

Determinazione degli anticorpi IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 mediante piattaforma iFlash1800 CLIA in una casistica italiana

Iolanda Bottari¹, Margherita Resta¹, Pietro Gatti², Domenico Potenza³, Bruna Andriulo¹, Vito Cornacchiulo¹

¹Laboratorio di Patologia Clinica Presidio Ospedaliero di Francavilla Fontana (ASL BR)

²Medicina Interna Presidio Ospedaliero "A. Perrino" di Brindisi (ASL BR)

³Malattie Infettive Presidio Ospedaliero "A. Perrino" di Brindisi (ASL BR)

ABSTRACT

Detection of IgG and IgM anti-SARS-CoV-2 by iFlash1800 CLIA analyser in an Italian population.

Introduction: World Health Organization guidance dated 17 January 2020 indicates the need to associate the detection of antibodies anti-SARS-CoV-2 to real time reverse transcriptase PCR test (rRT-PCR) for the diagnosis of the new coronavirus infection. Aim of this study is to acquire information about the prevalence of IgG and IgM anti-SARS-CoV-2 antibodies in a population of health workers (control group) and in patients affected by COVID-19.

Methods: the control group includes 190 asymptomatic health workers; the patient group includes 44 affected patients. Serum IgM and IgG antibodies to SARS-CoV-2 were measured by using iFlash1800, a fully automatic chemiluminescence immunoassay analyser. rRT-PCR was performed with CFX96 Touch™ system (Bio-Rad, Hercules, California, USA) and LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania). **Results** 186 out of 190 asymptomatic health workers were negative for rRT-PCR. Among these, 3 were positive for IgG antibodies (98% specificity, 95%CI 96-99) and 5 for IgM antibodies (97,3% specificity, 95%CI 95-98). 40 out of 44 patients were positive for rRT-PCR. Among these, 39 were positive for IgG (97,5 sensibility, 95%CI 91-100); 30 were positive for IgM anti-SARS-CoV-2 (75%).

Discussion: rRT-PCR is a routine method for the diagnosis and confirmation of COVID-19 infection. However, false negative and positive results from rRT-PCR were found in a number of healthcare workers. They were possibly due to sample collection, storage conditions, difference of virus load in the infection site, RNA extraction methods and kit quality, contaminations and test performed in patients from areas with low prevalence of the infection. These rRT-PCR failures can determine an important negative impact on the diagnosis. The high sensitivity of IgG and IgM detection in the patient group indicates that serological tests are of great help in improving the clinical sensitivity of COVID-19 diagnosis. Our results show that anti-SARS-CoV-2 IgG and IgM antibody detection is a very effective tool, in association with molecular test for diagnosis, and epidemiologic studies of this severe disease.

INTRODUZIONE

Il documento della Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) del 17 gennaio 2020 (1) indicava la necessità di associare l'uso di test sierologici alla diagnosi molecolare per COVID-19 mediante Reverse Real-Time PCR (rRT-PCR) nelle polmoniti associate al nuovo coronavirus. Gli esami sierologici hanno infatti la finalità di evidenziare e valutare nel tempo la risposta immunologica a questo patogeno.

Abbiamo quindi acquisito, nel nostro laboratorio, uno strumento automatico, con metodo in

chemiluminescenza (CLIA), per la misura degli anticorpi IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 sia in soggetti asintomatici (operatori sanitari ad alto rischio di contagio) che in pazienti affetti da COVID-19 ricoverati nei reparti per acuti e post acuti della Azienda Ospedaliera di Brindisi.

Il primo obiettivo era quello di identificare nel gruppo di sanitari asintomatici e con tampone negativo, eventuali soggetti immunologicamente competenti. Il secondo obiettivo era valutare l'andamento della risposta immune in relazione al quadro clinico in pazienti ricoverati.

Corrispondenza a: Vito Cornacchiulo, Presidio Ospedaliero Dario Camberlingo, Piazza Madonna delle Grazie, Francavilla Fontana, 0831851251/2, E-mail vitocor@alice.it

Ricevuto: 27.05.2020

Revisionato: 09.06.2020

Accettato: 19.06.2020

Publicato on-line: 13.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.073

Inoltre, in accordo con la Direzione, la determinazione degli anticorpi è stata utilizzata per individuare negli operatori sanitari, sia gli individui ad elevato rischio di contagio (esame sierologico negativo), che i soggetti che avessero già contratto la malattia (esame sierologico positivo), vista l'impossibilità, in fase pandemica, di eseguire i test molecolari su tutti gli operatori.

