Raccomandazioni ad interim di SIBioC per l'analisi sierologica dell'infezione da SARS-CoV-2

Giuseppe Lippi[1], Sergio Bernardini[2], Marcello Ciaccio[3], Tommaso Trenti[4], Laura Sciacovelli[5], Mario Plebani[5], per il Gruppo Operativo SIBioC su COVID-19

[1]Sezione di Biochimica Clinica e UOC Laboratorio Analisi, Università degli Studi di Verona e Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona

[2]Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Tor Vergata-Roma

[3]Istituto di Biochimica Clinica, Medicina Molecolare Clinica e Medicina di Laboratorio, Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata, Università degli Studi di Palermo e Dipartimento e UOC di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico "P. Giaccone", Palermo

[4]Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda Ausl e Azienda Ospedaliera Universitaria di Modena

[5]Dipartimento DIDAS Servizi di Diagnostica Integrata, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova

ABSTRACT

Ad interim SIBioC recommendations for serological assessment of SARS-CoV-2 infection.

The recent pandemic outbreak caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and associated with the pathology called COVID-19 (coronavirus disease 2019), has now become one of the most strenuous health care challenges since the emergence of the three pandemics caused by influenza viruses during the past century. Throughout the clinical decision-making of COVID-19, laboratory tests are essential for supporting the screening, diagnosis, prognostication and therapeutic monitoring of this severe infectious disease. Serological testing, that reflects the humoral immune response developing after interaction between the host and the virus (or its components), enables to garner a vast array of clinical information which can be especially used in seroprevalence or seroconversion studies. To this end, the Task Force on COVID-19 of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC) has endorsed a series of technical, practical and clinical ad interim recommendations, aimed at facilitating and optimizing the introduction, clinical usage and governance of SARS-CoV-2 serological immunoassays in routine practice.

GENERALITÀ SULLA PANDEMIA DA SARS-COV-2

La recente pandemia, causata dal coronavirus denominato SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) ed associata alla patologia denominata COVID-19 (coronavirus disease 2019), sta rappresentando una delle sfide sanitarie più complesse dai tempi delle tre ultime tragiche pandemie influenzali causate dai virus H1N1 ("Spagnola", nel 1918-19), H2N2 ("Asiatica", nel 1957-58) e H3N2 ("Hong Kong", nel 1968) (1). Le peculiari caratteristiche biologiche di questo nuovo coronavirus, congiuntamente ad elevata contagiosità (anche in fase presintomatica e asintomatica) e minore mortalità (circa 2%) al confronto con le due precedenti epidemie da coronavirus definite SARS (severe acute respiratory syndrome; mortalità prossima al 10%) nel 2002-3 e MERS (Middle-East respiratory syndrome; mortalità di poco superiore al 35%) nel 2012, ne favoriscono una maggiore trasmissibilità ed un più complesso contenimento (2,3). Le diverse strategie adottate fino ad oggi per contenere il dilagare della pandemia (distanziamento sociale, utilizzo delle maschere facciali, igiene delle mani, limitazioni della libertà individuale di movimento e socializzazione) hanno consentito di limitare solo parzialmente la diffusione della pandemia, cosicché la vaccinazione è universalmente ritenuta l'opzione più efficace per governare la transizione dallo status pandemico a quello endemico o, auspicabilmente, alla completa eradicazione del virus (4,5).

In tutto l'ambito decisionale clinico, gli esami di

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Sezione di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria di Verona, Piazzale L.A. Scuro, 10, 37134 Verona, Tel 0039-045-8122970, E-mail giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 21.01.2021 Revisionato: 21.02.2021 Accettato: 21.01.2021

Pubblicato on-line: 22.01.2021 DOI: 10.19186/BC_2021.002

laboratorio rivestono un'importanza essenziale come supporto allo screening, alla diagnosi, alla valutazione prognostica e al monitoraggio terapeutico (6), e COVID-19 rappresenta un paradigma di questo concetto (7-10). L'analisi sierologica, in particolare, riflettendo convenzionalmente un contatto tra sistema immunitario dell'ospite e patogeno, consente di dedurre un ampio spettro di informazioni cliniche, come descritto in dettaglio nel paragrafo seguente.

LA RISPOSTA ANTICORPALE CONTRO SARS-COV-2

Analogamente ad altre malattie infettive, la reazione dell'organismo al contatto (naturale, quindi conseguente ad un'infezione, o artificiale per effetto di un vaccino) con SARS-CoV-2 o sue componenti genera due tipi di risposta immunitaria, genericamente classificati come cellulare ed umorale. La risposta immunitaria cellulo-mediata non è oggetto di questo documento, e non sarà quindi analizzata in dettaglio, anche se è sempre più evidente la sua importanza sia dal punto di vista fisiopatologico che per ricadute di diagnostica clinica. La risposta umorale, si basa invece sulla generazione di anticorpi diretti contro determinanti antigenici del patogeno, così contribuendo a ridurre la capacità di legame ai recettori dell'ospite (neutralizzazione) e/o creare immunocomplessi con il virus, che possano poi essere catturati ed eliminati con meccanismi mediati dalle cellule del sistema immunitario. In linea generale, la reazione immunitaria ai patogeni respiratori di natura virale si caratterizza per la comparsa di immunoglobuline (Ig) di classe IgM (pentameriche, rapide e poco specifiche), IgG (monomeriche, solitamente più tardive ma più specifiche) ed IgA (presenti in forma monomerica nel circolo ematico e, in forma dimerica, alla superficie delle mucose), mentre la generazione di immunoglobuline di classe IgE e IgD appare complessivamente meno rilevante dal punto di vista biologico e/o clinico (11).

