando come target la regione del gene E; test di conferma, nel caso di positività allo screening, il quale ha come target la regione polimerasi virale del gene RdRp. Un ulteriore test di conferma può essere eseguito impiegando come target la regione del gene N.²⁵

Il secondo protocollo prevede l'uso di primers e sonde che hanno come target il gene N (porzioni N1 e N2) e RNase P.

D'altra parte, in questi mesi sono stati messi a punto sistemi integrati di estrazione ed amplificazione eseguiti direttamente da un unico strumento.

Uno di questi è appunto lo strumento ELITE - InGenius che, attraverso l'utilizzo del prodotto SARS-CoV-2 ELITE MGB[®] Kit, può essere utilizzato per eseguire una corsa integrata di estrazione seguita da PCR. Il saggio in

questione è di tipo qualitativo e permette di rilevare l'RNA virale in due regioni genomiche specifiche di SARS-CoV-2: gene RdRp e gene ORF8. A partire dall'RNA estratto dai campioni in esame, nella cassetta di PCR si effettuano diverse reazioni di trascrizione inversa e amplificazioni specifiche. La miscela completa di reazione retrotrascrive e amplifica anche una regione del gene umano RNasi P (controllo interno endogeno per il monitoraggio della cellularità del campione, dell'estrazione e dell'inibizione della reazione) utilizzando la sonda specifica IC. Le sonde marcate con diversi fluorofori sono idrolizzate dalla DNA polimerasi dopo ibridazione con il prodotto specifico della reazione di amplificazione. L'emissione della fluorescenza aumenta con l'aumentare del prodotto specifico della reazione di amplificazione ed è misurata e registrata dallo strumento. Alla fine dell'amplificazione, i grafici della fluorescenza sono analizzati per identificare i cicli soglia (Ct). L'interpretazione dei risultati dei dati permette di rilevare la presenza dell'RNA nel campione di partenza.²⁶

Altro strumento comparabile a quello sopra descritto è Alinity m - Abbott. Il saggio Alinity m prevede l'estrazione dell'acido nucleico seguito da una Real-Time RT-PCR che consente di rilevare qualitativamente la presenza del virus in campioni di pazienti con sospetta infezione COVID-19. I risultati positivi sono indicativi della presenza dell'RNA virale. Il primo step a cui il campione viene sottoposto è il processo di estrazione dell'acido nucleico virale. Quest'ultimo viene concentrato e reso idoneo per il processo di amplificazione, rimuovendo potenziali sostanze inibitrici. Per facilitare la cattura, il lavaggio e l'eluizione dell'acido nucleico, vengono utilizzate delle micro-particelle magnetiche. In ogni campione viene introdotto un controllo interno. Durante la reazione di amplificazione, l'RNA target viene convertito in cDNA dalla trascrittasi inversa. Innanzitutto, i primers complementari al SARS-CoV-2 e al controllo interno si appaiano ai rispettivi target e vengono estesi durante il periodo di incubazione. A seguito della denaturazione dei filamenti, resa possibile dall'aumento della temperatura, un secondo primer si lega al filamento cDNA e viene esteso dalla polimerasi, al fine di creare un

doppio filamento di DNA. Durante ogni ciclo, raggiunta un'alta temperatura, i prodotti di amplificazione si dissociano in singoli filamenti, permettendo l'appaiamento dei primer e la loro estensione una volta che la temperatura diminuisce. L'amplificazione dei tre target RdRp, proteina N e controllo interno avviene durante la stessa reazione. Man mano che le sequenze virali e quelle del controllo si appaiono ai rispettivi target, viene rilevata la fluorescenza. Le sonde sono legate all'estremità 5' del filamento e il quencher all'estremità 3'. In assenza di sequenze target non viene rilevato segnale fluorescente. In presenza di sequenza target, l'ibridizzazione alle sequenze complementari determina la separazione del fluoroforo e del quencher: ciò consente l'emissione di fluorescenza e la sua rilevazione. Le sonde per il virus e quelle del controllo sono distinte da diversi fluorofori, che permettono la simultanea rilevazione di entrambi i prodotti amplificati.²⁷

Oltre ai test molecolari, c'è un crescente interesse per l'uso di saggi sierologici per rilevare anticorpi contro SARS-CoV-2.²⁸ A differenza dei test molecolari, il rilevamento di una risposta immunitaria al virus è un marcatore indiretto dell'infezione. Diversi fattori concomitanti influiscono sulla rilevazione del virus: la dinamica della risposta immunologica; la gravità della malattia nelle varie popolazioni; la relazione tra concentrazione virale e gravità della malattia; la durata dello spargimento e la relazione con il quadro clinico (come ad esempio il recupero clinico verificatosi con l'eliminazione virale o la persistenza nonostante il miglioramento clinico); lo sviluppo e la validazione di test sierologici; l'esecuzione di studi comparativi di saggi molecolari e sierologici.²⁹ Il rilevamento di anticorpi offre informazioni cliniche vitali nel corso dell'infezione da SARS-CoV2. I risultati forniscono un forte supporto empirico per l'applicazione di routine dei test sierologici nella diagnosi e nella gestione dei pazienti con COVID-19.³⁰ Ricerche hanno dimostrato che la proteina Spike (S) e quella del nucleocapside (N) sono i primi antigeni virali contro cui vengono prodotti gli anticorpi e sono utilizzati per i test sierologici. Durante l'infezione, vengono prodotti contro il virus diversi tipi di anticorpi: le IgM, per prime, circa 5 giorni dopo la comparsa

dei sintomi; le IgG generalmente 10 giorni dopo la comparsa dei sintomi. Molti test sierologici sono in grado di rilevare sia le IgG che le IgM, ciò va ad incrementare la specificità del test. Anche le IgA possono aumentare nel corso dell'infezione e possono essere trovate nelle mucose, così come nella saliva.³¹

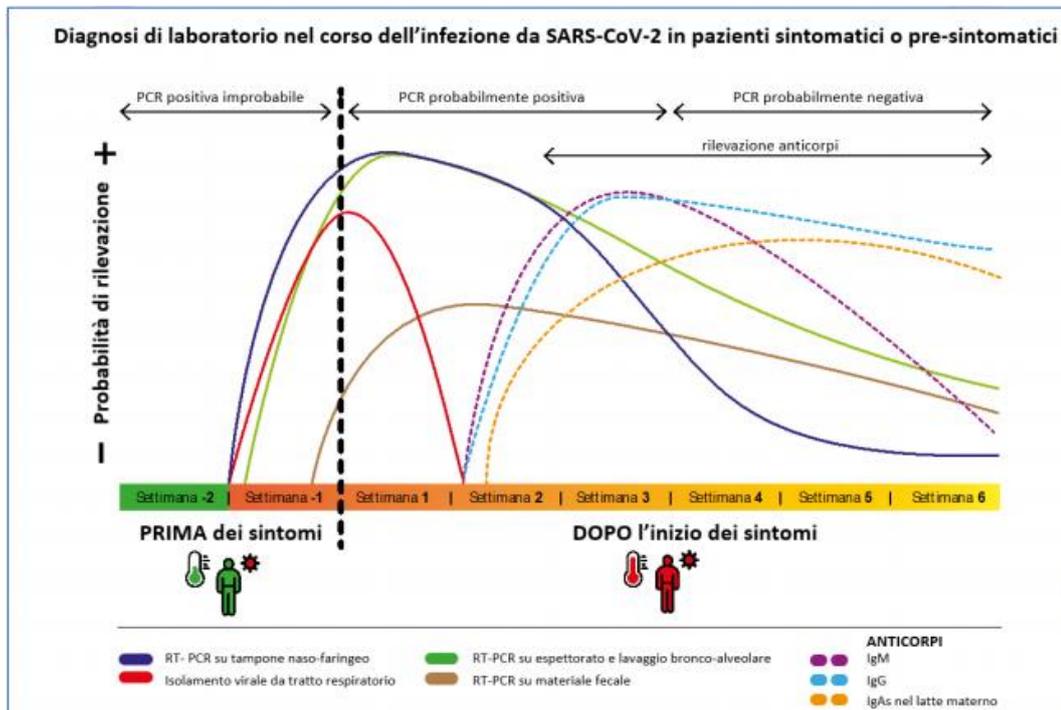


Figura 10. Diagnosi di laboratorio nel corso dell'infezione da SARS-CoV-2 in pazienti sintomatici o pre-sintomatici.

Infine, va sottolineato il sempre più crescente interesse nei confronti degli anticorpi neutralizzanti. I diversi anticorpi a elevata immunogenicità colpiscono tutti specifici siti della proteina S o Spike, quella che il coronavirus utilizza per legare il recettore ACE2, rompere la parete cellulare, inserire all'interno l'RNA virale e dare il via al processo di replicazione, che scatena l'infezione (COVID-19). Gli anticorpi, colpendo la proteina S, impediscono al virus di agganciarsi alle cellule umane, determinandone quindi la neutralizzazione. Le immunoglobuline si legano in parte al recettore (RBD) e al dominio N-terminale (NTD) della proteina S, mentre due di esse si agganciano agli epitopi quaternari situati nella porzione superiore della Spike. I ricercatori del Columbia University Irving Medical Center hanno

isolato gli anticorpi di diversi pazienti positivi che, ad oggi, sono tra i più potenti nella neutralizzazione del virus. Questi anticorpi potrebbero essere prodotti in grandi quantità da aziende farmaceutiche per curare i pazienti, soprattutto nelle prime fasi dell'infezione e per prevenirla soprattutto negli anziani. È inoltre dimostrato che i soggetti con forme più gravi di Covid-19 hanno anche una risposta anticorpale più forte e duratura.³²

2. Scopo della tesi

Il punto di partenza è verificare se i test sierologici possano essere di ausilio per l'identificazione di pazienti con sospetta infezione da SARS-CoV-2 anche in funzione della diffusione del virus stesso nella popolazione e della classificazione dei pazienti in sintomatici e a-sintomatici.

Scopo di questo studio è valutare la correlazione esistente tra i risultati derivanti da una selezione di 195 campioni processati con quattro strumenti differenti:

- iFlash 1800 – Pantec
- Architect i2000 System – Abbott
- Liaison XI – Diasorin
- Cobas e411 – Roche

Tutti gli strumenti, basati sulla chemiluminescenza, sono stati utilizzati per rilevare quantitativamente le IgG contro Sars-CoV-2 su tutti i campioni.

I campioni analizzati, provenienti dal Centro Trasfusionale, sono prelievi eseguiti su Donatori con storie diverse di infezione più o meno importante da SARS-CoV-2 selezionati per la ricerca di IgG contro il virus. Tali campioni saranno oggetto di indagine successiva da parte del laboratorio di Virologia per la valutazione del potere neutralizzante degli anticorpi stessi nei confronti dell'agente virale.