METODI

Soggetti

Il gruppo di controllo è costituito da 190 soggetti, (85 maschi e 105 femmine), tutti operatori sanitari, asintomatici, sottoposti contestualmente a tampone naso-faringeo per la ricerca molecolare del virus e a prelievo di sangue periferico per la ricerca di anticorpi anti-SARS-CoV-2.

Il gruppo di pazienti è costituito da 44 pazienti (34 maschi e 10 femmine), tutti sottoposti ad almeno un tampone naso-faringeo per la ricerca molecolare del SARS-CoV-2 così distinti:

- 28 pazienti, (23 maschi e 5 femmine) ricoverati presso i reparti per acuti del Presidio Ospedaliero "A. Perrino" di Brindisi
- 16 pazienti, (11 maschi e 5 femmine) ricoverati presso le strutture per post-acuti della Azienda Ospedaliera.

Tutti i campioni ematici e i tamponi naso-faringei sono stati raccolti nel periodo di tempo compreso tra il 28 marzo e il 4 maggio 2020.

Durante l'effettuazione dello studio è stata rispettata e applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 2013. È stato ottenuto un Consenso Informato da ciascuno dei soggetti del gruppo controllo. Data la gravità e la situazione d'urgenza non è stato ottenuto un consenso informato dai pazienti. Si sottolinea, che i campioni ematici dei pazienti sono stati prelevati per le necessarie indagini legate alla valutazione del loro stato di salute.

Metodi analitici

Esami sierologici

I prelievi ematici sono stati eseguiti mediante sistema Vacutainer, utilizzando provette RST (rapid serum tube) con trombina e gel separatore (Becton Dickinson Italia S.p.A., Milano, Italia). Le provette, provviste di barcode identificativo, sono state sottoposte a centrifugazione per 8 minuti a 4000g, quindi, caricate, come provette primarie, sull'analizzatore iFlash1800, interfacciato al LIS di laboratorio Lab2000 (MCA, Taranto, Italia)

Per la determinazione degli anticorpi anti-SARS-CoV-2 di isotipo IgG e IgM è stato utilizzato lo strumento iFlash1800, analizzatore multiparametrico in chemiluminescenza della ditta Shenzhen YHLO Biotech (Cina).

I kit 2019-nCoV IgG e IgM, adattati a questa piattaforma strumentale, sono ugualmente prodotti dalla

ditta Shenzhen YHLO Biotech (Cina). La determinazione, definita dai produttori di tipo qualitativo, vista l'assenza di standard internazionali, grazie all'algoritmo del software strumentale poteva essere considerata di tipo semi-quantitativo.

Il metodo, della durata di 30 minuti, prevede l'utilizzo di microparticelle magnetiche adsorbite con due antigeni del SARS-CoV-2, la proteina del nucleocapside virale (proteina N) e la glicoproteina S facente parte delle "spicole virali". Le microparticelle vengono poste in incubazione con il siero per 15 minuti; dopo opportuni lavaggi, alle cuvette di reazione viene aggiunto un anticorpo anti-IgG o IgM umane coniugato con acridinio. Dopo ulteriori lavaggi, l'aggiunta di "Pre-Trigger e Trigger" consente di misurare l'eventuale complesso immune presente nelle cuvette come unità di luce relativa (RLUs). Il sistema calcola automaticamente la concentrazione dell'analita nel campione, attribuendo un risultato in Unità Arbitrarie per mL (UA/mL).

Il valore soglia indicato dal produttore è di 10 UA/mL sia per per la determinazione di IgG che IgM.

Test molecolari

I tamponi naso-faringei sono stati eseguiti utilizzando i tamponi FLOQSwabs (COPAN Diagnostics Inc., California, USA), trasportati nei laboratori di riferimento con provetta UTM3ML (COPAN Diagnostics Inc., California, USA) entro due ore dal prelievo.

Gli esami sono stati eseguiti presso il Laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico di Foggia ed il Laboratorio di Microbiologia del Presidio Ospedaliero A. Perrino di Brindisi utilizzando le seguenti metodiche. Estrazione dell'RNA virale con sistema QIAcube HT (Qiagen, Hilden, Germania). rRT-PCR in accordo al protocollo WHO per la ricerca del SARS-CoV-2 (2) con il sistema CFX96 TouchTM (Bio Rad, Hercules, California, USA) e con LighCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania).

