

## Valutazione di IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 su Maglumi 800 (Snibe)

Ferruccio Ceriotti<sup>1</sup>, Alessio Maregnani<sup>1</sup>, Marta Strollo<sup>2</sup>, Massimo Locatelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Laboratorio Analisi, Milano

<sup>2</sup>Ospedale San Raffaele, Servizio di Medicina di Laboratorio, Milano

### ABSTRACT

#### Evaluation of Anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin G and M on Snibe Maglumi 800

**Introduction:** the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a due to new beta-coronavirus causing the pandemic called Coronavirus disease 2019 (COVID-19). The evaluation of the presence of immunoglobulin G and M anti-SARS-CoV-2 (IgG and IgM) is important to understand the epidemiology of the disease and to confirm the presence of the disease when clinical signs are present, but RNA is not detected.

**Methods:** leftover serum samples from different types of patients were used: sera from biobank collected in 2018 as negative controls; patients recovering from the disease as positive controls; patients presenting at the Emergency Room with a positive rhino-pharyngeal swab; patients in Intensive Care Units. Anti-SARS-CoV-2 IgG and IgM were measured with MAGLUMI 2019-nCoV IgM/IgG Kits on Maglumi 800.

**Results:** one out of 61 expected negative resulted positive, and 2 were borderline for IgG (95% specificity, 95%CI 89.6-100), 1 positive for IgM (98.4% specificity, 95%CI 95.2-100); one out of 41 expected IgG positive resulted negative (97.6% sensitivity, 95%CI 92.8-100). All the 13 Intensive Care patients were positive for IgG, 11 for IgM. IgG were negative in 50.9% of the 55 swab positive from Emergency Room patients, while IgM were negative in 87.3%.

**Discussion:** sensitivity and specificity of the test appear good for IgG, some false positive is expected and low antibody titles in subjects with no disease story should be rechecked with an alternative method. IgM show a good specificity, but the unexpected low percentage of positivity in Emergency Room patients compared to IgG, pose some relevant doubts on the sensitivity of the test.

### INTRODUZIONE

A partire dalla fine del mese di dicembre 2019, una serie di casi di polmonite ad eziologia non nota è stata segnalata nella città di Wuhan, provincia di Hubei, Cina, ed è stata collegata ad un mercato di prodotti animali (1). Successivamente, un nuovo beta-coronavirus definito *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) è stato identificato come l'agente etiologico dell'epidemia e la malattia correlata è stata chiamata *coronavirus disease 2019* (COVID-19) (2). La diagnosi della malattia si effettua mediante la ricerca dell'RNA virale con metodi basati sulla real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (3). Per motivi tecnici, è stato impossibile effettuare tamponi a tutti gli individui sospettati di aver contratto questa patologia che, inoltre, decorre in modo asintomatico o paucisintomatico in una elevata percentuale di soggetti

(4). Diventa quindi sempre più necessario identificare i soggetti che sono venuti a contatto con il virus anche quando la malattia non è più in atto, soprattutto per comprendere la reale diffusione della malattia. La verifica della presenza di anticorpi di classe IgG o IgM e la loro quantificazione sono strumenti essenziali per ottenere questa informazione. Già alcuni metodi sono stati descritti in letteratura (5,6) e sono disponibili diverse proposte commerciali. Il metodo utilizzato in questo lavoro (Snibe MAGLUMI 2019-nCoV IgG and IgM chemiluminescence immunoassays) è già stato valutato nelle sue caratteristiche tecniche (7,8). Lo scopo di questo lavoro è di valutare la risposta anticorpale in diverse popolazioni di pazienti in modo da ottenere una stima della sua specificità e sensibilità.