3. Materiali e metodi

Classificazione dei fenomeni di luminescenza

La luminescenza è basata sull'emissione di radiazioni luminose nel visibile o nel vicino-visibile (200-1500 nm) quando gli elettroni eccitati, da diverse forme di energia, passano dallo stato eccitato a quello fondamentale. L'energia potenziale delle transizioni elettroniche all'interno degli atomi o delle molecole viene così liberata sotto forma di luce. (P.Pinzani, 1993)³³

I metodi quantitativi di dosaggio immunologico di analiti presenti nei liquidi biologici sono basati su diversi tipi di luminescenza: fotoluminescenza (prodotta da una radiazione elettromagnetica); chemiluminescenza (di tipo chimico); elettrochemiluminescenza (di tipo elettrochimico).³⁴

La chemiluminescenza è il fenomeno osservato quando il prodotto di una reazione esoergonica eccitato vibronicamente, passa al suo stato fondamentale con conseguente emissione di fotoni. Può essere definito in termini riduttivi come: reazione chimica con emissione di luce. La reazione chimica produce energia in quantità sufficiente da indurre una transizione degli elettroni dallo stato fondamentale allo stato eccitato. Questo passaggio è spesso accompagnato da un cambiamento vibrazionale e rotazionale delle molecole.³⁵

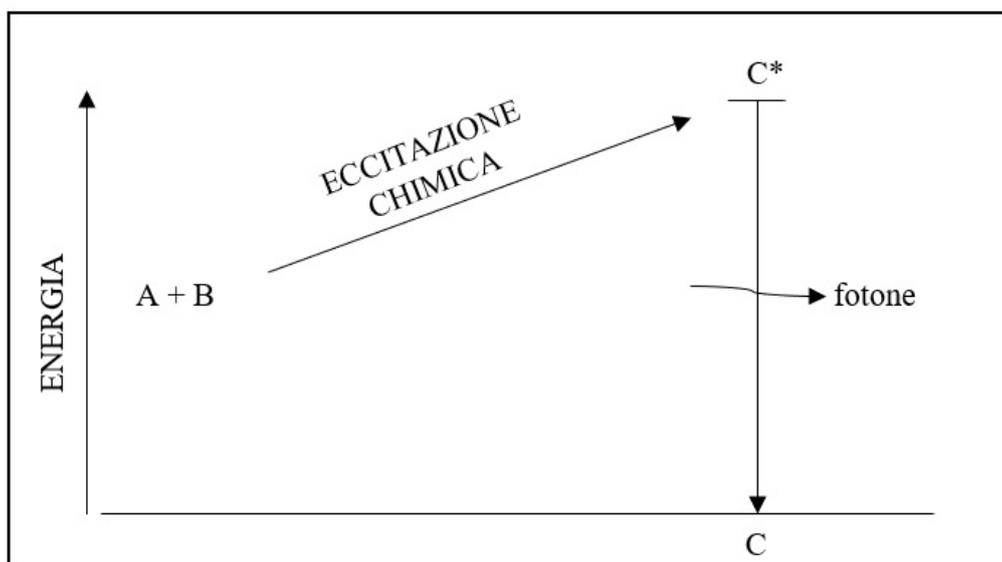


Figura 11. Schema del meccanismo di emissione luminosa in luminescenza. A, B: reagenti; C*: prodotto di reazione in uno stato elettronicamente eccitato; C: prodotto di reazione allo stato fondamentale.³³

Esistono due tipi di reazioni chemiluminescenti: diretta (o di tipo I) ed indiretta (o di tipo II).

Nelle reazioni di Tipo I la reazione genera la molecola primaria eccitata che è poi la responsabile dell'emissione luminosa. Nelle reazioni chemiluminescenti indirette il prodotto di reazione eccitato non è il reale emettitore di luce, ma trasferisce l'energia di attivazione ad un accettore che successivamente emette luce. (*P.Pinzani, 1993*)³³

I componenti utili alla realizzazione di reazioni chemiluminescenti efficienti sono:

1. I substrati chemiluminescenti: questi reagiscono o si dissociano per dare origine alla molecola nello stato elettronicamente eccitato, responsabile dell'emissione luminosa nelle reazioni di diretto o del trasferimento di energia in quelle indirette.
2. Un accettore di elettroni: utilizzato se si tratta di una reazione di ossidazione come nel caso della maggior parte delle reazioni bioluminescenti e chemiluminescenti.
3. Un catalizzatore: uno ione metallico o un enzima che agisce in modo da ridurre l'energia di attivazione e di conseguenza da aumentare la velocità di reazione.
4. Cofattori: impiegati al fine di convertire uno o più substrati volti alla rottura del legame che darà origine alla specie molecolare emittente, oppure per reagire o interagire con il catalizzatore.
5. Un accettore di energia o di elettroni: necessario se si tratta di una reazione indiretta.

Entrambi i tipi di reazioni chemiluminescenti sono rappresentate da parametri caratteristici: il colore, l'intensità, la velocità di inizio e di decadimento dell'intensità di luce ed infine la polarizzazione, se presente. L'andamento del segnale analitico prodotto dalle reazioni luminescenti è funzione del tempo. Il sistema luminescente adottato (luciferasi della lucciola, adamantil diossetanofosfatasi alcalina, H₂ O₂ - microperossidasi-

luminolo, esteri di acridinio, ecc.) e i parametri operativi prescelti (concentrazione dei reagenti, pH, temperatura, ecc.) agiscono sul segnale analitico dando luogo a cinetiche caratteristiche. Nel caso ad esempio della reazione bioluminescente fra ATP e luciferasi della lucciola condotta in condizioni ottimali, il segnale prodotto raggiunge rapidamente il massimo, mostrando quindi nel tempo un lievissimo decremento che ai fini analitici può essere trascurato. In tutti gli altri sistemi bio- e chemi-luminescenti, la durata dell'emissione luminosa è normalmente molto minore, almeno quando la reazione viene condotta nelle condizioni che garantiscono la massima sensibilità. Nonostante da un punto di vista teorico ogni sostanza organica ossidabile possa determinare una produzione fotonica, praticamente, invece, solo sostanze con un elevato FLC vengono definite "chemiluminescenti", tra queste, il luminolo e i suoi derivati, i diossetani, gli esteri di acridinio sono le più note.³³

Le ftalilidrazidi: Il luminolo e suoi derivati

Tra i composti chemiluminescenti che hanno trovato maggiore applicazione in campo analitico ci sono il luminolo e i suoi derivati. La molecola del luminolo è costituita da due anelli adiacenti: un anello aromatico che non subisce variazioni durante la reazione chemiluminescente e un anello eterociclico non aromatico che subisce un'ossidazione che implica la formazione di uno ione ftalato. Quest'ultimo, essendo in uno stato eccitato (tripletto), ritorna allo stato fondamentale (singoletto) e restituisce l'energia di reazione sottoforma di fotone, sottoforma di energia luminosa. L'enzima che catalizza le reazioni chemiluminescenti in cui viene utilizzato il luminolo è la perossidasi. Nei saggi immunochemiluminescenti viene maggiormente utilizzato un derivato del luminolo: l'isoluminolo. Esso si distingue dal luminolo per la presenza di un gruppo amminico in posizione 6 dell'anello aromatico, che invece il luminolo presenta in posizione 5. Legate a questo gruppo amminico è possibile riscontrare la presenza di catene alifatiche, possono dare origine a ponti di coniugazione di diversa lunghezza (aminici,

etilici, butilici, esilici). La principale molecola impiegata è l'aminobutil-etil-isoluminolo (ABEI).³⁴

I diossetani

Le molecole chemiluminescenti 1-2 diossetani subiscono una scissione in due frammenti carbonilici, uno dei quali è in stato eccitato. A seconda della natura del diossetano, l'eccitazione del frammento carbonilico può essere rappresentata da un singoletto o da un tripletto. Prevalentemente viene utilizzata la rimozione di un sostituente che provoca una redistribuzione a livello degli elettroni, come principale tipo di decomposizione degli 1-2 diossetani.³³ L'emissione chemiluminescente è dunque legata alla frammentazione che si verifica. I diossetani si scompongono termicamente, chimicamente o enzimaticamente in due frammenti carbonilici. Il meccanismo diradicale si verifica principalmente durante la scomposizione termica. La scomposizione enzimatica o chimica viene raggiunta attraverso un meccanismo di CIEEL (Chemically electron exchange luminescence) che prevede la rottura simultanea di due legami con conseguente redistribuzione degli elettroni e formazione dei due prodotti carbonilici.³⁵

Gli esteri di acridinio

Gli esteri di acridinio emettono luce blu e blu-verde, come il luminolo, ma diversamente da esso non necessitano di un catalizzatore per l'emissione luminosa. La reazione chemiluminescente è legata alla rottura coordinata di più legami con conseguente formazione di un diossetanone come intermedio chimico. Dalla sua decomposizione viene prodotto N-metil-acridone in uno stato eccitato singoletto, che tornando allo stato fondamentale emette fotoni a circa 430 nm. Alcuni esteri di acridinio sono in grado di produrre una luminescenza molto intensa, vengono quindi utilizzati in metodi immunochemiluminescenti automatizzati.³⁴

Il trisbipiridil-rutenio

Il rutenio è un composto luminescente molto utilizzato negli immunoassays. È una molecola che emette luce mediante una reazione di elettrochemiluminescenza, generata da una reazione con tripropilamina sulla

superficie di un elettrodo di platino. Durante la reazione vengono prodotti sali stabili che possono essere accoppiati a numerose molecole di interesse biologico: peptidi, apteni, acidi nucleici. In questo modo, è possibile allestire metodi immunologici che trovano applicazione nei sistemi analitici automatizzati.³⁴

Il segnale analitico

Una caratteristica fondamentale delle reazioni chemiluminescenti è rappresentata dal tipo di segnale prodotto. Il segnale si mantiene relativamente costante nel tempo solo nelle reazioni fluorescenti e radioluminescenti. In quelle chemiluminescenti, invece, il segnale prodotto è funzione della cinetica di reazione, ovvero un'emissione fotonica costante può venirsi a creare solo nel momento in cui la velocità di reazione si presenta costante (in reazioni definite "di ordine zero"). Questa situazione è riscontrabile solo in condizioni particolari, in caso di reazioni chemiluminescenti potenziate, in reazioni bioluminescenti, nel sistema 1,2 diossetani-fosfatasi alcalina.³³

Esistono diversi metodi volti alla quantizzazione del segnale conseguente una reazione chemiluminescente:

- TLP (Total Light Production): è relativo alla integrazione del segnale totale prodotto durante la reazione. Il valore è l'integrale totale tra il momento in cui inizia l'emissione di fotoni (t_0) e il momento di ritorno al valore del bianco (t_f). Uno svantaggio nell'utilizzo di questo metodo è legato alla presenza di un tempo di conteggio lungo, però, differentemente dagli altri metodi, è quello che meno risente delle variazioni relative alla cinetica della reazione e alla velocità di miscelazione dei reagenti. Inoltre, la misura della TLP è correlata all'efficienza quantica della reazione in maniera più coerente rispetto agli altri metodi.
- PLI (Peak Light Intensity): il valore in questione rappresenta il massimo valore di intensità luminosa che viene raggiunta durante la

reazione, è perciò indice della concentrazione della specie emittente. Nonostante la velocità con cui il PLI può essere misurato, il parametro in questione è soggetto all'influenza di diversi fattori, prima tra tutti la variazione relativa alla cinetica della reazione.