RISULTATI

Operatori sanitari

186 dei 190 (97,8%) operatori sanitari sono risultati negativi al test molecolare. Tre dei 186 operatori sanitari sono risultati positivi per IgG [specificità 98%, (intervallo di confidenza al 95% (95%CI) 96-99)] e 5 positivi per IgM (specificità 97,3%, 95%CI 95-98). I dati sono riportati in Tabella 1.

4 soggetti (A, B, C, D) sono risultati positivi al tampone naso-faringeo con rRT-PCR, ma negativi all'esame sierologico; posti in quarantena fiduciaria, sono stati sottoposti nuovamente a tampone naso-faringeo, risultato negativo e ad ulteriori due determinazioni sierologiche a distanza di 14 e 28 giorni dal primo prelievo, risultate ugualmente negative.

In 7 casi è stata evidenziata una positività di anticorpi anti-SARS-CoV-2. In 4 soggetti (E, F, G, H), era positiva la ricerca per IgM (16,7; 14,9; 24,8 e 28,1 UA/mL

rispettivamente); i test sono stati ripetuti nel tempo ed hanno mostrato risultati sovrapponibili. Un soggetto (L) è risultato positivo sia per IgG che per IgM in due diverse determinazioni (81,7 e 79,3 UA/mL per IgG; 24,3 e 22,2 UA/mL per IgM). 2 soggetti (M e I) sono risultati positivi a due determinazioni solo per la ricerca delle IgG (73,0 e 78,5; 84,2 e 86,7 UA/mL rispettivamente) e con valori inferiori al valore soglia per le IgM (9,5 e 8,2; 2,6 e 2,7 UA/mL). I dati di questi 11 soggetti sono riportati in Tabella 2.

Pazienti

40 dei 44 pazienti ricoverati presso i reparti per acuti e per post-acuti della Azienda Ospedaliera sono risultati positivi al test molecolare (90,9%). 39 dei 40 pazienti sono risultati positivi per IgG anti-SARS-CoV-2 (sensibilità 97,5; 95%CI 91-100). 30 pazienti sono risultati positivi per IgM (sensibilità 75%). Per questo dato non si è ritenuto di esprimere gli IC in quanto nei soggetti con quadro clinico in via di risoluzione è possibile assistere alla scomparsa delle IgM. I risultati sono illustrati in Tabella 3. 24 dei 28 pazienti ricoverati

presso i reparti per acuti erano risultati positivi ad almeno un tampone durante la malattia, in 4 non era mai stata evidenziata la positività per SARS-CoV-2 con rRT-PCR. In tutti i 28 pazienti abbiamo riscontrato la positività per IgG anti-SARS-CoV-2 (con valori compresi tra 13,4 e 93 UA/mL). La ricerca di IgM è risultata positiva in 21 pazienti (con valori compresi tra 13,2 e 636 UA/mL) e negativa in 7 (con valori compresi tra 1,6 e 9,8 UA/mL). Questi risultati sono riportati in Tabella 4; viene riportato il dettaglio dei pazienti (P, R, S, T) risultati negativi al test molecolare.

I 16 pazienti del reparto post-acuti avevano nella loro storia clinica almeno una determinazione di positività per SARS-CoV-2 mediante rRT-PCR. In questi soggetti abbiamo evidenziato la positività per IgG anti-SARS-CoV-2 in 15 pazienti con valori compresi tra 18 e 90,4 UA/mL. 11 pazienti erano positivi per le IgM (valori compresi tra 17,5 e 3626 UA/mL). In 4 pazienti le IgM erano negative (valori compresi tra 0,8 e 9,6 UA/mL). Un paziente (Paziente V) era negativo per IgG e IgM, con 1,3 e 0,6 UA/ml rispettivamente. I dati sono pure riportati in Tabella 4.