Corrispondenza a: Ferruccio Ceriotti, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Laboratorio Analisi, Via Francesco Sforza 28, 20122 Milano, Tel 0255032876, E-mail ferruccio.ceriotti@policlinico.mi.it

Ricevuto: 23.04.2020

Revisionato: 27.04.2020

Accettato: 14.05.2020

Publicato on-line: 25.05.2020

DOI: 10.19186/BC\_2020.054

## METODI

### Pazienti

Sono stati selezionati sieri residui di 4 diverse tipologie di pazienti. 61 sieri da sieroteca risalenti al 2018, utilizzati come controlli negativi; 41 sieri di pazienti guariti o in corso di guarigione da COVID-19; sieri di 55 pazienti entrati in Pronto Soccorso per patologie respiratorie e positivi al tampone per la ricerca di RNA di SARS-CoV-2; sieri di 13 pazienti affetti da COVID-19 e ricoverati in Terapia Intensiva. Questi campioni sono stati raccolti parte in Policlinico e parte in Ospedale San Raffaele (Milano) e costituiscono sieri residui, prelevati per l'effettuazione di altre tipologie di esami correlati alla patologia COVID-19 e destinati all'eliminazione. Per l'esecuzione degli esami sierologici non è stato perciò richiesto il consenso informato al paziente; le procedure adottate sono state tutte aderenti alla Dichiarazione di Helsinki, come emendata nel 2013.

### Metodo analitico

Si è utilizzato il metodo in chemiluminescenza Maglumi™ 2019-nCoV IgG e IgM, applicato su Maglumi 800 (Snibe Diagnostic, Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd, Shenzhen, Cina, commercializzato da Medical Systems, Genova). Il metodo per la misura delle IgG è basato su microsfere magnetiche rivestite di antigene ricombinante del virus SARS-CoV-2 (sia proteine spike che nucleocapside); dopo l'incubazione con il siero in esame le microsfere con l'immunocomplesso sono separate in campo magnetico e viene eseguito un ciclo di lavaggio. Viene quindi aggiunto un anticorpo anti-IgG umane marcato; dopo la necessaria incubazione ed il relativo ciclo di lavaggio viene aggiunto lo starter e gli anticorpi presenti sono quantificati in base all'intensità della luce emessa. Il segnale è espresso in unità arbitrarie sulla base di una curva di calibrazione. Nel caso delle IgM invece, le microsfere sono ricoperte di anticorpi anti IgM umane che catturano le IgM presenti nel campione; viene quindi aggiunto l'antigene virale ricombinante marcato. Dopo il necessario tempo di incubazione e lavaggio, viene aggiunto lo starter e letta l'intensità della luce emessa. Sia per IgG che per IgM il tempo necessario per completare la reazione è di 34 minuti.

Metodo per la rilevazione dell'RNA virale: metodo RT-PCR, Seegene Allplex™2019-nCoV Assay (Seegene, Seoul, South Korea). L'estrazione del RNA era effettuata con NIMBUS, la PCR real-time era effettuata su CFX96TMDx (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) ed interpretata con il software Seegene Viewer. Il metodo Seegene Allplex™2019-nCoV Assay identifica il virus attraverso la rilevazione della presenza di 3 geni virali (E, RdRP and N).

## RISULTATI

### Pazienti negativi

I risultati ottenuti sui 61 sieri ottenuti da biobanca del 2018 sono mostrati nella Tabella 1. Per le IgG, 1 campione presenta un risultato positivo (1,39 AU/mL) riconfermato da una seconda misura; due campioni rientrano nella zona grigia (risultato dubbio) (0,959 e 1,069 AU/mL) mentre gli altri 58 sono al di sotto delle 0,9 AU/mL. Per le IgM un solo campione ha dato un risultato appena oltre la soglia (1,078 AU/mL). Da questi dati si desume una specificità per le IgG del 95,1% [intervallo di confidenza al 95% (95%IC) 89,7-100] e per le IgM del 98,4 (95%IC 5,2-100).