Al contrario di una classica infezione virale, la risposta umorale a seguito di un'infezione da SARS-CoV-2 è caratterizzata da entità e cinetica che assumono contorni paradigmatici, virtualmente esclusivi. Nella fattispecie, esistono solide evidenze scientifiche secondo cui la generazione complessiva (dall'esordio dei sintomi fino ad oltre 1 mese dall'infezione) di anticorpi specifici di classe IgM sia incostante in pazienti con infezione da SARS-CoV-2, presente in circa il 50-70% dei casi, come sintetizzato in una meta-analisi del Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group (12). Questi dati sono del tutto sovrapponibili a quelli riportati da una seconda e più recente meta-analisi (13). Al contrario delle IgM, la risposta delle IgG specifiche anti-SARS-CoV-2 appare più frequente (presente fino al 100% dei casi), più sostenuta (il livello anticorpale è generalmente più elevato di quello delle IgM), non meno precoce (compaiono pressoché contemporaneamente alle IgM) e duratura (persiste per mesi, mentre quello delle IgM tende a declinare considerevolmente dopo 30-45 giorni dalla comparsa dei sintomi d'infezione) (14,15). Un analogo comportamento è stato descritto per le IgA sieriche le quali, oltre ad avere un valore circolante che correla sommariamente con quello secretivo (16,17), hanno prevalenza e cinetica sovrapponibili a quelle delle IgG, ed anche il loro valore sembra correlare con la severità clinica della patologia (18). In linea generale, la siero-positivizzazione dipende strettamente dal tempo intercorso dai sintomi. Nella meta-analisi pubblicata dal Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group, la sensibilità delle diverse classi di Ig aumenta progressivamente nel corso del tempo, così come illustrato in Figura 1 (12); come detto, tali dati sono del tutto sovrapponibili a quelli riportati da una seconda e più recente meta-analisi (13).

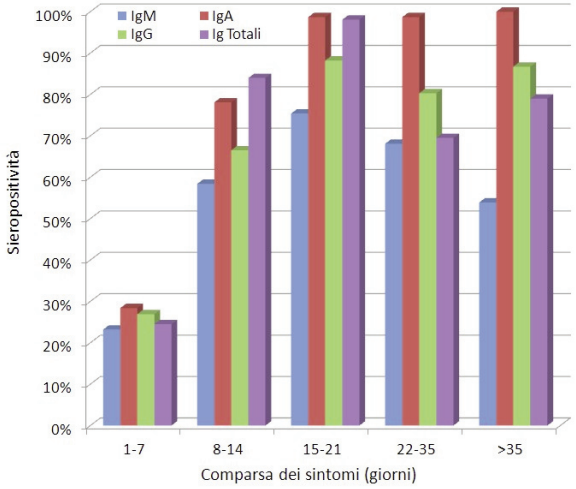

Figura 1.
Cinetica di sieropositività delle differenti classi di immunoglobuline (Ig) in funzione del tempo intercorso dalla comparsa dei sintomi di COVID-19 (coronavirus disease 2019) (da ref 12, modificata).

E' altresì interessante notare come la frequenza di comparsa delle Ig specifiche sembra associarsi alla sintomatologia clinica. Nello specifico, in soggetti con infezione prevalentemente asintomatica da SARS-CoV-2 la comparsa di anticorpi specifici è considerevolmente inferiore (19), indipendentemente dal metodo utilizzato o dalla classe di anticorpi analizzata (20), compresi gli anticorpi neutralizzanti (21). Contestuale a questa valutazione è l'osservazione che la severità clinica di COVID-19 sembra associarsi frequentemente a livelli elevati di tutte le classi anticorpali, come confermato da varie pubblicazioni in materia (22-24).

L'efficacia clinica nel prevenire l'infezione, la re-infezione e la potenziale trasmissione del virus rappresenta l'aspetto essenziale della immunità umorale contro SARS-CoV-2 (25). Malgrado non esistano ancora prove solide e definitive, alcuni studi recenti suggeriscono che la comparsa di immunità naturale (infezione) o vaccinale, potrebbe conferire una buona

protezione contro il contagio (attivo o passivo) con stipiti virali che non abbiano subito eccessive mutazioni genetiche rispetto allo stipite originario, e che abbiano pertanto una struttura molecolare sufficientemente simile a quella contro cui il soggetto si è immunizzato (5,26-28). La durata di questa copertura anticorpale è ancora oggetto di studio. Alla luce delle evidenze preliminari disponibili al momento di redigere questo documento, si ritiene che essa possa durare non meno di 3-6 mesi, e sia probabilmente maggiore in soggetti con livello anticorpale di base più elevato, così come si osserva solitamente a seguito di un'infezione clinicamente più severa o di una risposta vaccinale più efficiente (29-32). A causa della relativamente recente insorgenza di COVID-19, sono ancora vaghe le informazioni relative ad efficienza e durata della memoria immunitaria (comprendente la selezione clonale dei linfociti B) e dell'immunità cellulare, per le quali è legittimo supporre che le conoscenze scientifiche evolvano nel corso delle prossime settimane o dei prossimi mesi, ma certamente lo studio dell'immunità cellulare darà risposte importanti nella comprensione delle diverse espressioni fenotipiche della malattia.