- DPI (Decay Portion Integration): questo metodo rappresenta un utile compromesso tra i metodi presentati precedentemente. Prevede infatti l'integrazione tra il t_0 e il t_{i+k} relativo al tratto discendente della curva di emissione. Infatti, il valore k è il tempo di integrazione prefissato, con durata variabile, tra i 10 e i 30 secondi.³³

Analisi della cinetica delle reazioni chemiluminescenti

I metodi di analisi quantitativa fino ad ora descritti non prendono in considerazione la forma della cinetica della reazione chemiluminescente. Infatti, possono essere presenti diverse sostanze interferenti responsabili di una variazione non solo relativa all'efficienza luminosa, ma anche alla cinetica stessa della reazione. Per ogni reazione chemiluminescente dovrebbero essere considerati due parametri, uno che tiene conto dell'emissione luminosa e l'altro come indice di forma della cinetica, in modo da evidenziare modificazioni nell'andamento della cinetica e conseguentemente possibili interferenze all'efficienza della produzione luminosa della reazione chemiluminescente. Dunque, studi sulle interferenze legate alle caratteristiche dei campioni biologici hanno rilevato che plasma e urine interferiscono con le reazioni chemiluminescenti. L'interferenza in questione non solo è legata all'attività del tracciante chemiluminescente, ma anche alla misura del bianco, ma con effetti opposti. L'aumento dell'emissione luminosa del bianco è infatti legato ad un aumento degli interferenti. Contrariamente, la misura del tracciante risulta interferita. Solo utilizzando idonei sistemi di separazione in fase solida è possibile eliminare le interferenze in questione. Il metodo di dosaggio chemiluminescente può essere ritenuto di maggiore affidabilità se oltre all'emissione luminosa, si tiene in considerazione la forma della cinetica della reazione

chemiluminescente. Infatti, quest'ultima riflette l'efficienza della reazione in esame.³³

L'automazione nei dosaggi immunochemiluminescenti commerciali

L'elemento essenziale che costituisce i sistemi automatici per i dosaggi in immunochemiluminescenza è il luminometro automatico, in cui ritroviamo le seguenti componenti: camera porta-campione, dispensatore automatico, rivelatore ottico, sistema di campionamento.

Un chemiluminometro può essere definito sensibile e flessibile in relazione alle caratteristiche delle cinque unità da cui è composto:

1. la camera di reazione con annesso sistema di iniezione;
2. il monocromatore (se presente);
3. un rivelatore, volto alla trasformazione del segnale luminoso in corrente elettrica;
4. un amplificatore del segnale;
5. un registratore e un processore dei dati (o integratore).³³

I metodi commerciali presenti in commercio sono: metodi omogenei; metodi eterogenei. Il Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay (LOCI) è l'unico metodo omogeneo disponibile oggi. È basato sull'utilizzo di particelle di lattice, sistema biotina-streptavidina, traccianti ftalocianina-ossigeno singoletto-olefina-diossetano. I metodi di chemiluminescenza diretta e indiretta fanno parte dei metodi eterogenei: la chemiluminescenza diretta può essere di tipo competitivo (CLIA) o non competitivo (ICMA), basate entrambe sull'utilizzo di un marcatore luminofo, quindi esteri di acridinio e il rutenio; allo stesso modo, anche la chemiluminescenza indiretta può essere di tipo competitivo (CLEIA) o non competitiva (ICEMA), basate entrambe sull'utilizzo di un marcatore enzimatico, fosfatasi alcalina con substrato fosfato (AMPPD) e la perossidasi di rafano con substrato luminolo o derivati del luminolo (ABEI).³⁴

L'entità della luce trasmessa da parte di una reazione chemiluminescente può essere espressa in tre modi: luce emessa da una sorgente, emissione totale in tutte le direzioni, luce incidente su una superficie ad una determinata distanza dalla fonte di luce. Il chemiluminometro si basa essenzialmente su questa ultima modalità ed è legato all'esecuzione della reazione nel tempo, alla polarizzazione e allo spettro.³³

iFlash 1800 – Pantec



Figura 12. Strumento iFlash 1800 – Pantec.

Pantec – iFlash 1800 e gli esteri di acridinio

Il dosaggio iFlash-SARS-Cov-2 IgG è un dosaggio immunometrico indiretto a 2 fasi. Viene eseguita una prima incubazione in cui le IgG anti-SARS-CoV-2 nel campione e le microparticelle paramagnetiche rivestite di antigene SARS-CoV-2 reagiscono per formare un complesso. La prima incubazione è seguita da un lavaggio: i materiali in eccesso vengono lavati via dalla fase solida in un campo magnetico. Nella seconda incubazione, il coniugato di IgG anti-umano marcato con estere di acridinio viene aggiunto per formare una miscela di reazione. A seguito di un lavaggio, le soluzioni Pre-Trigger e Trigger vengono aggiunte alla miscela di reazione. La risultante reazione chemiluminescente viene misurata come unità di luce relativa (RLUs). I risultati vengono determinati comparando le RLUs rilevate dal sistema ottico dello strumento con un valore cut-off calcolato dai calibratori per SARS-

CoV-2 IgG. Il cutoff è pari a 10 AU/ml. I risultati vengono interpretati nel modo seguente:

AU/ml	Interpretazione
< 10	Non reattivo
≥ 10	Reattivo

Reagenti

- SARS-CoV-2 IgG: Il dosaggio iFlash-SARS-CoV-2 IgG è un dosaggio immunometrico chemiluminescente a particelle paramagnetiche (CLIA) per la determinazione semiquantitativa dell'anticorpo IgG per SARS-CoV-2 nel siero umano e/o plasma utilizzando l'analizzatore di dosaggi immunometrici iFlash. Il test iFlash-SARS-CoV-2 IgG aiuta nella diagnosi di infezione da SARS-CoV-2 e nella determinazione dell'immunità.
- Controlli IgG 2019-nCoV: I Controlli IgG 2019-nCoV sono forniti liofilizzati. L'intervallo di concentrazione di ciascun controllo indica i limiti dei valori di controllo che possono essere ottenuti in sedute analitiche attendibili. Il controllo viene utilizzato per verificare l'affidabilità del dosaggio IgG 2019nCoV. I flaconi di controllo IgG 2019-nCoV devono essere conservati chiusi in posizione verticale a 2-8 °C. I componenti principali del controllo sono prodotti liofilizzati con diverse concentrazioni di anticorpo chimerico anti-IgG 2019-nCoV e la sua matrice in tampone tris.
- Tampone di lavaggio: Tampone di lavaggio concentrato, diluito con acqua purificata in rapporto 1:9. Viene utilizzato per pulire il sistema di tubazioni.
- Soluzione Pre-Trigger: Soluzione di Perossido di idrogeno.
- Soluzione Trigger: Soluzione di Idrossido di sodio.³⁶

Liaison XI – Diasorin



Figura 13. Strumento Liaison XI – Diasorin.

Diasorin – Liaison XI e l'isoluminolo

Il metodo per la determinazione quantitativa di anticorpi IgG specifici anti-S1 e anti-S2 diretti contro il SARS-CoV-2 è un test indiretto basato sul principio della chemiluminescenza (CLIA). Gli antigeni specifici ricombinati S1 e S2 sono utilizzati per rivestire le particelle magnetiche (fase solida). Anticorpi monoclonali di topo anti-IgG umane sono legati a un derivato dell'isoluminolo (coniugato anticorpo-isoluminolo). Gli anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 presenti nei calibratori, nei campioni o nei controlli, durante la prima incubazione, si legano alla fase solida attraverso gli antigeni ricombinati S1 e S2. Durante la seconda incubazione, l'anticorpo coniugato reagisce con le IgG anti-SARS-CoV-2 già legate alla fase solida. Dopo ogni incubazione, il materiale non legato viene eliminato attraverso un ciclo di lavaggio. In seguito, vengono aggiunti i reagenti starter che inducono una reazione di chemiluminescenza con andamento di tipo "flash". La quantità di coniugato anticorpo-isoluminolo, rappresentata da un segnale luminoso, viene misurata da un fotomoltiplicatore in Unità Relative di Luce (RLU, Relative light unit) ed è indicativo della concentrazione di IgG anti-SARS-CoV-2 presente nei calibratori, nei campioni o nei controlli. L'analizzatore calcola automaticamente le concentrazioni di anticorpi IgG anti-SARS-CoV-

2 espresse in unità arbitrarie (AU/ml) e classifica i risultati. I campioni contenenti concentrazioni di anticorpo superiori all'intervallo di dosaggio possono essere pre-diluiti utilizzando la funzione "Diluente" dello strumento e ri-dosati (il fattore di diluizione consigliato è 1:10). I risultati verranno moltiplicati automaticamente per il fattore di diluizione ottenendo così il livello anticorpale dei campioni non diluiti. I risultati dei campioni devono essere interpretati nel modo seguente:

Test LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG		
AU/ml	Risultati	Interpretazione
< 12.0	Negativo	Un risultato negativo indica l'assenza o un livello molto basso di anticorpi IgG diretti contro il virus. Il test potrebbe fornire un risultato negativo nei pazienti infetti se eseguito durante il periodo di incubazione e negli stadi precoci della malattia.
$12.0 \leq x \leq 15.0$	Dubbio	I campioni che ottengono almeno 2 risultati su 3 uguali o superiori a 15.0 AU/ml devono essere classificati positivi. I campioni che ottengono almeno 2 risultati su 3 inferiori a 12.0 AU/ml devono essere classificati negativi.
≥ 15.0	Positivo	Un risultato positivo indica l'esposizione del soggetto al patogeno.

Reagenti

- Particelle magnetiche: particelle magnetiche rivestite con antigeni ricombinanti biotinilati S1 e S2 (ottenuti in cellule di mammifero), BSA (sieroalbumina bovina) biotinilata, streptavidina, BSA, tampone fosfato, < 0.1% sodio azide. Le particelle magnetiche devono essere completamente risospese.
- Calibratore 1: Siero/plasma umano contenente bassi livelli di IgG anti-SARS-CoV-2, stabilizzato in tampone TRIS, 0.2% ProClin® 300,

conservanti e un colorante giallo inerte. Le concentrazioni dei calibratori (AU/ml) sono tarate contro una preparazione anticorpale realizzata internamente.

- Calibratore 2: Siero/plasma umano contenente alti livelli di IgG anti-SARS-CoV-2, stabilizzato in tampone TRIS, 0.2% ProClin® 300, conservanti. Le concentrazioni dei calibratori (AU/ml) sono tarate contro una preparazione anticorpale realizzata internamente.
- Diluente dei campioni: BSA, tampone fosfato, detergente, EDTA, 0.2% ProClin® 300, siero ovino, conservanti.
- Coniugato: IgG monoclonali di topo anti IgG umane coniugati con un derivato dell'isoluminolo, BSA, tampone fosfato, 0.2% ProClin® 300, conservanti e un colorante blu inerte.³⁷

Cobas e 411 – Roche



Figura 14. Strumento Cobas e411 – Roche.

Roche – Cobas e411 e il trisbipiridil-rutenio

Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 è un test immunologico per la rilevazione qualitativa in vitro di anticorpi nel siero e nel plasma. Il test, basato su un formato sandwich a doppio antigene in soluzione, è in grado di rilevare anticorpi contro il nuovo coronavirus che causa COVID-19. La durata

complessiva del test è di 18 minuti e prevede una prima incubazione in cui l'antigene ricombinante biotinilato specifico del SARS-CoV-2 e l'antigene ricombinante specifico del SARS-CoV-2, marcato con un complesso di rutenio, formano un complesso sandwich. Viene quindi eseguita una seconda incubazione in cui, dopo l'aggiunta di microparticelle rivestite di streptavidina, il complesso si lega alla fase solida mediante l'interazione biotina-streptavidina. La miscela di reazione viene aspirata nella cella di misura dove le micro-particelle vengono attratte magneticamente alla superficie dell'elettrodo. Successivamente si eliminano le sostanze non legate impiegando ProCell/ProCell M, una soluzione di sistema utilizzata per il trasporto della miscela di reazione del test alla cella di misurazione e per la generazione del segnale di elettrochemiluminescenza. Applicando una tensione all'elettrodo, si induce l'emissione chemiluminescente che viene misurata mediante il fotomoltiplicatore. I risultati vengono calcolati automaticamente dal software, confrontando il segnale elettrochemiluminescente proveniente dal prodotto di reazione del campione con l'indice di cutoff (ICO), ottenuto precedentemente mediante calibrazione. I risultati ottenuti con il test in questione vengono interpretati nel modo seguente:

Risultato numerico	Risultato	Interpretazione
ICO < 1.0	Non reattivo	Negativo per anticorpi anti-SARS-CoV-2
ICO ≥ 1.0	Reattivo	Positivo per anticorpi anti-SARS-CoV-2

Reagenti

- Microparticelle: rivestite di streptavidina.
- Antigene del SARS-CoV-2 – biotina: antigene ricombinante biotinilato specifico del SARS-CoV-2 (E.coli); conservante.
- Antigene del SARS-CoV-2 ~ Ru(bpy)₃²⁺: antigene ricombinante specifico del SARS-CoV-2, marcato con un complesso di rutenio; conservante.