**Tabella 1**

*Sieri di soggetti prelevati nel 2018 per indagini sierologiche (ricerca anticorpi anti-citomegalovirus)*

| Classe anticorpale | AU/mL     | N  | %    | Classificazione |
|--------------------|-----------|----|------|-----------------|
| IgG                | <0,9      | 58 | 95,1 | Negativo        |
| IgG                | >1,1      | 1  | 1,6  | Positivo        |
| IgG                | 0,9 - 1,1 | 2  | 3,3  | Dubbio          |
| Totale             |           | 61 | 100  |                 |
| IgM                | <1,0      | 60 | 98,4 | Negativo        |
| IgM                | >1,0      | 1  | 1,6  | Positivo        |
| Totale             |           | 61 | 100  |                 |

### Pazienti guariti o in corso di guarigione

Si tratta di 27 pazienti che, dopo 1 tampone positivo hanno superato la malattia ed hanno fatto un prelievo nel corso della visita di controllo, con la conferma del secondo tampone negativo e di 14 pazienti che alla visita di controllo sono risultati ancora con una carica virale al tampone naso-faringeo (6 per tutti e 3 i geni, 8 solo per il gene N). I risultati sono riassunti in Tabella 2. 1 soggetto ha dato risultati di IgG negativi, tutti gli altri hanno mostrato valori nettamente positivi (da 1,6 a 79 AU/mL). Nel caso delle IgM, solo poco più della metà dei pazienti (51%) mostrava valori positivi (da 1,002 a 12,3 AU/mL). Tutti i pazienti avevano avuto la diagnosi della malattia da 2 a 4 settimane prima del prelievo. Considerando che è atteso che tutti i soggetti che hanno avuto la malattia abbiano sviluppato un certo livello di anticorpi, possiamo calcolare per le IgG una sensibilità del 97,6% (95%IC 92,8-100). Nel caso delle IgM invece è possibile che, dato il tempo trascorso, siano già scomparse e quindi non è possibile definire la sensibilità da questo campione di soggetti.

**Tabella 2**

Campioni di pazienti con patologia COVID-19 confermata dalla presenza di RNA virale nel tampone rino-faringeo e che sono guariti clinicamente; 27 hanno avuto il doppio tampone negativo, 14 mostrano ancora presenza del virus (6 positivi e 8 debolmente positivi).

| Classe anticorpale | AU/mL     | N  | %    | Classificazione |
|--------------------|-----------|----|------|-----------------|
| IgG                | <0,9      | 1  | 2,4  | Negativo        |
| IgG                | >1,1      | 40 | 97,6 | Positivo        |
| IgG                | 0,9 - 1,1 | 0  |      | Dubbio          |
| Totale             |           | 41 | 100  |                 |
| IgM                | <1,0      | 20 | 49   | Negativo        |
| IgM                | >1,0      | 21 | 51   | Positivo        |
| Totale             |           | 41 | 100  |                 |

### Pazienti da pronto soccorso

La Tabella 3 mostra i risultati di questi pazienti. Per quanto riguarda le IgG, risultano presenti solo nel 45,5% dei soggetti al momento della diagnosi; uno dei 2 pazienti con risultato borderline ha avuto un secondo prelievo 5 giorni dopo ed è risultato nettamente positivo. 3 pazienti hanno continuato a risultare negativi 3 o 4 giorni dopo il tampone positivo. I valori di concentrazione delle IgG sono risultati molto variabili, da appena sopra la soglia (1,1 AU/mL) a 79 AU/mL, senza alcuna relazione con il tempo intercorso dall'inizio dei sintomi. Le IgM inaspettatamente risultano presenti solo in 7 soggetti su 55 (12,7%) ed uno soltanto presentava IgM positive in assenza di IgG che si sarebbero positivizzate solo 2 giorni dopo. Anche nei 19 pazienti seguiti nel tempo la positivizzazione delle IgM sembra apparentemente più lenta rispetto a quella delle IgG con 2 dei 10 pazienti seguiti per 15 giorni ancora negativi dopo 5 giorni e 5 fra gli altri 9 pazienti ancora negativi dopo 4 giorni.

**Tabella 3**

Pazienti provenienti dal Pronto soccorso. Prelievo effettuato contestualmente all'esecuzione del tampone rino-faringeo risultato positivo per la presenza di RNA di SARS-CoV-2.