Sarà altresì necessario verificare costantemente se e come gli immunodosaggi attualmente in uso siano in grado di riconoscere tutti gli anticorpi anti-SARS-CoV-2 generati in pazienti infettati da nuove varianti del virus (33), soprattutto quelle recanti mutazioni che alterano significativamente struttura e immunogenicità di proteina S e/o receptor binding domain (RBD; mutazione E484K, ad esempio) (Figura 2) (29).

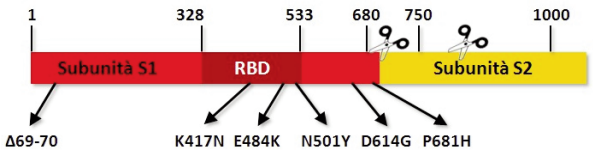

Figura 2.
Sequenza della proteina spike (S) di SARS-CoV-2 (severe acute respiratory disease coronavirus 2), comprendente il receptor binding domain (RBD), con indicazione delle mutazioni più recenti in grado di modificare struttura, antigenicità e/o funzione della proteina.

PRESUPPOSTI ANALITICI DEGLI IMMUNODOSAGGI

Per far fronte all'urgente e consistente domanda di test per il rilevamento di anticorpi specifici anti-SARS-CoV-2, l'industria del diagnostico ha sviluppato ed introdotto in commercio un considerevole numero di metodi immunometrici (34,35), caratterizzati da spiccata eterogeneità per quanto concerne:

- matrice biologica (sangue venoso o capillare, saliva, ecc.);
- classe anticorpale rilevata (anticorpi totali, IgM, IgG, IgA);
- determinante antigenico di SARS-CoV-2 riconosciuto dagli anticorpi (proteina N o S, RBD)
- tecnica analitica di rilevamento (CGIA, CLIA, ELISA, LFA, immunocromatografia, ecc.) (Figura 3);
- sensibilità analitica (limite di rilevamento, sensibilità funzionale);
- prestazioni diagnostiche (sensibilità, specificità, concordanza con test di neutralizzazione);
- disponibilità per diagnostica decentrata, possibilità di automazione;
- espressione del risultato (qualitativo, semi-quantitativo quantitativo);
- tipologia di validazione e/o certificazione.

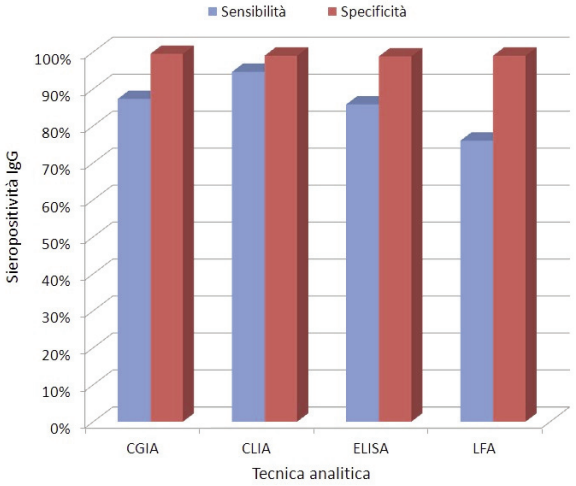

Figura 3.
Sensibilità e specificità rispetto all'analisi molecolare su tampone nasofaringeo delle differenti tecniche diagnostiche per determinazione delle immunoglobuline di classe G (IgG) contro SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) (da ref 12, modificata).
CGIA, colloidal gold immunoassay; CLIA, chemiluminescence immunoassay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; LFA, lateral flow assay.

Come evidenziato da una recente indagine condotta dal College of American Pathologists (CAP), su oltre 1100 laboratori clinici statunitensi, la problematica relativa alla tuttora insufficiente standardizzazione dei metodi si riflette in una poco soddisfacente confrontabilità dei risultati, anche quando essi siano espressi solo qualitativamente (36). In particolare, si è evidenziato come a fronte di una concordanza complessiva di poco superiore al 90% tra oltre 15 differenti metodi commerciali, la sensibilità diagnostica in un siero con livello di IgG anti-SARS-CoV-2 di poco superiore al valore soglia variava da 0 a 100%. Peggiore concordanza è stata osservata nel confronto tra immunodosaggi per il rilevamento delle IgM ed IgA specifiche anti-SARS-CoV-2.