Tabella 1

Sieri di operatori sanitari negativi al tampone naso-faringeo

Classe anticorpale	AU/mL	N	%	Esito
IgG	<10	183	98	Negativo
IgG	>10	3	2	Positivo
Totale		186	100	
IgM	<10	181	97,3	Negativo
IgM	>10	5	2,7	Positivo
Totale		186	100	

Tabella 2

Valori di IgG e IgM anti-SARS-CoV2 e risultato del tampone naso-faringeo in 11 operatori sanitari asintomatici

	Esito Tampone	IgG (UA/mL)	IgM (UA/mL)
Soggetto A	Positivo → Negativo	0,6 → 0,5 → 0,4	0,2 → 0,4 → 0,3
Soggetto B	Positivo → Negativo	0,2 → 0,2 → 0,3	1,8 → 1,5 → 1,7
Soggetto C	Positivo → Negativo	1,5 → 1,3 → 1,8	1,1 → 0,9 → 1,0
Soggetto D	Positivo → Negativo	0,7 → 1,2 → 1,4	0,6 → 1,5 → 1,4
Soggetto E	Negativo → Negativo	0,5 → 0,3	16,7 → 16,9
Soggetto F	Negativo	2,7 → 2,8	14,9 → 13,7
Soggetto G	Negativo	0,2 → 0,5	24,8 → 23,9
Soggetto H	Negativo → Negativo	0,2 → 0,4	28,1 → 25,9
Soggetto I	Negativo	84,2 → 86,7	2,6 → 2,7
Soggetto L	Negativo	81,7 → 79,3	24,3 → 22,2
Soggetto M	Negativo	73,0 → 78,5	9,5 → 8,2

La freccia indica la progressione dei controlli eseguiti ogni due settimane. Il valore soglia per la positività dell'esame sierologico è 10 UA/mL.

Tabella 3*Sieri di pazienti positivi al tampone naso-faringeo*

Classe anticorpale	AU/mL	N	%	Esito
IgG	<10	1	2,5	Negativo
IgG	>10	39	97,5	Positivo
Totale		40	100	
IgM	<10	10	25	Negativo
IgM	>10	30	75	Positivo
Totale		40	100	

Tabella 4*Valori di IgG e IgM anti-SARS-CoV2 nei pazienti affetti da COVID-19*

Pazienti in Reparti per acuti (N=28)			
Pazienti	EsitoTampone	IgG (UA/mL)	IgM (UA/mL)
N=24	Positivo	Valori compresi tra 13,4 e 93,0	19 Positivi con valori compresi tra 13,2 e 636 5 Negativi con valori compresi tra 1,6 e 8,8
Paziente P	Negativo	46,1	9,8
Paziente R	Negativo	69,5	3,8
Paziente S	Negativo	55,3	21,0
Paziente T	Negativo	33,8	341,3
Pazienti in Reparti per post-acuti (N=16)			
Pazienti	EsitoTampone	IgG (UA/mL)	IgM (UA/mL)
N=15	Positivo	Valori compresi tra 18 e 90,4	11 Positivi con valori compresi tra 17,5 e 3626 4 Negativi con valori compresi tra 0,8 e 9,6
Paziente V	Positivo	1,3 → 1,5	0,6 → 1,1

La freccia indica la progressione dei controlli eseguiti ogni due settimane.

DISCUSSIONE

L'infezione da SARS-CoV-2, dovuta ad un coronavirus del genere beta appartenente alla sottofamiglia Orthocoronaviridae, virus a RNA a filamento positivo, caratterizzata da possibili gravi manifestazioni cliniche a carico delle vie respiratorie, è un'infezione virale altamente contagiosa, ad alta morbilità e mortalità.

La diagnosi si basa sui test molecolari (3), su criteri clinici e su quadri patognomici radiologici (4). La presenza di falsi negativi nei test rRT-PCR, possibile per inadeguata tecnica del prelievo, per limiti nella sensibilità dei kit utilizzati, per una oggettiva difficoltà operativa nelle fasi di estrazione manuale dell'RNA virale nei test semi-automatici, o ancora per la fugace e transitoria presenza del virus nelle prime vie aeree rispetto alla

comparsa dei sintomi clinici specifici, che può verificarsi anche dopo 14 giorni dall'avvenuto contagio, ha convinto molti esperti epidemiologi della necessità di affiancare alla diagnosi molecolare e alle evidenze cliniche le indagini immunologiche per la lotta a questa pandemia (5). Del resto, la OMS, fin dal gennaio 2020 (1) aveva considerato questo aspetto come fondamentale nel controllo dell'infezione da SARS-CoV-2.

Numerose osservazioni suggeriscono che la risposta immune dell'ospite gioca un ruolo fondamentale nel controllo di questa infezione virale (5, 6). Livelli circolanti di IgM anti-SARS-CoV-2 possono essere osservate dopo 3 settimane dal contagio, tendono a mantenersi per ulteriori 4 settimane, e forse più a lungo. Le IgG anti-SARS-CoV-2 si manifestano dopo 4 settimane dal contagio e raggiungono i valori più alti dopo 8 settimane (7).