- Calibratore negativo (ACOV2 Cal1): siero umano non reattivo per gli anticorpi anti-SARS-CoV-2; tampone; conservante.
- Calibratore positivo (ACOV2 Cal2): siero umano reattivo per gli anticorpi anti-SARS-CoV-2; tampone; conservante.³⁸

Architect i2000 – Abbott



Figura 15. Strumento Architect i2000 – Abbott.

Abbott – Architect e gli esteri di acridinio

Si tratta di un dosaggio immunologico automatizzato a due fasi volto alla rilevazione qualitativa degli anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 in campioni di siero e plasma umano che utilizza la tecnologia immunologica chemiluminescente a cattura di microparticelle (CMIA). Il campione, le microparticelle paramagnetiche rivestite di antigene SARS-CoV-2 e il diluente del dosaggio vengono dispensati insieme e incubati. Gli anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 eventualmente presenti nel campione si legano alle microparticelle rivestite di antigeni SARS-CoV-2. A seguito di una fase di lavaggio, viene aggiunto il coniugato di anticorpi anti-IgG umane marcato con acridinio per dare luogo a una miscela di reazione che viene incubata. Viene eseguito un ulteriore lavaggio terminato il quale si aggiungono le soluzioni pre-trigger e trigger. La reazione chemiluminescente che ne deriva

viene misurata in unità di luce relativa (RLU). Esiste un legame diretto tra la quantità di anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 nel campione e le RLU misurate dal sistema ottico. La presenza o assenza di anticorpi IGG anti-SARS-CoV-2 nel campione viene determinata confrontando le RLU chemiluminescenti nella reazione con le RLU del calibratore. I risultati vengono riportati dividendo il risultato del campione per il risultato memorizzato del calibratore. L'unità di misura standard dei risultati del dosaggio SARS-CoV-2 IgG è Index (S/C). Il cutoff è 1.4 Index (S/C).

Index (S/C)	Interpretazione
< 1.4	Negativi
≥ 1.4	Positivi

Reagenti

- **Microparticelle:** microparticelle rivestite di antigeni ricombinanti SARS-CoV-2 purificati in tampone TRIS con tensioattivo.
- **Coniugato:** Coniugato di anticorpi (monoclonali di topo) anti-IgG umane, marcato con acridinio in tampone MES con tensioattivo e stabilizzante delle proteine (bovine).
- **Assay Diluent:** Tampone TRIS e detergente.
- **SARS-CoV-2 IgG Control Kit:** Il SARS-CoV-2 IgG Control Kit viene utilizzato per la valutazione della precisione del dosaggio e per la rilevazione di deviazioni analitiche sistematiche dell'Architect i System nella rilevazione qualitativa degli anticorpi IgG contro SARS-CoV-2 in campioni di siero e plasma umano.
 - **Controllo negativo:** contiene plasma umano.
 - **Controllo positivo:** contiene materiale umano emoderivato, inattivato, privo di cellule.
- **SARS-CoV-2 IgG Calibrator Kit:** il SARS-CoV-2 IgG Calibrator Kit viene utilizzato per la calibrazione dell'Architect i System nella

rilevazione qualitativa degli anticorpi IgG contro il SARS-CoV-2 in campioni di siero e plasma umano.³⁹

4. Analisi dei dati

I test sono stati eseguiti su 195 campioni raccolti nel periodo compreso tra maggio e agosto, selezionati per la ricerca di IgG contro SARS-CoV-2. Le provette, contenenti sangue intero, da 6 ml da sierologia, sterili, di materiale plastico, prive di anticoagulante e marcate CE IVD giunte in laboratorio, sono state centrifugate per 10 minuti a 3500 giri quindi il siero da esse separato è stato esaminato, aliquotato e successivamente congelato.⁴⁰

<i>PAZIENTI</i>	<i>PANTEC</i> <i>IgG SARS-CoV-2</i> <i>S/CO</i>	<i>DIASORIN</i> <i>IgG SARS-CoV-2</i> <i>AU/ml</i>	<i>ROCHE</i> <i>IgG SARS-CoV-2</i> <i>S/CO</i>	<i>ABBOTT</i> <i>IgG SARS-CoV-2</i> <i>S/CO</i>
<i>1</i>	<i>135.98</i>	<i>213</i>	<i>102.8</i>	<i>8.01</i>
<i>2</i>	<i>89.67</i>	<i>45.9</i>	<i>110.9</i>	<i>3.01</i>
<i>3</i>	<i>83.53</i>	<i>75.4</i>	<i>76.38</i>	<i>2.79</i>
<i>4</i>	<i>79.31</i>	<i>115</i>	<i>57.54</i>	<i>3.27</i>
<i>5</i>	<i>74.73</i>	<i>36</i>	<i>80.27</i>	<i>5.07</i>
<i>6</i>	<i>62.53</i>	<i>41.4</i>	<i>41.62</i>	<i>3.63</i>
<i>7</i>	<i>66.31</i>	<i>58.3</i>	<i>34.45</i>	<i>5.01</i>
<i>8</i>	<i>69.54</i>	<i>12.1</i>	<i>48.47</i>	<i>2.59</i>
<i>9</i>	<i>114.23</i>	<i>47.3</i>	<i>104.8</i>	<i>7.01</i>
<i>10</i>	<i>21.36</i>	<i>15.9</i>	<i>11.39</i>	<i>1.22</i>
<i>11</i>	<i>89.82</i>	<i>207</i>	<i>56.29</i>	<i>8.15</i>
<i>12</i>	<i>86.64</i>	<i>111</i>	<i>58.61</i>	<i>4.57</i>
<i>13</i>	<i>100.03</i>	<i>117</i>	<i>66.32</i>	<i>5.44</i>
<i>14</i>	<i>79.95</i>	<i>21.3</i>	<i>43.18</i>	<i>6.51</i>
<i>15</i>	<i>92.47</i>	<i>88.1</i>	<i>102</i>	<i>6.04</i>
<i>16</i>	<i>87.79</i>	<i>44.3</i>	<i>89.27</i>	<i>4.64</i>
<i>17</i>	<i>99.41</i>	<i>51.4</i>	<i>92.72</i>	<i>6.38</i>
<i>18</i>	<i>47.14</i>	<i>175</i>	<i>100.1</i>	<i>8.76</i>
<i>19</i>	<i>69.28</i>	<i>19.9</i>	<i>94.49</i>	<i>5.33</i>
<i>20</i>	<i>38.54</i>	<i>38.5</i>	<i>23</i>	<i>3.19</i>
<i>21</i>	<i>99.4</i>	<i>91.5</i>	<i>99.88</i>	<i>5.33</i>

22	<i>41.7</i>	<i>8.04</i>	<i>29.96</i>	<i>1.75</i>
23	<i>69.62</i>	<i>11.9</i>	<i>142.1</i>	<i>3.25</i>
24	<i>63.56</i>	<i>83.5</i>	<i>78.54</i>	<i>4.37</i>
25	<i>28.99</i>	<i>19.3</i>	<i>22.02</i>	<i>1.37</i>
26	<i>92.49</i>	<i>57.2</i>	<i>86.26</i>	<i>5.19</i>
27	<i>59.41</i>	<i>26.7</i>	<i>54.62</i>	<i>2.52</i>
28	<i>96.82</i>	<i>78.1</i>	<i>123.8</i>	<i>4</i>
29	<i>92.28</i>	<i>135</i>	<i>56.38</i>	<i>4.34</i>
30	<i>68.2</i>	<i>8.64</i>	<i>45.74</i>	<i>1.48</i>
31	<i>40.28</i>	<i>71.7</i>	<i>54.11</i>	<i>3.37</i>
32	<i>67.34</i>	<i>45.3</i>	<i>113</i>	<i>4.9</i>
33	<i>31.63</i>	<i>12.3</i>	<i>36.64</i>	<i>2.08</i>
34	<i>67.02</i>	<i>40.7</i>	<i>40.48</i>	<i>1.15</i>
35	<i>17.96</i>	<i>29.8</i>	<i>25.92</i>	<i>1.16</i>
36	<i>38.81</i>	<i>6.65</i>	<i>79.75</i>	<i>3.98</i>
37	<i>52.39</i>	<i>135</i>	<i>30.54</i>	<i>5.77</i>
38	<i>79.75</i>	<i>70.5</i>	<i>108.4</i>	<i>5.18</i>
39	<i>73.6</i>	<i>6.04</i>	<i>95.03</i>	<i>4.29</i>
40	<i>46.87</i>	<i>46.3</i>	<i>20.57</i>	<i>1.87</i>
41	<i>106.93</i>	<i>49.6</i>	<i>125.3</i>	<i>5.22</i>
42	<i>18.51</i>	<i>8.08</i>	<i>39.91</i>	<i>1.11</i>
43	<i>24.95</i>	<i>17.2</i>	<i>35.7</i>	<i>1.48</i>
44	<i>7.73</i>	<i>5.89</i>	<i>13.67</i>	<i>0.78</i>
45	<i>89.11</i>	<i>45.8</i>	<i>95.79</i>	<i>9.08</i>
46	<i>71.37</i>	<i>70.7</i>	<i>8.56</i>	<i>1.25</i>
47	<i>25.72</i>	<i>35.4</i>	<i>13.17</i>	<i>2.68</i>
48	<i>90.25</i>	<i>78.7</i>	<i>38.38</i>	<i>6.77</i>
49	<i>57.56</i>	<i>37.6</i>	<i>45.85</i>	<i>3.57</i>
50	<i>102.78</i>	<i>123</i>	<i>51.22</i>	<i>5.33</i>
51	<i>63.94</i>	<i>105</i>	<i>120.6</i>	<i>5.52</i>