La concordanza che gli immunodosaggi oggi disponibili in commercio, e che utilizzano come antigene

la proteina Spike e/o il RBD, presentano nei confronti dei test di neutralizzazione virale, è un aspetto sostanziale. Riportata in molti articoli recenti, la sensibilità delle IgG specifiche anti-SARS-CoV-2 per predire l'attività di neutralizzazione appare nella massima parte dei casi uguale o superiore a 80% (titolo neutralizzante 1:20), con accuratezza diagnostica (area sotto la curva; AUC) compresa tra 0,74 e 0,99 (37-41). L'utilizzo di alcuni di questi immunodosaggi, nello specifico quelli le cui prestazioni analitiche siano state idoneamente verificate, può quindi rappresentare un valido surrogato (ad esempio come tecnica di screening) dei test di neutralizzazione, la cui disponibilità su larga scala ed in tempi rapidi permane tuttora limitata, anche per le modalità operative che impongono adozione di livelli elevati di biosicurezza.

Oltre che nei siti istituzionali della Commissione Europea (42) e della Food and Drug Administration (43), un elenco aggiornato delle diverse tecniche immunometriche e delle rispettive caratteristiche è disponibile in alcuni siti, quali FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics) (44) e COVID-19 Evidence Commons (45). Senza voler entrare nel merito specifico dei vantaggi e svantaggi legati alle diverse caratteristiche degli immunodosaggi, il Gruppo Operativo su COVID-19 di SIBioC, ritiene quindi opportuno formulare le sottoelencate raccomandazioni (*ad interim*) relative all'introduzione, utilizzo clinico e governance delle tecniche immunometriche per il rilevamento e/o la quantificazione di anticorpi anti-SARS-CoV-2.

RACCOMANDAZIONI (*AD INTERIM*)

Definizione operativa

1. Si definisce "analisi sierologica" per SARS-CoV-2 la valutazione della risposta immunitaria umorale basata sulla ricerca di anticorpi specifici generati dall'organismo contro il virus in risposta ad un'infezione (asintomatica o sintomatica) da SARS-CoV-2, o ad un vaccino anti-COVID-19. Può fare parte di questo ambito diagnostico anche il monitoraggio di anticorpi specifici anti-SARS-CoV-2 somministrati a scopo terapeutico (plasma iperimmune, terapie con anticorpi monoclonali).

Uso clinico degli esami sierologici

1. L'analisi sierologica di norma non è utilizzata per la diagnosi d'infezione da SARS-CoV-2. Può affiancare l'analisi molecolare solo in circostanze specifiche (ripetuta negatività agli esami molecolari contestualmente a elevato sospetto clinico).
2. L'analisi sierologica è quindi essenzialmente rivolta a:
   2.1 monitoraggio clinico dell'infezione da SARS-CoV-2 (il livello anticorpale correla solitamente con la gravità clinica) (46);
   2.2 stima della prevalenza dell'infezione in un determinato contesto geografico e/o di popolazione (operatori sanitari, pazienti oncologici, ospiti di residenze sanitarie assistenziali, e così via) nei 3-6 mesi precedenti al campionamento (47,48);
   2.3 diagnosi retrospettiva in pazienti asintomatici o paucisintomatici, che non abbiano richiesto visite ed esami al momento dell'infezione (49);
   2.4 accertamento di sieronegatività pre-vaccinale (25);
   2.5 accertamento e monitoraggio della siero-positivizzazione post-infettiva e post-vaccinale (25);
   2.6 monitoraggio di anticorpi anti-SARS-CoV-2 somministrati a scopo terapeutico.

Caratteristiche analitiche

Target antigenico

1. L'utilizzo di immunodosaggi diretti contro l'antigene N (proteina del nucleocapside) o S (proteina spike) è equivalente nell'ambito degli studi di sieroprevalenza (sensibilità diagnostica di 94,4% per IgG anti-proteina S *versus* 93,5% per IgG anti-proteina N) (35), anche se è dimostrata una maggior permanenza di positività utilizzando immunodosaggi basati sulla proteina S o, più precisamente, su RBD.
2. La definizione e/o il monitoraggio del potenziale neutralizzante degli anticorpi generati in risposta ad infezione o vaccino deve utilizzare immunodosaggi basati sull'antigene S (proteina spike, trimerica) e/o RBD.
3. Il target antigenico contenuto nell'immunodosaggio deve essere sistematicamente monitorato ed eventualmente ridefinito dai produttori in funzione dell'insorgenza di nuove varianti recanti variazioni dei target della risposta antigenica. Deve quindi anche essere considerata la possibilità che i test correntemente in uso che rilevano anticorpi contro la proteina Spike e/o il RBD di SARS-CoV-2 possano generare risultati falsamente negativi in soggetti infettati da nuove varianti antigeniche (Figura 2) (50,51).

Classe di immunoglobuline

1. Gli studi di sieroprevalenza devono basarsi su immunodosaggi che valutano le immunoglobuline di classe IgG, o su metodi che prevedano la determinazione degli anticorpi "totali".
2. L'utilizzo di immunodosaggi che valutano le immunoglobuline di classe IgA può essere utile in aggiunta a quelli che valutano le IgG, poiché il loro livello sierico/plasmatico dimostra discreta correlazione con quelle secretive.
3. L'utilizzo di immunodosaggi che valutano le immunoglobuline di classe IgM, malgrado esse partecipino comunque all'attività neutralizzante, non è consigliato sia a scopo diagnostico e/o per gli studi di sieroprevalenza.