Sulla scorta di queste considerazioni abbiamo acquisito nel mese di marzo 2020 uno strumento multiparametrico per l'esecuzione delle determinazioni sierologiche degli anticorpi anti-SARS-CoV-2. Abbiamo optato per uno strumento con metodo CLIA e non per i test rapidi qualitativi perché avevamo la necessità, per quanto nelle nostre competenze, di supportare i Clinici nella comprensione, dal punto di vista immunologico, della risposta dell'ospite a questa infezione virale. L'uso dei test rapidi, sicuramente utilissimo per progetti di screening di massa, soprattutto nelle regioni più colpite dalla pandemia, non poteva soddisfare questa esigenza.

La scelta della piattaforma strumentale iFlash 1800A si è basata sulle indicazioni di sensibilità e specificità dichiarate dal produttore (sensibilità 97,3 e specificità 96,3 per la misura di IgG; sensibilità 86,1 e specificità 99,2 per la misura delle IgM). I nostri risultati sembrano essere in linea con quanto dichiarato; non abbiamo verificato inaccurata e imprecisione, le curve di calibrazione sono risultate stabili e i controlli all'inizio e a termine di ogni seduta hanno testimoniato ottimi livelli di prestazioni analitiche. L'accuratezza diagnostica della strumentazione e dei kit utilizzati è stata ben illustrata da altri Autori (8).

Osservando i nostri risultati, emergono alcuni aspetti che meritano una discussione. Innanzitutto vale la pena di soffermarsi sul riscontro, nel gruppo di controllo, di 4 soggetti asintomatici, con test molecolare positivo e ricerca di anticorpi IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 negativa, sia al momento dell'arruolamento, che al prelievo di controllo eseguito dopo 4 settimane. Criticamente abbiamo attribuito a questo dato il significato di un possibile falso negativo. Tuttavia, pur essendo ben consci della rarità di test rRT-PCR falsamente positivi, non va esclusa la possibilità che una quota variabile di test molecolari risulti tale (9). Ciò è soprattutto possibile quando l'uso di questi test sia largamente diffuso in regioni a bassa prevalenza d'infezione (9). Va inoltre sottolineato che l'assoluta necessità di allargare la diagnostica molecolare a più laboratori, come si è verificato in questa pandemia, può aver determinato un utilizzo di questi metodi da parte di personale privo di adeguate esperienze e competenze. Purtroppo, a conclusione dell'analisi di questa incongruenza tra dato molecolare e sierologico, vorremmo sottolineare che non disponiamo al momento di informazioni sui test di conferma: se sono stati approntati, con quale metodo alternativo e con quale esito.

Fra le ipotesi plausibili, vale la pena di citare le seguenti possibilità:

- che una bassa carica virale, pur dimostrata con test molecolari, non sia in grado di determinare malattia e soprattutto una risposta anticorpale;
- che esistano soggetti non suscettibili all'infezione;
- che esistano altre specificità anticorpali, in risposta all'infezione, non dimostrabili con il metodo adottato;
- che nei soggetti con bassa carica virale si possa produrre una diversa risposta immune mediata da altri isotipi anticorpali (ad esempio anticorpi anti-SARS-

CoV-2 di tipo IgA).

Un caso che sembra confermare i dubbi ora espressi è il paziente del secondo sottogruppo, ricoverato in una struttura per post-acuti della nostra Azienda (Paziente V della Tabella 4). Si tratta di un dipendente dei Servizi Sociali che è stato sottoposto ad isolamento nella struttura per post-acuti insieme ad un altro paziente (contatto stretto). Entrambi asintomatici, sono risultati positivi al test molecolare, ma solo uno dei due è risultato positivo alla ricerca degli anticorpi (Tabella 4). L'impatto di un test rRT-PCR falsamente positivo o negativo può determinare oltre a seri problemi diagnostici, gravi ripercussioni sull'individuo per terapie inadeguate, limitazioni della propria libertà individuale e per ultimo il rischio aumentato di contrarre l'infezione se posto in quarantena insieme ad altri pazienti sicuramente affetti da infezione da COVID-19 (9).