52	<i>11.51</i>	<i>32.8</i>	<i>3.74</i>	<i>0.61</i>
53	<i>120.4</i>	<i>59.2</i>	<i>113.9</i>	<i>6.14</i>
54	<i>72.81</i>	<i>72.4</i>	<i>60.43</i>	<i>4.47</i>
55	<i>136.81</i>	<i>26.3</i>	<i>84.55</i>	<i>7.24</i>
56	<i>22.18</i>	<i>13.5</i>	<i>50.12</i>	<i>1.77</i>
57	<i>115.91</i>	<i>85.3</i>	<i>109.8</i>	<i>5.6</i>
58	<i>79.19</i>	<i>17.7</i>	<i>68.82</i>	<i>5.21</i>
59	<i>66.97</i>	<i>6.02</i>	<i>37.37</i>	<i>2.24</i>
60	<i>9.12</i>	<i>28.2</i>	<i>19.05</i>	<i>0.76</i>
61	<i>152.43</i>	<i>124</i>	<i>74.1</i>	<i>8.91</i>
62	<i>129.05</i>	<i>161</i>	<i>87.04</i>	<i>9.4</i>
63	<i>49.22</i>	<i>34.3</i>	<i>36.4</i>	<i>1</i>
64	<i>92.15</i>	<i>83.4</i>	<i>94.07</i>	<i>6.8</i>
65	<i>51.65</i>	<i>89.6</i>	<i>52.77</i>	<i>1.79</i>
66	<i>68.85</i>	<i>68.02</i>	<i>90.89</i>	<i>4.12</i>
67	<i>46.74</i>	<i>20.7</i>	<i>40.11</i>	<i>4.54</i>
68	<i>124.78</i>	<i>25.8</i>	<i>113.3</i>	<i>5.94</i>
69	<i>53.35</i>	<i>92.3</i>	<i>14.85</i>	<i>0.89</i>
70	<i>53.62</i>	<i>5.7</i>	<i>98.18</i>	<i>3.48</i>
71	<i>102.41</i>	<i>171</i>	<i>109.3</i>	<i>4.12</i>
72	<i>103.12</i>	<i>148</i>	<i>92.49</i>	<i>7.17</i>
73	<i>105.35</i>	<i>37.3</i>	<i>106.1</i>	<i>4.94</i>
74	<i>16.81</i>	<i>32.9</i>	<i>6.04</i>	<i>0.31</i>
75	<i>7.91</i>	<i><3.8</i>	<i>0.083</i>	<i>0.89</i>
76	<i>71.47</i>	<i>30.1</i>	<i>55.79</i>	<i>2.01</i>
77	<i>20.1</i>	<i>46.96</i>	<i>27</i>	<i>2.5</i>
78	<i>90.6</i>	<i>139</i>	<i>51.09</i>	<i>3.33</i>
79	<i>39.19</i>	<i>33.4</i>	<i>11.3</i>	<i>0.84</i>
80	<i>0.6</i>	<i><3.8</i>	<i>0.071</i>	<i>0.03</i>
81	<i>66.8</i>	<i>4.07</i>	<i>118.4</i>	<i>2.13</i>

82	<i>65.02</i>	<i>126</i>	<i>9.95</i>	<i>2.68</i>
83	<i>86.18</i>	<i>204</i>	<i>96.49</i>	<i>7.12</i>
84	<i>110.85</i>	<i>29</i>	<i>108.1</i>	<i>4.84</i>
85	<i>63.15</i>	<i>43.7</i>	<i>42.97</i>	<i>1.12</i>
86	<i>86.36</i>	<i>63.7</i>	<i>121.8</i>	<i>5.55</i>
87	<i>87.99</i>	<i>111</i>	<i>84.59</i>	<i>5.56</i>
88	<i>73.64</i>	<i>161</i>	<i>54.72</i>	<i>9.72</i>
89	<i>61.91</i>	<i>64.1</i>	<i>76.06</i>	<i>3.7</i>
90	<i>81.65</i>	<i>50.3</i>	<i>58.72</i>	<i>4.5</i>
91	<i>0.22</i>	<i><3.8</i>	<i>0.073</i>	<i>0.01</i>
92	<i>85.15</i>	<i>81.4</i>	<i>142</i>	<i>3.7</i>
93	<i>27.31</i>	<i>16.8</i>	<i>14.74</i>	<i>0.84</i>
94	<i>63.77</i>	<i>42</i>	<i>77.85</i>	<i>1.65</i>
95	<i>75.99</i>	<i>113</i>	<i>95.66</i>	<i>9.37</i>
96	<i>0.35</i>	<i>98.8</i>	<i>0.071</i>	<i>0.02</i>
97	<i>109.42</i>	<i>126</i>	<i>96.14</i>	<i>4.56</i>
98	<i>61.8</i>	<i>95.3</i>	<i>107.7</i>	<i>6.26</i>
99	<i>64.99</i>	<i>54.1</i>	<i>95.99</i>	<i>5.41</i>
100	<i>12.27</i>	<i>24.3</i>	<i>6.59</i>	<i>0.49</i>
101	<i>80.65</i>	<i>77.6</i>	<i>113.3</i>	<i>8.48</i>
102	<i>67.64</i>	<i>51.2</i>	<i>51.99</i>	<i>2.55</i>
103	<i>111.93</i>	<i>103</i>	<i>105.2</i>	<i>3.08</i>
104	<i>0.75</i>	<i>4.76</i>	<i>0.081</i>	<i>0.16</i>
105	<i>0.19</i>	<i>6.8</i>	<i>0.073</i>	<i>0.02</i>
106	<i>25.6</i>	<i>7.86</i>	<i>14.24</i>	<i>1.13</i>
107	<i>74.48</i>	<i>37.5</i>	<i>97.86</i>	<i>2.51</i>
108	<i>37.07</i>	<i>33.4</i>	<i>32.91</i>	<i>1.61</i>
109	<i>9.65</i>	<i>14.2</i>	<i>8.41</i>	<i>0.51</i>
110	<i>91.23</i>	<i>76.7</i>	<i>130.5</i>	<i>3.28</i>
111	<i>0.13</i>	<i><3.8</i>	<i>0.07</i>	<i>0.01</i>

112	115.58	268	90.03	6.28
113	97.73	91.6	138	4.85
114	17.26	46.2	8.51	1.44
115	95.84	109	88.8	7.85
116	75.05	55.3	82.08	4.2
117	53.09	42.1	58.11	3.13
118	71.27	53.8	60.66	4.39
119	90.46	146	101.4	7.55
120	28.49	46.8	24.31	1.27
121	122.15	111	114.6	6.26
122	38.27	132	40.47	1.42
123	45.06	46.6	59.92	2.63
124	42.31	83.8	25.35	1.21
125	108.42	130	65.76	3.98
126	77.67	54.7	81.55	3.17
127	95.96	55.9	7.36	4.9
128	17.84	23.7	23.38	0.54
129	108.75	206	67.08	7.55
130	3.69	10.7	0.501	0.15
131	68.29	42.4	79.28	4.03
132	14.54	51.6	27.82	1.15
133	46.99	53.7	58.72	3.46
134	86.9	129	102.9	9
135	39.53	36.8	44.45	2.85
136	0.28	3.97	0.074	0.04
137	136.92	48	111	3.47
138	159.79	89.9	115.1	5.68
139	44.3	20.4	9.06	2.22
140	31.93	37.4	26.03	1.25
141	113.27	144	67.76	3.64

142	<i>0.41</i>	<i><3.8</i>	<i>0.077</i>	<i>0.02</i>
143	<i>144.71</i>	<i>115</i>	<i>143.9</i>	<i>5.26</i>
144	<i>48.01</i>	<i>37.9</i>	<i>45.24</i>	<i>2.03</i>
145	<i>9.41</i>	<i>29.9</i>	<i>3.9</i>	<i>3.71</i>
146	<i>108.22</i>	<i>44.2</i>	<i>69.82</i>	<i>1.91</i>
147	<i>11.38</i>	<i>41.3</i>	<i>7.2</i>	<i>0.38</i>
148	<i>36.93</i>	<i>25.5</i>	<i>35.7</i>	<i>0.7</i>
149	<i>39.01</i>	<i>18.9</i>	<i>77.79</i>	<i>0.82</i>
150	<i>0.16</i>	<i>6.45</i>	<i>0.072</i>	<i>0.01</i>
151	<i>9.06</i>	<i>15.2</i>	<i>10.82</i>	<i>0.32</i>
152	<i>121.57</i>	<i>106</i>	<i>48.84</i>	<i>9.73</i>
153	<i>34.8</i>	<i>41.9</i>	<i>124.7</i>	<i>4</i>
154	<i>31.15</i>	<i>119</i>	<i>28.42</i>	<i>0.71</i>
155	<i>0.18</i>	<i><3.80</i>	<i>0.075</i>	<i>0.03</i>
156	<i>26.61</i>	<i>7.79</i>	<i>34.27</i>	<i>0.26</i>
157	<i>188.49</i>	<i>34.4</i>	<i>17.82</i>	<i>4.03</i>
158	<i>149.58</i>	<i>29.6</i>	<i>101.6</i>	<i>5.32</i>
159	<i>150</i>	<i>63.8</i>	<i>81.52</i>	<i>7.7</i>
160	<i>8.46</i>	<i>10.8</i>	<i>10.53</i>	<i>0.37</i>
161	<i>166.44</i>	<i>60.5</i>	<i>60.4</i>	<i>9.61</i>
162	<i>124.48</i>	<i>133</i>	<i>114</i>	<i>6.35</i>
163	<i>106.53</i>	<i>31.1</i>	<i>133.7</i>	<i>2.05</i>
164	<i>32.27</i>	<i>4.83</i>	<i>4.91</i>	<i>0.46</i>
165	<i>65.92</i>	<i>48.6</i>	<i>76.05</i>	<i>2.57</i>
166	<i>70.19</i>	<i>20.3</i>	<i>113.8</i>	<i>1.38</i>
167	<i>101.99</i>	<i>15</i>	<i>34.37</i>	<i>0.99</i>
168	<i>40.47</i>	<i>27.2</i>	<i>17.23</i>	<i>1.72</i>
169	<i>165.27</i>	<i>130</i>	<i>72.37</i>	<i>6.96</i>
170	<i>58.29</i>	<i>21.7</i>	<i>11.19</i>	<i>2.08</i>
171	<i>79.97</i>	<i>62.6</i>	<i>113.2</i>	<i>2.35</i>

172	79.8	82.4	35.05	1.9
173	163.07	96.9	115	6.05
174	5.76	6.33	2.32	0.24
175	63.49	134	35.17	1.45
176	106.32	20.1	92.84	2.78
177	43.38	22.4	59.7	0.44
178	36.4	52	83	0.58
179	24.46	12.1	31.09	1.62
180	43.76	16.4	96.67	1.59
181	50.36	97.3	42.1	1.81
182	10.89	10.5	8.94	0.48
183	11.59	24.1	16.77	0.45
184	70.02	61.3	85.04	1.29
185	59.44	91.6	77.76	1.86
186	129.26	206	134.8	3.93
187	21.36	15.6	22.41	0.48
188	70.94	39.3	103.9	2.95
189	18.88	36.2	13.55	0.58
190	10.43	36.5	8.81	0.19
191	7.59	9.28	5.8	0.19
192	21.27	20.1	53.31	0.88
193	19.6	72.1	23.46	1.13
194	151.05	145	97.62	7.66
195	27.19	21	56.01	0.93

I dati precedentemente riportati sono stati analizzati con la funzione *Correlazione* presente nell'estensione Analisi dei dati di Excel. L'indagine è stata eseguita confrontando i valori ottenuti dall'analisi dei campioni processati con ognuno dei quattro strumenti sopraccitati. Per stabilire la relazione tra le variabili considerate a coppie, da un punto di vista pratico, è stato considerato l'indice R (coefficiente di correlazione

lineare del Pearson) che quantifica il verso (concorde o discorde) ed il grado della relazione tra due variabili quantitative indipendenti. Per quanto il coefficiente di correlazione sia più vicino a + 1 o -1, indica una correlazione positiva (+ 1) o negativa (-1). Una correlazione positiva significa che l'aumentare dei valori di una variabile è seguito anche dall'altra. Un coefficiente di correlazione più vicino a 0 indica un'assenza di correlazione o una correlazione debole.

Graficamente, la correlazione tra variabili può essere rappresentata mediante un grafico a dispersione. Attraverso il diagramma di dispersione possiamo avere un'idea della forma, della relazione e dell'intensità della relazione tra le variabili. Possono anche essere messe in evidenza deviazioni dovute a dati anomali, cioè a specifici valori che si allontanano dallo schema generale. La forma della relazione tra le variabili è definita dalla disposizione dei punti nello spazio. L'intensità della relazione è determinata da quanto i punti si dispongono lungo una curva di forma definita. La relazione lineare è forte se i punti sono vicini ad una retta; è debole se sono dispersi attorno alla retta. La relazione lineare può essere definita decrescente, qualora la retta abbia pendenza negativa; crescente, se la retta presenta una pendenza positiva.

