

L'idea di affrontare la problematica dei metodi per la determinazione degli anticorpi circolanti anti-SARS-CoV-2 ha cominciato a farsi strada fin dalla comparsa sul mercato italiano dei primi kit commerciali eseguibili su immunoanalizzatori automatici e si è consolidata nel corso del mese di aprile, quando altri metodi sono stati resi disponibili e hanno cominciato a essere distribuiti e utilizzati nel nostro paese. Oltre a seguire con attenzione le potenzialità applicative e le prestazioni cliniche che andavano emergendo (e tuttora continuano a emergere), il nostro interesse, come professionisti dediti ai metodi di *ligand assay* e al loro utilizzo in Medicina di laboratorio, era volto in particolare a comprendere le caratteristiche di questo tipo di metodi, la loro "architettura" interna, tipica dei saggi immunometrici, e a cercare di approfondire quegli aspetti che potessero risultare utili per orientarne l'impiego in campo diagnostico ed epidemiologico.

Fin da subito ci è stato chiaro che la nostra attenzione si sarebbe rivolta a quei metodi immunometrici che sono in grado di fornire una **risposta analitica** (anche se non sempre una misura...) di tipo quantitativo, escludendo quindi dalla nostra analisi i metodi rapidi immunocromatografici, la cui risposta ricade in un ambito di tipo qualitativo. Abbiamo quindi preso in esame i metodi immunometrici che possono essere eseguiti su immunoanalizzatori automatici, caratterizzati nel loro insieme da un segnale di tipo chemiluminescente, e i metodi ELISA, eseguibili manualmente o su piattaforme strumentali dedicate all'esecuzione di metodi immunoenzimatici in micropiastra. Per condurre la nostra indagine e redigere le schede descrittive dei singoli metodi ci siamo avvalsi di quanto riportato nelle istruzioni per l'uso (IFU) dei metodi stessi e successivamente, in fase di revisione, della collaborazione dei referenti delle diverse Aziende, che ringraziamo per la disponibilità dimostrata.

Con la preparazione delle schede comparative dei metodi ci siamo proposti di offrire un agile strumento di consultazione a tutti coloro che si accingono a utilizzare queste tecniche per valutare la risposta anticorpale al SARS-CoV-2 e intendono avvalersi dei risultati di tali indagini nell'ambito dell'attività diagnostico-clinica e/o per studi di sieroprevalenza da effettuare sulla popolazione generale o in sottopopolazioni caratterizzate da un elevato rischio infettivo, quale ad esempio il personale sanitario.

In queste schede sono riassunte le caratteristiche da noi ritenute più significative ai fini di una caratterizzazione e comparazione dei metodi. Per realizzare ciò è stato necessario, per alcune voci presenti in tabella, procedere a una sorta di "armonizzazione" delle specifiche riportate nelle IFU, ovviamente sempre nel pieno rispetto di quanto in esse contenuto, definendo dei criteri oggettivi e condivisi atti a descrivere i metodi e a interpretare in modo omogeneo le informazioni.

Al termine del lavoro, e in base all'esame complessivo delle schede, ci pare che emergano alcuni aspetti che riteniamo valga la pena di sottolineare.

Innanzitutto appare evidente la rapidità e anche la determinazione con cui le Aziende produttrici di IVD si sono attivate per mettere a punto, produrre e immettere sul mercato i metodi immunometrici necessari alla determinazione degli anticorpi circolanti anti-SARS-CoV-2. Questa risposta all'improvvisa e drammatica situazione venutasi a creare con il diffondersi della pandemia ha visto coinvolte e impegnate le Aziende assai diverse, sia come collocazione geografica, sia come dimensioni e caratteristiche produttive, all'insegna, contemporaneamente, del *global* e del *glocal*. Si va, infatti, dalle multinazionali operanti *worldwide*, alla piccola-media impresa nata come *spin off* universitario e passata successivamente per lo stadio di *start-up* innovativa. Questo fatto (e il numero delle proposte già presenti sul mercato, a cui ben presto altre seguiranno) testimonia della vitalità e capacità del settore che ci si augura possa conservarsi tale, nonostante la difficile congiuntura.