Nel gruppo di controllo abbiamo evidenziato sicuramente 3 falsi positivi per la ricerca delle IgM anti-SARS-CoV-2 (soggetti F, G e H della Tabella 2). Questo dato è in linea con la sensibilità del test. Va sottolineato che i 3 soggetti oltre a mantenere una debole positività per IgM nei controlli seriali, non presentavano in anamnesi nessuna patologia degna di nota. Per quanto riguarda i 3 soggetti del gruppo di controllo (I, L e M della Tabella 2) in cui abbiamo riscontrato la positività per IgG anti-SARS-CoV-2, vorremmo sottolineare i seguenti dati. Per un soggetto (I) si poteva documentare una permanenza in Lombardia nel mese di febbraio 2020. Il secondo soggetto (L) riferiva nel mese di febbraio la comparsa di una sintomatologia simil-influenzale. Nel terzo caso (M) non si avevano informazioni che potessero giustificare l'infezione da COVID-19.

Una ulteriore conferma del ruolo cruciale della ricerca di anticorpi anti-SARS-CoV-2 è la ridotta positività per la ricerca delle IgM rispetto a quella delle IgG nel gruppo dei pazienti. Questo dato sembra in accordo con la sierconversione. Nei soggetti in via di risoluzione clinica si assiste alla lenta perdita della risposta IgM-mediata a fronte del consolidamento di quella di tipo IgG (6, 8). Va sottolineato che in questa patologia non si assiste ad un vero picco di IgM specifiche come osservato nell'infezione da SARS (7). I nostri dati confermano tali acquisizioni, soprattutto osservando i risultati dei pazienti ricoverati presso le strutture aziendali per post-acuti (parte finale della Tabella 4) (8, 10).

Un ulteriore obiettivo del nostro studio era quello di individuare negli operatori sanitari, individui ad elevato rischio di contagio, i soggetti che potessero aver contratto questa patologia. I nostri risultati mostrano che solo 7 operatori su 190 (3,7%) erano positivi all'esame sierologico, di questi solo 3 (I, L e M, 1,6%) avevano sicuramente contratto l'infezione da SARS-CoV-2.

Una ultima considerazione riguarda l'utilizzo dei test rapidi qualitativi di screening nelle regioni a bassa prevalenza d'infezione. Per questa finalità epidemiologica è sicuramente auspicabile l'uso di questa tipologia di test più economici e facilmente

utilizzabili da personale non specialistico (11). Eventuali soggetti positivi andrebbero successivamente sottoposti a test molecolare e a ricerca quantitativa degli anticorpi anti-SARS-CoV-2 con metodi immunometrici quantitativi.

E' indubbio che in questa grave infezione la diagnosi sia, come sempre, multidisciplinare, e debba basarsi sui dati clinici, e radiologici e nell'ambito della diagnostica di laboratorio, sull'uso combinato di test molecolari e sierologici.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori desiderano ringraziare la Ditta Pantec S.r.l. (Torino, Italia) per il supporto tecnico e il Dott. Marcello Nisi per la supervisione statistica.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Laboratory testing of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: interim guidance, 17 January 2020. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330676> (ultimo accesso: giugno 2020).
2. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25:2000045.
3. Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-2040.
4. Lin C, Ding Y, Xie B, et al. Asymptomatic novel coronavirus pneumonia patients outside Wuhan: The value of CT images in the course of disease. *Clin Imaging* 2020;63:7-9.
5. Jin Y, Wang M, Zuo Z, et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. *Int J Infect Dis* 2020;94:49-52.
6. Tan W, Lu Y, Zhang J, et al. Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19. *MedRxiv* 2020 <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042382> (ultimo accesso giugno 2020).
7. Lippi G, Salvagno GL, Mattiuzzi C. Guida sintetica alla diagnostica della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19). 2020 doi: 10.19186/BC_2020.052
8. Infantino M, Grossi V, Lari B, et al. Diagnostic accuracy of an automated chemiluminescent immunoassay for anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies: an Italian experience. *J Med Virol* 2020 doi 10.1002/jmv.25932.
9. Cohen AN, Kessel B. False positive in reverse transcription PCR testing for SARS-CoV-2. *MedRxiv* 2020 <https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20080911> (ultimo accesso: giugno 2020).
10. Phelan AL, Katz R, Gostin LO. The novel coronavirus originating in Wuhan, China: Challenges for global health governance. *JAMA* 2020 doi: 10.1001/jama.2020.1097.
11. Li Z, Yi Y, Luo X, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *J Med Virol* 2020 doi: 10.1002/jmv.25727.