Di seguito vengono riportati i risultati dell'analisi con i relativi commenti.

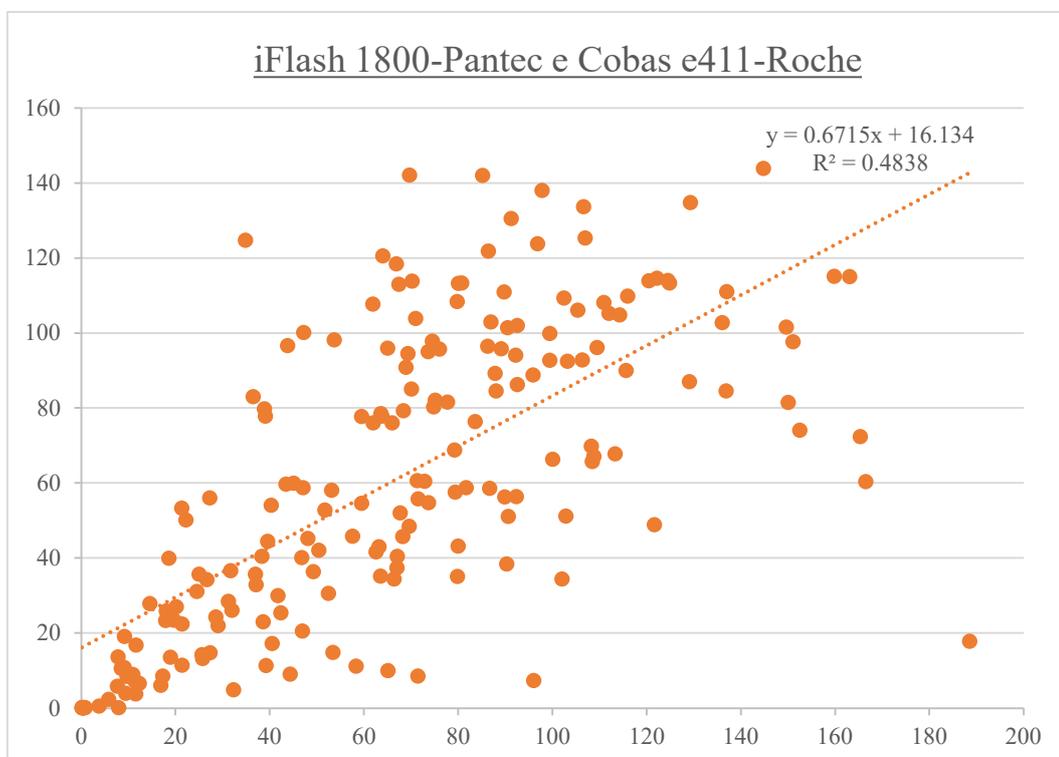
Analisi iFlash 1800 – Pantec e Cobas e411 – Roche

L'indice di correlazione tra queste due matrici è pari a 0.696.

	iFlash 1800	Cobas e411
iFlash 1800	1	
Cobas e411	0.695535	1

Essendo tale valore positivo, è possibile affermare che è presente una correlazione positiva tra i valori misurati con lo strumento iFlash 1800 – Pantec e quelli ottenuti attraverso lo strumento Cobas e411 – Roche. La relazione lineare può essere considerata mediamente forte, non tutti i punti si presentano adiacenti alla retta di regressione.

Graficamente, la relazione tra le due variabili è rappresentabile con il seguente diagramma a dispersione:



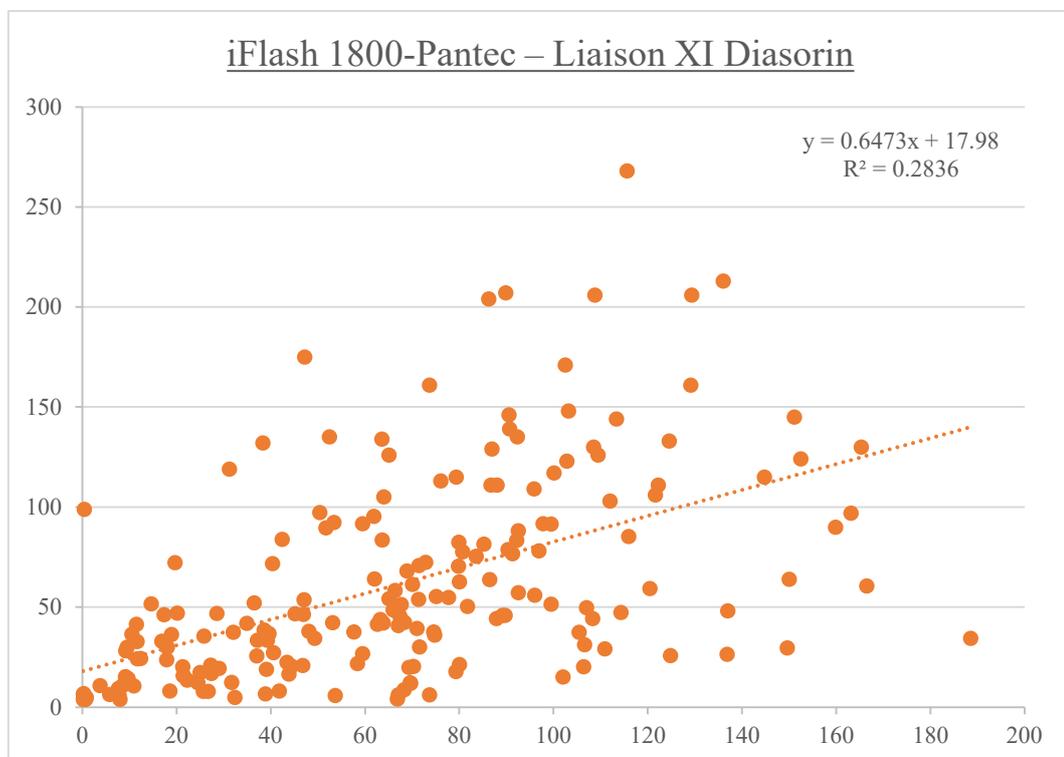
Analisi iFlash 1800 – Pantec e Liaison XI – Diasorin

L'indice di correlazione tra queste due matrici è pari a 0.533.

	iFlash 1800	Liaison XI
iFlash 1800	1	
Liaison XI	0.532549	1

Essendo tale valore maggiore di 0, è possibile affermare che è presente una debole correlazione positiva tra i valori misurati con lo strumento iFlash 1800 – Pantec e quelli ottenuti attraverso lo strumento Liaison XI – Diasorin. La forza della relazione non è molto evidente, i punti si presentano piuttosto dispersi nel diagramma.

Graficamente, la relazione tra le due variabili è rappresentabile con il diagramma a dispersione che segue:



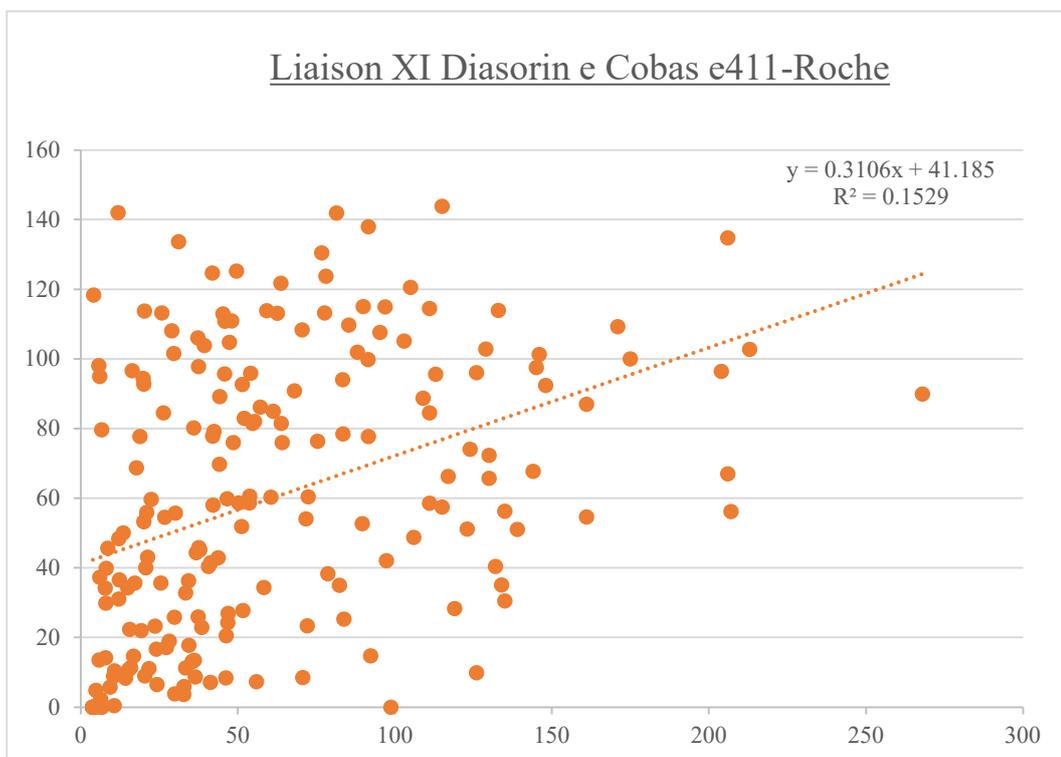
Analisi Liaison XI – Diasorin e Cobas e411 – Roche

L'indice di correlazione tra gli strumenti Liaison XI e Cobas e411 ha un valore pari a 0.391.

	Liaison XI	Cobas e411
Liaison XI	1	
Cobas e411	0.391051	1

Si tratta quindi di una correlazione positiva, anche se molto meno forte rispetto agli altri strumenti considerati fino ad ora. I punti si dispongono in modo eterogeneo attorno alla linea di regressione, la relazione lineare non può essere definita forte. Sarebbe opportuno considerare un altro tipo relazione.

Graficamente, la relazione tra le due variabili è rappresentabile con il seguente diagramma a dispersione:



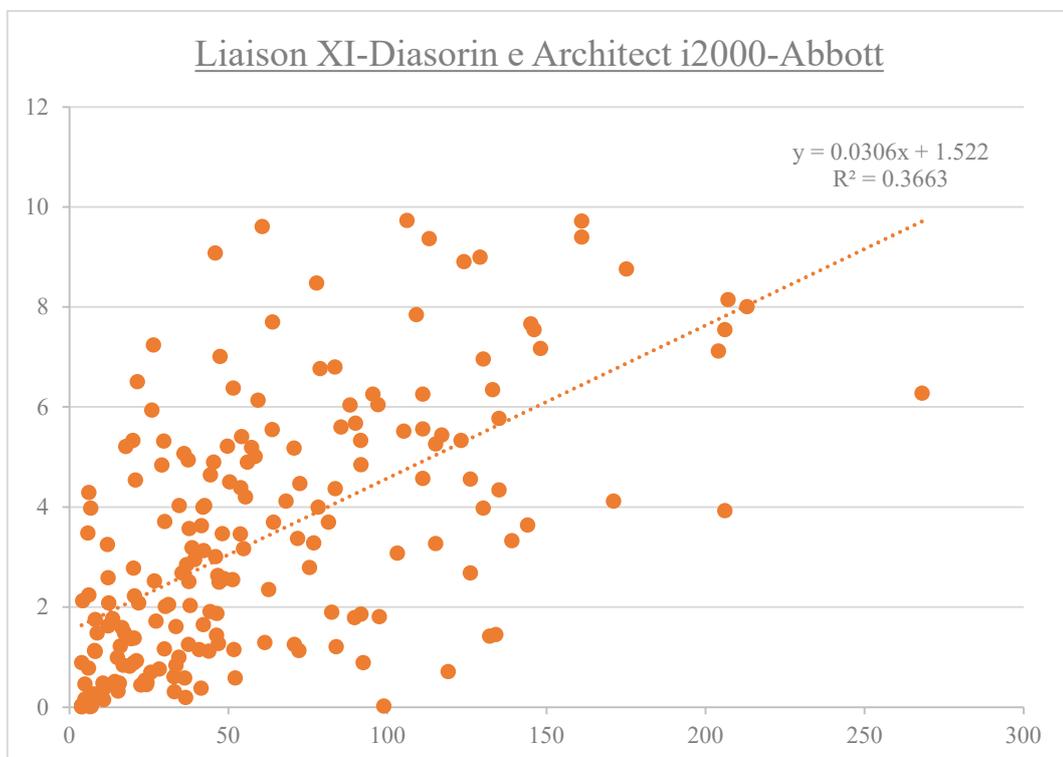
Analisi Liaison XI – Diasorin e Architect i2000 – Abbott

Il valore dell'indice di correlazione R è pari a 0.605.