Un aspetto sicuramente rilevante è la notevole eterogeneità degli approcci seguiti per la messa a punto dei metodi, sia per quanto riguarda l'architettura dei sistemi analitici, sia in particolare per le scelte effettuate relativamente alle caratteristiche degli anticorpi oggetto di misura.

Riguardo a quest'ultimo aspetto, differenti sono le classi anticorpali (isotipi) prese in considerazione (IgG, IgM, IgA) e differenti sono gli approcci seguiti: determinazione mirata a rilevare un unico isotipo, piuttosto che due (IgM+IgA) o tutti contemporaneamente.

Anche le scelte operate riguardo alla specificità idiotipica risultano differenti. Infatti, a seconda del metodo, sono stati utilizzati come antigeni di cattura le proteine ricombinanti di SARS-CoV-2: il nucleocapside (proteina N) e la proteina spike (proteina S) con i suoi due domini funzionali transmembrana S1 e S2, rispettivamente N- e C-terminale. Come si potrà vedere dalle tabelle, anche in questo caso i formati scelti sono molteplici e risultano finalizzati a mettere in evidenza gli anticorpi diretti contro un solo determinante antigenico o contro più determinanti contemporaneamente. Nel caso di un metodo è stata anche fatta la scelta di utilizzare (previa inattivazione) l'antigene nativo, per far sì che le proteine virali, mantenendo la loro conformazione naturale, fossero in grado di garantire un riconoscimento anticorpale più accurato.

Resta tuttora aperta la questione relativa alla possibilità di misurare gli anticorpi realmente neutralizzanti e di quale metodo sia potenzialmente più indicato a tale scopo. Ipoteticamente i metodi che utilizzano come antigene di cattura la proteina S potrebbero essere candidati a questo ruolo, considerato che il legame tra il dominio S1 e l'enzima di conversione dell'Angiotensina 2 (ACE2), espresso dalla cellula ospite, è responsabile dell'ingresso del SARS-CoV-2 all'interno della cellula, ma alcuni studi hanno messo in luce che esiste concordanza di risultati con il *Plaque Reduction Neutralization Test* (PRNT) anche nel caso di metodi che determinano gli anticorpi diretti contro la proteina N. Per confermare (o smentire) tali ipotesi saranno indubbiamente necessari ulteriori e approfonditi studi su casistiche più ampie di quelle attuali e la concordanza con il PRNT, considerato come metodo *gold standard*, potrà utilmente entrare a far parte delle informazioni contenute nelle IFU dei metodi.

Altro aspetto assai importante che emergerà dalla lettura delle schede è quello relativo al tipo di risultato ottenibile. In sintesi, si può dire che tre sono le modalità utilizzate per l'espressione dei risultati: qualitativa, semiquantitativa, quantitativa.

Quali che siano le scelte adottate, tutti i metodi fanno riferimento a sistemi che effettuano la misura di un segnale (es. RLU, DO), producendo una risposta analitica che, a seconda dei sistemi, compare o meno a livello del report strumentale. La risposta analitica è poi tradotta in risultato mediante differenti sistemi di calibrazione e calcolo, nella maggior parte dei casi avvalendosi di un indice che, secondo i metodi, può assumere denominazioni diverse. Anche in questo caso l'indice può comparire sul report strumentale ed essere utilizzato per l'espressione dei risultati (→ risultato semiquantitativo), o non comparire del tutto, limitando il risultato alle semplici espressioni "reattivo", "non reattivo" (o "dubbio"), esprimendo quindi un risultato di tipo qualitativo. In entrambi i casi l'espressione dei risultati passa attraverso il confronto del valore ottenuto con un valore di cut-off opportunamente scelto sulla base di una casistica di riferimento.