Caratteristiche dell'immunodosaggio

1. Gli immunodosaggi che forniscono risultati quantitativi sono generalmente preferibili a quelli semi-quantitativi o qualitativi.
2. Il siero-monitoraggio periodico deve essere sempre eseguito utilizzando lo stesso immunodosaggio, sulla medesima piattaforma analitica.
3. Qualora sia necessaria la determinazione di un elevato numero di campioni, si suggerisce l'utilizzo di tecniche automatizzate su piattaforme ad elevata produttività.

Validazione analitica e clinica

1. Tutti gli immunodosaggi volti alla determinazione di anticorpi anti-SARS-CoV-2 devono essere oggetto di validazione (nel caso non sia stata validata allo scopo d'uso dal produttore, in accordo a protocolli riconosciuti a livello internazionale) o verificata (se già validata dal produttore) in accordo a procedure conformi ai requisiti della norma ISO 15189:2012 dai Professionisti di Medicina di Laboratorio. I protocolli di validazione e verifica devono fornire evidenza oggettiva dell'adeguatezza delle prestazioni analitiche e diagnostiche ottenute, prima della loro introduzione in commercio. Si consiglia in particolare di valutare:
   1.1 Sensibilità diagnostica: calcolata su un numero sufficiente di pazienti con diagnosi molecolare di infezione da SARS-CoV-2 (non meno di 200 campioni, equamente distribuiti in funzione della comparsa dei sintomi, come descritto in seguito), ed espressa in funzione del periodo intercorso dalla comparsa dei sintomi. In aggiunta alla sensibilità complessiva, si suggerisce di riportare quindi la sensibilità diagnostica secondo questa tempistica: 0-7 giorni (50 campioni), 8-14 giorni (50 campioni), 15-30 giorni (50 campioni), 31-180 giorni (50 campioni).
   1.2 Specificità diagnostica: calcolata su un numero sufficiente di soggetti di riferimento ("sani") (non meno di 200), arruolati in periodo pre-pandemico (almeno antecedenti a Settembre 2019 o già identificati come "negativi" per anticorpi anti-SARS-CoV-2 utilizzando procedure analitiche validate) e campioni di pazienti con possibili interferenze (malattie autoimmuni, altre infezioni da coronavirus diversi).
   1.3 Definizione dell'accuratezza diagnostica: espressa come "accordo" (agreement, kappa statistics) e/o AUC della curva ROC (Receiver Operating Characteristics), utilizzando i risultati dei campioni di cui ai precedenti due punti.
   1.4 Valore soglia (per metodi quantitativi): il limite decisionale indicato dal produttore deve essere confermato localmente sulla base del punto precedente (sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi della curva ROC).
   1.5 Imprecisione (per metodi quantitativi): l'imprecisione intra- ed inter-serie espressa dal produttore deve essere verificata localmente su almeno due livelli (uno negativo ed uno positivo), utilizzando i protocolli in uso per l'accreditamento delle procedure analitiche di laboratorio secondo i requisiti della norma International Organization for Standardization (ISO) 15189:2012 e Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
   1.6 Linearità (per metodi quantitativi): la linearità documentata dal produttore deve essere verificata localmente nell'ambito dei livelli clinicamente rilevanti di immunoglobuline specifiche anti-SARS-CoV-2, utilizzando i protocolli in uso per l'accreditamento delle procedure analitiche di laboratorio secondo i requisiti della norma ISO 15189:2012.

Introduzione nella pratica clinica

1. L'introduzione nella pratica clinica, per ogni possibile utilizzo, deve essere concordata tra Professionisti di Medicina di Laboratorio, Clinici e componenti della Direzione Sanitaria/Medica, basandosi su algoritmi validati che prevedano l'eventuale attivazione di esami "a cascata" (ad esempio determinazione quantitativa a seguito di quella qualitativa, valutazione del potenziale neutralizzante, analisi molecolare, sequenziamento) (52).
2. L'esecuzione dell'esame su matrici alternative a quelle convenzionalmente indicate dal produttore (ad esempio saliva, sangue capillare, altri liquidi biologici) deve essere accuratamente validato prima dell'utilizzo (53).
3. Nei protocolli di siero-monitoraggio vaccinale, la determinazione anticorpale dovrebbe seguire una tempistica ben definita, ad esempio (25):
   3.1 nel periodo immediatamente antecedente (da 1 a 7 giorni) la somministrazione della prima dose del ciclo vaccinale;
   3.2 da 1 a 2 settimane dopo la somministrazione dell'ultima dose del ciclo vaccinale (se multiple);
   3.3 ogni 3 mesi successivi alla somministrazione dell'ultima dose del ciclo vaccinale (se multiple), fino a completa negativizzazione sierologica.
4. Qualora siano utilizzate tecniche diagnostiche rapide (manuali o "point of care"), è necessario stilare delle procedure operative per il loro utilizzo, supervisionate da personale esperto di Medicina di Laboratorio.