	Liaison XI	Architect i2000
Liaison XI	1	
Architect i2000	0.60523	1

Essendo tale valore positivo, è possibile affermare che è presente una correlazione positiva tra i valori misurati con lo strumento Liaison XI e quelli ottenuti attraverso lo strumento Architect i2000. La relazione lineare può essere considerata mediamente forte, non tutti i punti si presentano adiacenti alla retta di regressione.

Graficamente, la relazione tra le due variabili è rappresentabile con il seguente diagramma a dispersione:



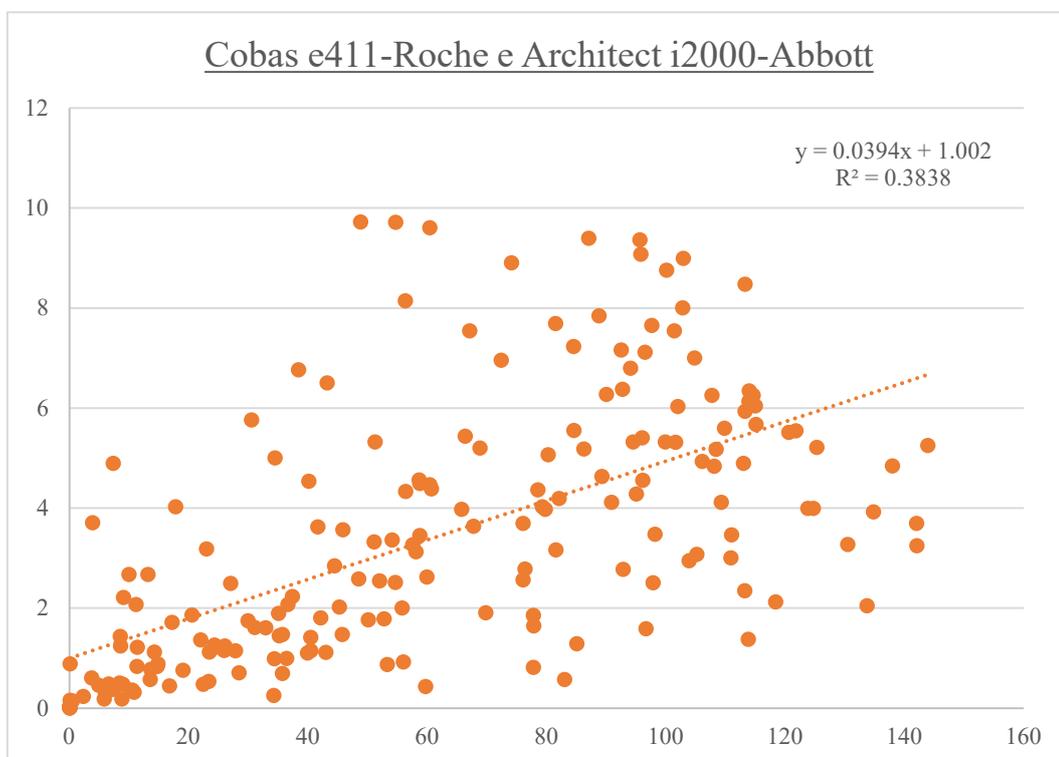
Analisi Cobas e411 – Roche e Architect i2000 – Abbott

Il valore dell'indice di correlazione R è pari a 0.619.

	Cobas e411	Architect i2000
Cobas e411	1	
Architect i2000	0.619493	1

Essendo tale valore positivo, è possibile affermare che è presente una correlazione positiva tra i valori misurati con lo strumento Cobas e411 – Roche e quelli ottenuti attraverso le misurazioni dello strumento Architect i2000 – Abbott. La relazione lineare può essere definibile come mediamente forte, infatti, non tutti i punti sono collocati in prossimità della retta di regressione.

Graficamente, la relazione tra le due variabili è rappresentabile con il diagramma a dispersione che segue:



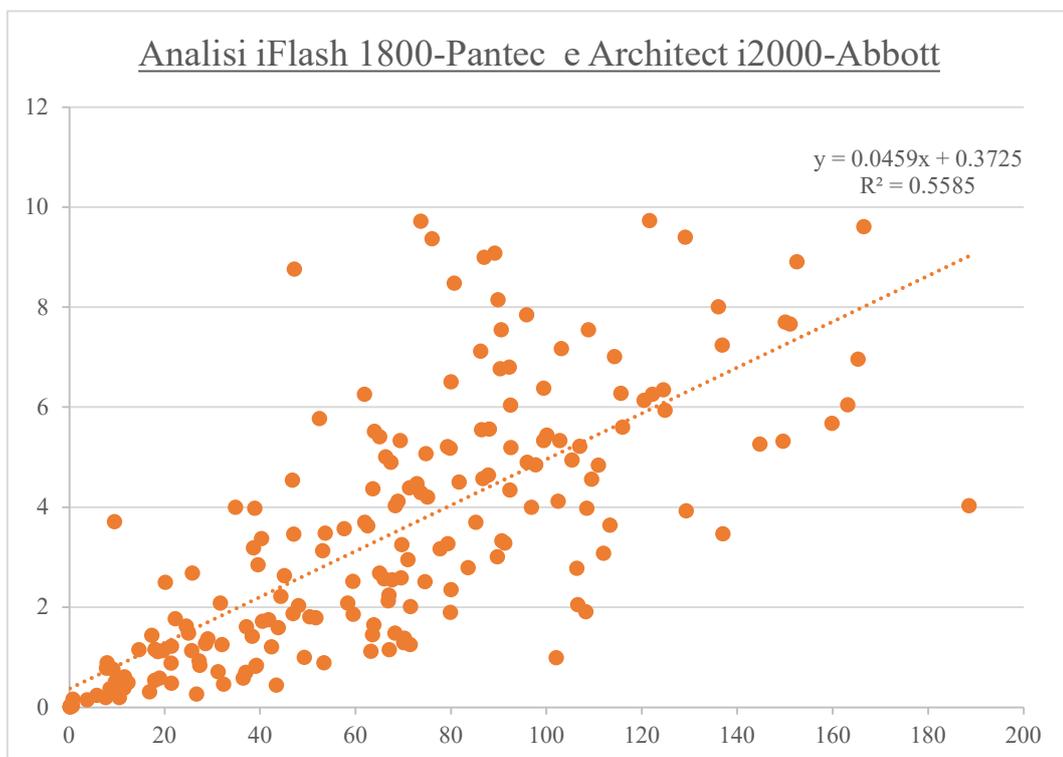
Analisi iFlash 1800 – Pantec e Architect i2000 – Abbott

L'indice di correlazione tra queste due matrici è pari a 0.747.

	iFlash 1800	Architect i2000
iFlash 1800	1	
Architect i2000	0.74731	1

Essendo tale valore prossimo a 1, è possibile affermare che è presente una forte correlazione positiva tra i valori misurati con lo strumento iFlash 1800 – Pantec e quelli ottenuti attraverso lo strumento Architect i2000 – Abbott. I punti, rispetto agli altri grafici considerati, sono ben distribuiti attorno alla retta di regressione, è possibile affermare che è presente una relazione lineare forte.

Graficamente, la relazione tra le due variabili è rappresentabile con il seguente diagramma a dispersione:



5. Conclusioni

Tanto è stata rapida l'emergenza sanitaria legata alla diffusione mondiale di SARS-CoV-2, tanto repentino lo sviluppo di test molecolari e sierologici per la rilevazione dell'infezione. Sono disponibili un centinaio di test sierologici differenti, in relazione all'agente virale usato, alla sottoclasse anticorpale rilevato, al campione biologico raccolto.⁴¹

L'utilizzo dei test sierologici permette di discriminare se le persone sono state precedentemente infettate da SARS-CoV-2. Tale valutazione è fondamentale in quanto i metodi molecolari ora in uso, come la reazione a catena della polimerasi (PCR), identificano la presenza di RNA virale, che indica la presenza di virus in fase replicativa o come residuo di replicazione recente. Non tutti coloro che hanno avuto la malattia sono stati testati, perché asintomatici o paucisintomatici. Pertanto, si presume che esista una parte della popolazione che probabilmente è stata infettata da SARS-CoV-2, e attualmente possiede gli anticorpi specifici. Altra considerazione da fare è che non tutti gli anticorpi sono in grado di neutralizzare il virus, quindi la sola presenza di anticorpi non si traduce necessariamente in immunità. I test sierologici possono fornire una lettura qualitativa o quantitativa di anticorpi verso un particolare componente del virus e, ancora, la capacità degli anticorpi di prevenire la replicazione virale può essere studiata attraverso saggi di neutralizzazione. Uno dei limiti più importanti per l'estensione all'intera popolazione di test sierologici è rappresentata dai valori di sensibilità e specificità del test (attribuiti del test diagnostico che devono essere valutati in ampi studi preliminari ben progettati).⁴⁰ Anche se l'omologia di sequenza di SARS-CoV-2 con altri Coronavirus è meno del 30% e non è stata osservata cross-reattività degli anticorpi contro Coronavirus con le proteine ricombinanti di SARS-CoV-2, non si può escludere la possibilità di falsi positivi. È necessaria un'interpretazione analitica dei risultati basata anche su fattori clinici ed epidemiologici.⁴¹

L'indagine eseguita presso il Laboratorio della Struttura Organizzativa Dipartimentale di Virologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria

Ospedali Riuniti di Ancona ha evidenziato che tra tutti gli strumenti utilizzati per l'analisi è presente una correlazione positiva. La relazione lineare è sempre crescente, in tutte le combinazioni di strumenti analizzate, infatti, la pendenza della retta è sempre positiva. È importante evidenziare però, che in particolare, tra gli strumenti iFlash1800 – Pantec e Architect i2000 – Abbott, la correlazione risulta molto più importante ed evidente rispetto alle altre combinazioni considerate. Anche graficamente la forte correlazione si manifesta riportando i valori in prossimità della retta di regressione, quindi, è possibile affermare che le due variabili presentano un'associazione positiva. D'altra parte, va sottolineato che entrambi gli strumenti in questione utilizzano un analogo sistema di rilevazione basato sull'utilizzo degli esteri di acridinio e prevedono l'utilizzo di una tecnologia immunologica chemiluminescente con cattura di microparticelle (CMIA).

Infine, è doveroso ricordare che le conclusioni dedotte sono comunque da rapportare alla limitata durata del nostro studio e al fatto che ci troviamo di fronte ad una situazione nuova ed in continua evoluzione.

6. Bibliografia e Sitografia

¹Quesiti Clinici – anno 11, n. 2, XIII edizione, *COVID-19, la malattia da nuovo coronavirus (SARS-CoV-2)*, 2020.