Alcuni metodi utilizzano, per la curva di calibrazione e per il calcolo dei risultati, delle proprie preparazioni anticorpali specifiche a titolo noto, esprimendone la concentrazione in unità arbitrarie (AU/mL) e considerandole a tutti gli effetti equivalenti a uno standard di riferimento. Questo approccio può essere considerato in grado di fornire un risultato di tipo quantitativo, anche se la strada per una misura quantitativa di tale tipo di analiti è sicuramente lunga e complessa e passerà in primo luogo per l'individuazione di materiali di riferimento univocamente definiti e riconosciuti.

Da quanto detto emerge che è senz'altro necessario intraprendere, là dove possibile, un percorso di armonizzazione dei metodi, finalizzato a una migliore confrontabilità dei risultati. Sarebbe però ingiusto,

allo stato attuale delle cose, elevare critiche in questo senso alle Aziende produttrici, considerate le tempistiche assai ristrette che hanno avuto a disposizione per la messa a punto di tali tecniche di analisi. Sarà però utile definire una linea condivisa per un ulteriore sviluppo e miglioramento di questi metodi.

In un'ottica di armonizzazione sarà importante tenere anche conto degli aspetti preanalitici relativi al tipo di campione utilizzabile, al suo trattamento e alle modalità di conservazione. Molto disparate sono infatti le informazioni presenti nelle IFU al riguardo.

Aspetto assai rilevante, per un percorso di armonizzazione e confrontabilità dei metodi, è quello relativo alla disponibilità di materiali di controllo. Infatti, non tutti i produttori sono in grado di fornire dei campioni da utilizzare per il controllo di qualità interno. Tantomeno, al momento, non è disponibile un programma di Verifica Esterna di Qualità, anche se ci risulta che qualcosa in questo senso sia allo studio in ambito regionale e/o nazionale. Entrambe gli aspetti sono comunque ineludibili se si vuole garantire un elevato standard di affidabilità dei metodi.

Per quanto concerne la specificità analitica, sarà necessario definire a quali reazioni crociate occorre porre maggiore attenzione (es. gli anticorpi circolanti diretti verso altri ceppi di coronavirus), in quanto le informazioni contenute nelle IFU sono molto disparate e non sempre esaurienti.

Un'ultima considerazione deve essere riservata alla sensibilità diagnostica, da intendersi come concordanza percentuale di positività (PPA) rispetto alla ricerca virale diretta eseguita su tampone rinofaringeo con RT-PCR. Anche in questo caso le modalità con cui sono stati ottenuti i dati riportati nelle IFU risultano molto differenziate e difficilmente confrontabili fra loro. In particolare, è necessario definire le tempistiche con le quali deve essere eseguita la ricerca degli anticorpi e anche a partire da quale momento. A quest'ultimo riguardo, si può infatti osservare che sono stati adottati criteri differenti: insorgenza dei sintomi, positività del tampone, diagnosi di malattia. In taluni casi il dato è assente. Anche la numerosità delle casistiche è un aspetto da tenere in considerazione, poiché talvolta risulta inadeguata allo scopo.

Da questa serie di considerazioni che, com'era logico aspettarsi, mettono in luce un elevato livello di eterogeneità metodologica, nasce la necessità di approfondire la conoscenza dei metodi mediante valutazioni ben strutturate e studi di comparazione su casistiche corredate di dati clinici.

Inoltre, sempre considerando la giovane vita dei metodi presi in esame, non c'è da sorprendersi se in questa fase le informazioni e i dati contenuti nelle IFU sono sottoposti ad aggiornamenti ravvicinati. Le schede qui raccolte fotografano la situazione all'8 maggio 2020, in base alle IFU pervenute entro quella data. Sarà nostra cura (naturalmente con la collaborazione delle Aziende coinvolte) mantenere aggiornate le tabelle e inserire le schede relative ai nuovi metodi che si renderanno disponibili prossimamente.

Con l'auspicio di essere riusciti nell'intento di offrire un valido strumento di consultazione e informazione a tutti gli Amici e Colleghi che si propongono di utilizzare i metodi immunometrici per la determinazione degli anticorpi anti-SARS-CoV-2, auguriamo a tutti una buona lettura e buon lavoro!

Il Consiglio Direttivo di ELAS-Italia