Controllo di qualità

1. Gli immunodosaggi devono essere soggetti a protocolli di controllo di qualità interno (CQI) e verifica esterna di qualità (VEQ), per monitorare costantemente le prestazioni (54), gestiti in conformità ai requisiti della norma ISO 15189:2012.
   1.1 CQI: in aggiunta al controllo interno, si consiglia di utilizzare un materiale di terza parte (diverso da quello del produttore) e/o campioni di siero o plasma di pazienti idoneamente conservati (ad esempio congelati a -70°C);
   1.2 VEQ: si consiglia di aderire a programmi di VEQ

gestiti da provider di terza parte di comprovata competenza, che includano materiali di produttori di comprovata esperienza e/o qualità in ambito di VEQ.

Espressione dei risultati

1. Il fruitore del risultato dell'esame (paziente, genitore nel caso di minori, clinico, altro operatore sanitario) deve essere informato e conoscere il significato clinico dell' esame e le possibili criticità legate alla generazione di falsi positivi e/o negativi in relazione alla tecnica utilizzata.
2. I risultati devono essere espressi sempre evidenziando la "negatività" o "positività" sierologica, riportando auspicabilmente anche il livello anticorpale (se metodo quantitativo e con unità rapportabili a SI).
3. I risultati devono essere introdotti (preferibilmente in automatico) nel sistema informatico del laboratorio e/o della struttura sanitaria, garantendone accessibilità mediante fascicolo sanitario elettronico.
4. Il referto deve contenere indicazioni chiare su:
   4.1 metodo utilizzato (FIA, CLIA, ELISA, cromatografico, etc.);
   4.2 classe anticorpale (anticorpi totali, IgG, IgM, IgA);
   4.3 target antigenico (proteina N o S, RBD);
   4.4 livello (valore sierico o plasmatico) anticorpale (se metodo quantitativo);
   4.5 unità di misura (se metodo quantitativo);
   4.6 valore soglia di positività (se metodo quantitativo).
5. In assenza di una sufficiente standardizzazione, i risultati generati da immunodosaggi differenti non devono essere comparati, né utilizzati in alternativa uno all'altro nel monitoraggio a medio o lungo termine della sieroconversione.
6. Qualora siano utilizzate tecniche diagnostiche rapide (manuali o "point of care"), l'utilizzatore deve essere adeguatamente formato all'esecuzione dell'esame , alla verifica di qualità, e all'interpretazione analitica e clinica del risultato, soprattutto se il metodo è qualitativo (comparsa della banda di controllo, intensità della banda, ecc.), prevedendo consulenza da parte dei Professionisti di Medicina di Laboratorio.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

Tabella sinottica delle raccomandazioni *ad interim*

Definizione operativa di analisi sierologica	Valutazione della risposta immunitaria umorale tramite ricerca di anticorpi (ab) specifici antivirali in risposta ad un'infezione da SARS-CoV-2, o ad un vaccino anti-COVID-19 o per monitoraggio terapeutico (plasma iperimmune, ab monoclonali)
Uso clinico	- monitoraggio clinico dell'infezione - stima di prevalenza in segmenti specifici di popolazione - diagnosi retrospettiva in pazienti a- o pauci-sintomatici - accertamento di siero-negatività pre-vaccinale - monitoraggio siero-positivizzazione post-infettiva o post-vaccinale - monitoraggio terapeutico (plasma iperimmune, ab monoclonali) - non usare di norma a scopo diagnostico
Caratteristiche analitiche	Target antigenico - l'antigene (ag) S e N sono considerati equivalenti (simile sensibilità diagnostica) - gli ab neutralizzanti vanno determinati con saggi basati su proteina S e/o RBD - i produttori devono garantire il monitoraggio e l'eventuale ridefinizione del target in funzione delle nuove varianti Classe di Immunoglobuline - devono essere determinate le IgG (in alternativa gli ab totali) - la determinazione delle IgA può essere utile - la determinazione delle IgM è sconsigliata Caratteristiche del saggio - preferire i saggi quantitativi rispetto ai qualitativi o semi-quantitativi - il monitoraggio deve essere eseguito con lo stesso saggio e sulla stessa piattaforma analitica - in caso di elevata numerosità, preferire piattaforme ad elevata produttività Validazione analitica e clinica - i saggi devono essere validati o verificati in accordo alla norma ISO 15189:2012. Devono essere valutati: sensibilità, specificità e accuratezza diagnostica; valore soglia decisionale; imprecisione; linearità.
Introduzione nella pratica clinica	Deve essere concordata tra i Professionisti della MdL, i Clinici e la Direzione Sanitaria/Medica Le matrici alternative (saliva, sangue capillare) devono essere attentamente valutate Definire accuratamente la tempistica del monitoraggio vaccinale: - 1-7 giorni prima della prima dose - 1-2 settimane dopo l'ultima dose - ogni 3 mesi successivi fino alla siero-negativizzazione Per le tecniche diagnostiche rapide devono essere stilate procedure operative supervisionate da professionisti della MdL
Controllo di Qualità	CQI: utilizzare anche materiale di terza parte e/o campioni di pazienti debitamente conservati VEQ: adesione a programmi gestiti da provider di terza parte di provata competenza
Espressione dei risultati	Il fruitore del risultato deve essere debitamente informato e conoscere il significato clinico e le possibili criticità dell'esame Evidenziare sempre la negatività o positività sierologica, riportando possibilmente il livello ab Inserire i risultati nel sistema informatico e garantirne l'accessibilità mediante fascicolo sanitario elettronico Il referto deve contenere: il metodo utilizzato, la classe ab determinata, il target ag, il livello ab, le unità di misura, il valore soglia di positività In situazione di carente standardizzazione, i risultati generati da metodi diversi non possono essere comparati tra di loro, né i diversi metodi possono essere utilizzati alternativamente In caso di metodiche "rapide", queste devono essere eseguite da personale debitamente formato alla esecuzione e alla interpretazione dell' esame, e deve essere prevista la consulenza da parte di Professionisti della MdL