²B. Korber, WM. Fischer, S. Gnanakaran, H. Yoon, J. Theiler, W. Abfalterer, B. Foley, EE. Giorgi, T. Bhattacharya, MD. Parker, DG. Partridge, CM. Evans, TI. de Silva, on behalf of the Sheffield COVID-19 Genomics Group, CC. LaBranche, DC. Montefiori, *Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2*, bioRxiv 2020.04.29.069054; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.29.069054>.

³Elecsys ® Anti-SARS-CoV-2, *Immunoassay for the qualitative detection of antibodies against SARS-CoV-2*, 2020.

⁴Alexandra C. Walls, Young-Jun Park, M. Alejandra Tortorici, Abigail Wall, Andrew T. McGuire, David Veessler *Structure, Function, and Antigenicity of the SARSCoV-2 Spike Glycoprotein*, 2020, pp.281-292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.

⁵Daniel Wrapp, Nianshuang Wang, Kizzmekia S. Corbett, Jory A. Goldsmith, Ching-Lin Hsieh, Olubukola Abiona, Barney S. Graham, Jason S. McLellan, *Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation*, *Science* 367 (6483), 1260-1263, 13 mar 2020. DOI: [10.1126/science.abb2507](https://doi.org/10.1126/science.abb2507).

⁶Williamson, E.J., Walker, A.J., Bhaskaran, K. et al. *Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY*. *Nature* 584, 430–436 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2521-4>.

⁷Ganyani Tapiwa, Kremer Cécile, Chen Dongxuan, Torneri Andrea, Faes Christel, Wallinga Jacco , Hens Niel . *Estimating the generation interval for coronavirus disease (COVID-19) based on symptom onset data*, March 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(17):pii=2000257. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.17.2000257>.

⁸Giovanni Rezza, Antonino Bella, Flavia Riccardo, Patrizio Pezzotti - Dipartimento Malattie infettive, ISS, *Coronavirus, trasmissione, prevenzione e trattamento*, Epicentro, l'epidemiologia per la sanità pubblica, 23 gennaio 2020.

⁹Christian Hoffmann e Bernd Sebastian Kamps, *COVID Reference Italia: Manifestazione clinica*, 5 aprile 2020. www.CovidReference.com.

¹⁰Lopinavir/Ritonavir, Scheda Tecnica:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kaletra-eparproduct-information_it.pdf

¹¹Eric J. Rubin, M.D., Ph.D., David P. Harrington, Ph.D., Joseph W. Hogan, Sc.D., Constantine Gatsonis, Ph.D., Lindsey R. Baden, M.D., and Mary Beth Hamel, M.D., M.P.H. *The Urgency of Care during the Covid-19 Pandemic — Learning as We Go*, The New England Journal of Medicine, 2020. DOI: 10.1056/NEJMe2015903.

¹²Calvin J. Gordon *et alii*, *SARS-CoV-2 Polymerase Inhibition with Remdesivir*, The Journal of Biological Chemistry, 2020.

¹³Holshue M, DeBolt C, et al; for the Washington State 2019-nCoV Case Investigation Team. *First case of 2019 novel coronavirus in the United States*. N Engl J Med 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2001191.

¹⁴Wang, M., Cao, R., Zhang, L. *et al*. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res* 30, 269–271 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>.

¹⁵Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) <https://www.aifa.gov.it/-/azioni-intraprese-per-favorire-la-ricerca-e-l-accessoai-nuovi-farmaci-per-il-trattamento-del-covid-19> - 43 - *COVID-19, la malattia da nuovo coronavirus*.

¹⁶Gao J, Tian Z, Yang X. *Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in*

clinical studies. Biosci Trends. 2020 Mar 16;14(1):72-73. doi: 10.5582/bst.2020.01047. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32074550.

¹⁷Cortegiani A, Ingoglia G, Ippolito M, Giarratano A, Einav S. *A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19*. J Crit Care. 2020 Jun;57:279-283. doi: 10.1016/j.jcrc.2020.03.005. Epub 2020 Mar 10. PMID: 32173110; PMCID: PMC7270792.

¹⁸Xu X, Han M, Li T, Sun W, Wang D, Fu B, Zhou Y, Zheng X, Yang Y, Li X, Zhang X, Pan A, Wei H. *Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 May 19;117(20):10970-10975. doi: 10.1073/pnas.2005615117. Epub 2020 Apr 29. PMID: 32350134; PMCID: PMC7245089.

¹⁹Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) <https://www.aifa.gov.it/sperimentazioni-cliniche-covid-19>

²⁰Tang N, Bai H, Chen X, Gong J, Li D, Sun Z. *Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy*. J Thromb Haemost. 2020;18:1094–1099. <https://doi.org/10.1111/jth.14817>

²¹C. Scaroni, M. Armigliato, S. Cannavò, *Epidemia COVID-19 e somministrazione di steroidi: i pazienti trattati per Sars-Cov-2 sono a rischio di insufficienza surrenalica?*, Società italiana di Endocrinologia, 2020.

²²European Commission, *An EU programme of COVID-19 convalescent plasma*, 2020.

²³Gruppo di lavoro ISS Prevenzione e controllo delle Infezioni. *Indicazioni ad interim per un utilizzo razionale delle protezioni per infezione da SARS-COV-2 nelle attività sanitarie e sociosanitarie (assistenza a soggetti affetti da covid19) nell'attuale scenario emergenziale SARS-COV-2*. Versione del 10 maggio 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020 (Rapporto ISS COVID-19, n. 2/ 2020 Rev. 2).

²⁴Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. *Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR*. Euro Surveill. 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

²⁵van Kasteren PB, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, de Jonge J, van den Brandt A, Molenkamp R, Reusken CBEM, Meijer A. *Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19*. J Clin Virol. 2020 Jul;128:104412. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104412. Epub 2020 May 8. PMID: 32416600; PMCID: PMC7206434.

²⁶Datasheet_Scheda tecnica SARS-CoV-2 ELITe MGB® Kit

²⁷Datasheet_Scheda tecnica Alinity m SARS-CoV-2 AMP Kit

²⁸Elitza S. Theel, Patricia Slev, Sarah Wheeler, Marc Roger Couturier, Susan J. Wong, Kamran Kadkhoda, *The Role of Antibody Testing for SARS-CoV-2: Is There One?*, Journal of Clinical Microbiology Jul 2020, 58 (8) e00797-20; DOI: 10.1128/JCM.00797-20.

²⁹World Health Organization. (2020). *Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance*, 2 March 2020. World Health Organization; <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>.

³⁰Juanjuan Zhao Jr., Quan Yuan, Haiyan Wang, Wei Liu, Xuejiao Liao, Yingying Su, Xin Wang, Jing Yuan, Tingdong Li, Jinxiu Li, Shen Qian, Congming Hong, Fuxiang Wang, Yingxia Liu, Zhaoqin Wang, Qing He, Zhiyong Li, Bin He, Tianying Zhang, Shengxiang Ge, Lei Liu, Jun Zhang, Ningshao Xia, Zheng Zhang, *Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients*

of novel coronavirus disease 2019. medRxiv 2020.03.02.20030189; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.20030189>.

³¹Johns Hopkins University Center for Health Security, *Serology testing for COVID-19*, 2020.

<http://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/COVID-19-fact-sheets/200228-Serology-testing-COVID.pdf>

³²Liu, L., Wang, P., Nair, M.S. et al. *Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike*. Nature 584, 450–456 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7>

³³Pamela Pinzani, Gianni Messeri, Mario Pazzagli, *Chemiluminescenza*, Rivista monografica di medicina «Caleidoscopio», 84 (1993).

³⁴Renato Tozzoli, Federica D’Aurizio, *L’Immunochemiluminescenza nella Diagnostica di Laboratorio*, Rivista monografica di medicina «Caleidoscopio», 228 (2014).

³⁵Dodeigne C, Thunus L, Lejeune R. *Chemiluminescence as diagnostic tool. A review*. Talanta. 2000 Mar 6;51(3):415-39. doi: 10.1016/s0039-9140(99)00294-5. PMID: 18967873.

³⁶Datasheet_Scheda tecnica iFlash 1800 – Pantec

³⁷Datasheet_Scheda tecnica Liaison XI – Diasorin

³⁸Datasheet_Scheda tecnica Cobas e411 – Roche

³⁹Datasheet_Scheda tecnica Architect i2000 – Abbott

⁴⁰Decreto legge 10 maggio 2020, *Protocollo metodologico per l’indagine di siero-prevalenza sul SARS-CoV-2 condotta dal Ministero della salute e dall’ISTAT*.

⁴¹COVID Contents n. 6 del 13 maggio 2020. A cura del Gruppo di Studio ISS COVID-19 - Aggiornamento Scientifico. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020.

7. Ringraziamenti

Il più grande e sentito ringraziamento va alla Dott.ssa Marinella Balercia, che, nonostante l'immensa mole di lavoro di questi mesi, mi ha seguito con disponibilità, entusiasmo e professionalità. La ringrazio perché ha fatto di tutto per rendermi partecipe della "vita di laboratorio". La ringrazio per la fiducia che ha riposto nei miei confronti e per la grande passione tangibile già dal primo giorno di lezione.

Ringrazio il Prof. Stefano Menzo, tutto il personale del Servizio di Virologia, in particolare le Dott.sse Benedetta Corvaro, Laura Di Sante, Sara Caucci per la preziosa collaborazione.

Ringrazio i miei colleghi, con i quali ho trascorso questi tre anni di tirocini, lezioni, laboratori ed esami. Ringrazio Asya e Sara, accanto alle quali ho fatto il mio primo ingresso nel mondo degli aspiranti tecnici, sono persone vere, le amiche che tutti dovrebbero avere accanto. Quelle persone che non hanno timore di esprimersi, la vostra sincerità è unica, per questo vi ringrazio.

Ringrazio i miei genitori, mia sorella, mia zia. Li ringrazio per la tenacia che li contraddistingue, la stessa tenacia che rivedo in me e a cui mi aggrappo quando mi sento di non essere abbastanza. Li ringrazio perché mi fanno ascoltare anche quando non ho nulla da dire.

Ringrazio le mie amiche di lunga data, Benedetta, Michela, Giulia e Claudia. Grazie a loro ho fatto le risate più belle e spensierate. Insieme abbiamo visto posti, incontrato persone. Ci siamo perse a Parigi, ma come sempre ci siamo ritrovate, sempre noi stesse.

Ringrazio Giulia, Giacomo, Tato e Sara. Mi hanno accompagnato e sostenuto a forza di sorrisi e tisane. Sono gli amici del sabato sera, ma anche quelli della domenica, del lunedì e di ogni momento. Loro ci sono. Li ringrazio perché stare insieme è condivisione, è mettere le carte in tavola e "giocare".

Li ringrazio perchè mi spingono ad andare oltre la mia zona di comfort. È grazie alla loro comprensione che ho imparato, e sto imparando, a chiedere aiuto.

Infine, vorrei ringraziare la me stessa di tre anni fa che ha avuto il coraggio di riconoscersi persa, tornare indietro e iniziare da capo. J.D. Salinger ne *Il giovane Holden* scrive *“A chi precipita non è permesso di accorgersi né di sentirsi quando tocca il fondo. Continua soltanto a precipitare giù. Questa bella combinazione è destinata agli uomini che, in un momento o nell'altro della loro vita, hanno cercato qualcosa che il loro ambiente non poteva dargli. O che loro pensavano che il loro ambiente non potesse dargli. Sicché hanno smesso di cercare.”* Oggi mi ringrazio per aver smesso di cercare. Ho smesso di cercare e mi sono ritrovata.