ab, anticorpo; ag, antigene; MdL, medicina di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Istituto Superiore di Sanità. Le Pandemie Influenzali del Ventesimo Secolo. Disponibile su: https://www.epicentro.iss.it/passi/storiePandemia: ultimo accesso: Gennaio 2021.
2. Lippi G, Plebani M. The novel coronavirus (2019-nCoV) outbreak: think the unthinkable and be prepared to face the challenge. Diagnosis (Berl) 2020 26;7:79-81.
3. Ganesh B, Rajakumar T, Malathi M, et al. Epidemiology and pathobiology of SARS-CoV-2 (COVID-19) in comparison with SARS, MERS: An updated overview of current knowledge and future perspectives. Clin Epidemiol Glob Health 2021 doi: 10.1016/j.cegh.2020.100694.
4. Lavine JS, Bjornstad ON, Antia R. Immunological characteristics govern the transition of COVID-19 to endemicity. Science 2021 doi: 10.1126/science.abe6522.
5. Connors M, Graham BS, Lane HC, et al. SARS-CoV-2 Vaccines: much accomplished, much to learn. Ann Intern Med 2021 doi: 10.7326/M21-0111.
6. Lippi G, Plebani M. A modern and pragmatic definition of Laboratory Medicine. Clin Chem Lab Med 2020;58:1171.
7. 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;58:1063-9.
8. Bohn MK, Lippi G, Horvath A, et al. Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19: IFCC taskforce evaluation of the latest evidence. Clin Chem Lab Med 2020;58:1037-52.
9. Plebani M. Il valore della medicina di laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2. Biochim Clin 2020;44:SS1 1-2.
10. Lippi G, Salvagno GL, Mattiuzzi C. Guida sintetica alla diagnostica della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19). Biochim Clin 2020;44:SS1 3-4.
11. Fierz W. Basic problems of serological laboratory diagnosis. Methods Mol Med 2004;94:393-427.
12. Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. Cochrane Database Syst Rev 2020;6:CD013652.
13. Wang H, Ai J, Loeffelholz MJ, et al. Meta-analysis of diagnostic performance of serology tests for COVID-19: impact of assay design and post-symptom-onset intervals. Emerg Microbes Infect 2020;9:2200-11.
14. Bohn MK, Loh TP, Wang CB, et al. IFCC Interim Guidelines on serological testing of antibodies against SARS-CoV-2. Clin Chem Lab Med 2020;58:2001-8.
15. Post N, Eddy D, Huntley C, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. PLoS One 2020;15:e0244126.
16. Pisanic N, Randad PR, Kruczynski K, et al. COVID-19 Serology at population scale: SARS-CoV-2 specific antibody responses in saliva. J Clin Microbiol 2020;59:e02204-20.
17. Crawford KHD, Dingens AS, Eguia R, et al. Dynamics of neutralizing antibody titers in the months after SARS-CoV-2 infection. J Infect Dis 2020 doi: 10.1093/infdis/jiaa618.
18. Lippi G, Mattiuzzi C. Clinical value anti-SARS-COV-2 serum IgA titration in patients with COVID-19. J Med Virol 2020 doi: 10.1002/jmv.26539.
19. Liu ZL, Liu Y, Wan LG, et al. Antibody profiles in mild and severe cases of COVID-19. Clin Chem 2020;66:1102-4.
20. Wolff F, Dahma H, Duterme C, et al. Monitoring antibody response following SARS-CoV-2 infection: diagnostic efficiency of 4 automated immunoassays. Diagn Microbiol Infect Dis 2020;98:115140.
21. Chen X, Pan Z, Yue S, et al. Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. Signal Transduct Target Ther 2020;5:180.
22. Caturegli G, Materi J, Howard BM, et al. Clinical validity of serum antibodies to SARS-CoV-2: A Case-Control study. Ann Intern Med 2020;173:614-2.
23. Plebani M, Padoan A, Negrini D, et al. Diagnostic performances and thresholds: The key to harmonization in serological SARS-CoV-2 assays? Clin Chim Acta 2020;509:1-7.
24. Lucas C, Klein J, Sundaram M, et al. Kinetics of antibody responses dictate COVID-19 outcome. medRxiv [Preprint]. 2020. doi: 10.1101/2020.12.18.20248331.
25. Lippi G, Sciacovelli L, Trenti T, et al. Cinetica e caratteristiche biologiche della risposta umorale all'infezione da SARS-CoV-2: implicazioni vaccinali. Biochim Clin 2021 doi: 10.19186/BC_2021.001.
26. Mahase E. Covid-19: Past infection provides 83% protection for five months but may not stop transmission, study finds. BMJ 2021;372:n124.
27. Ledford H. COVID reinfections are unusual - but could still help the virus to spread. Nature 2021 doi: 10.1038/d41586-021-00071-6.
28. Sewell HF, Agius RM, Kendrick D, et al. Stewart M. Covid-19 vaccines: delivering protective immunity. BMJ 2020;371:m4838.
29. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. Nature 2021 doi: 10.1038/s41586-021-03207-w.
30. Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. Science 2021 doi: 10.1126/science.abf4063.
31. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. N Engl J Med 2020;383:2603-15.
32. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. N Engl J Med 2020 doi: 10.1056/NEJMoa2035389.
33. Mahase E. Covid-19: What new variants are emerging and how are they being investigated? BMJ 2021;372:n158.
34. Yang Z, Wu J, Ye F, et al. Expert consensus-based laboratory testing of SARS-CoV-2. J Thorac Dis 2020;12:4378-90.
35. Kontou PI, Braliou GG, Dimou NL, et al. Antibody tests in detecting SARS-CoV-2 infection: A Meta-analysis. Diagnostics (Basel) 2020;10:319.
36. Tacker DH, Bashleben C, Long TC, et al. Inter-laboratory agreement of anti-severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) serologic assays in the Expedited College of American Pathologists Proficiency Testing Program. Arch Pathol Lab Med 2021 doi: 10.5858/arpa.2020-0811-SA.
37. Patel EU, Bloch EM, Clarke W, et al. Comparative performance of five commercially available serologic assays to detect antibodies to SARS-CoV-2 and identify individuals with high neutralizing titers. J Clin Microbiol 2020 doi: 10.1128/JCM.02257-20.
38. Tang MS, Case JB, Franks CE, et al. Clin Chem 2020 doi: 10.1093/clinchem/hvaa211.
39. Rychert J, Couturier MR, Elgort M, et al. Evaluation of three SARS CoV-2 IgG antibody assays and correlation with neutralizing antibodies. J Appl Lab Med 2020 doi: 10.1093/jalm/jfaa188.
40. Bal A, Pozzetto B, Trabaud MA, et al. Evaluation of high-throughput SARS-CoV-2 serological assays in a longitudinal cohort of patients with mild COVID-19: clinical sensitivity, specificity and association with virus neutralization test. Clin Chem 2021 doi: 10.1093/clinchem/hvaa336.

41. Padoan A, Bonfante F, Pagliari M, et al. Analytical and clinical performances of five immunoassays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in comparison with neutralization activity. EBioMedicine 2020;62:103101.
42. Commissione Europea. COVID-19 In vitro diagnostic devices and test methods database. Disponibile su: https://covid-19-diagnostics.jrc.ec.europa.eu/devices. Ultimo accesso: Gennaio 2021.
43. Food and Drug Administration. EUA Authorized Serology Test Performance. Disponibile su: https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance. Ultimo accesso: Gennaio 2021.
44. Foundation for Innovative New Diagnostics. Disponibile su: https://finddx.shinyapps.io/COVID19DxData/. Ultimo accesso: gennaio 2021.
45. COVID-19 Evidence Commons. Disponibile su: https://chs.asu.edu/diagnostics-commons/evidence-commons. Ultimo accesso: Gennaio 2021.
46. Lippi G, Plebani M. SARS-CoV-2 antibodies titration: a reappraisal. Ann Transl Med 2020;8:1032.
47. Lippi G. Potential drawbacks of SARS-COV-2 seroprevalence surveys. J Hosp Infect 2020 doi: 10.1016/j.jhin.2020.12.011.
48. Plebani M. SARS-CoV-2 antibody-based SURVEILLANCE: New light in the SHADOW. EBioMedicine 2020;61:103087.
49. Lippi G, Henry BM, Sanchis-Gomar F. Potential drawbacks of frequent asymptomatic coronavirus disease 2019 (COVID-19) testing. Infect Control Hosp Epidemiol 2020 doi: 10.1017/ice.2020.1305.
50. Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, et al. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. bioRxiv 2021 doi: https://doi.org/10.1101/2021.01.15.426911.
51. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma bioRxiv 2021 doi: 10.1101/2021.01.18.427166.
52. Xu G, Emanuel AJ, Nadig S, , et al. Evaluation of orthogonal testing algorithm for detection of SARS-CoV-2 IgG antibodies. Clin Chem. 2020. doi: 10.1093/clinchem/hvaa210.
53. Lippi G, Plebani M. Opportunities and drawbacks of nonstandard body fluid analysis. Clin Chem Lab Med 2017;55:907-9.
54. Haselmann V, Özçürümez MK, Klawonn F, et al. Results of the first pilot external quality assessment (EQA) scheme for anti-SARS-CoV2-antibody testing. Clin Chem Lab Med 2020;58:2121-30.