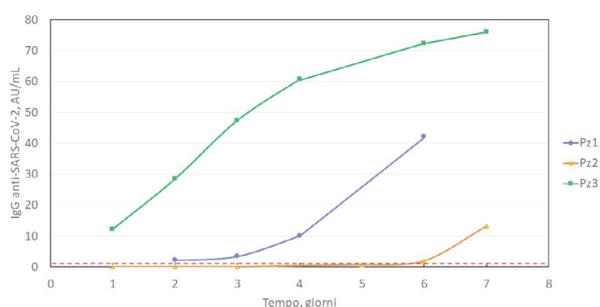
| Classe anticorpale | AU/mL     | N  | %    | Classificazione |
|--------------------|-----------|----|------|-----------------|
| IgG                | <0,9      | 28 | 50,9 | Negativo        |
| IgG                | >1,1      | 25 | 45,5 | Positivo        |
| IgG                | 0,9 - 1,1 | 2  | 3,6  | Dubbio          |
| Totale             |           | 55 | 100  |                 |
| IgM                | <1,0      | 48 | 87,3 | Negativo        |
| IgM                | >1,0      | 7  | 12,7 | Positivo        |
| Totale             |           | 55 | 100  |                 |

Tutti i pazienti sono arrivati in Pronto Soccorso almeno 2 giorni dopo l'inizio dei sintomi, alcuni anche 14 giorni dopo; 47 dei 55 pazienti sono stati ricoverati: Fra gli 8 dimessi, 4 avevano presenza di IgG anti-SARS-CoV-2 uno sia di IgG che di IgM, mentre 3 non presentavano anticorpi. La cinetica dello sviluppo degli

anticorpi appare molto differente da un paziente all'altro. Il caso dei 3 pazienti è illustrato nella Figura 1 per le IgG e nella Figura 2 per le IgM.

**Figura 1**

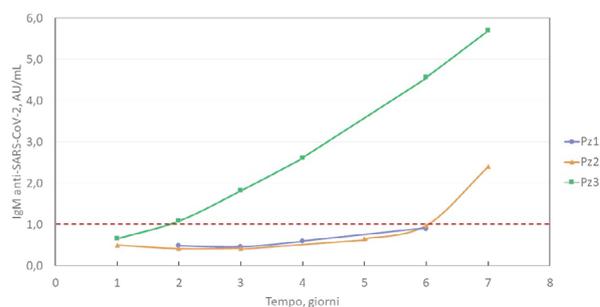
Cinetica dello sviluppo degli anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 in tre pazienti. Il tempo zero è il momento di presentazione in Pronto Soccorso. Il paziente 1 dichiara un inizio dei sintomi da 4 giorni prima della presentazione in Pronto Soccorso, il paziente 2 da 10 giorni ed il paziente 3 solo dal giorno precedente. La linea tratteggiata indica il valore soglia per la positività.



1

**Figura 2**

Cinetica dello sviluppo degli anticorpi IgM anti-SARS-CoV-2 in tre pazienti. Il paziente 1 dichiara un inizio dei sintomi da 4 giorni prima della presentazione in Pronto Soccorso, il paziente 2 da 10 giorni ed il paziente 3 solo dal giorno precedente. La linea tratteggiata indica il valore soglia per la positività.



2

### Pazienti in Terapia Intensiva

I risultati sono riportati in Tabella 4. Il 100% presenta valori di IgG nettamente positivi (da 8 a 81 AU/mL) che, nei 3 pazienti seguiti per 5 giorni consecutivi, si mantengono costanti nel tempo. Due pazienti su 13 presentano valori di IgM negativi; sono tra i soggetti con valori di IgG più elevati e ricoverati da tempo maggiore (23 e 18 giorni).

**Tabella 3**

Pazienti COVID-19 in Terapia Intensiva. Il prelievo è stato effettuato in un periodo che varia dai 2 ai 23 giorni dal primo tampone positivo

| Classe anticorpale | AU/mL     | N  | %     | Classificazione |
|--------------------|-----------|----|-------|-----------------|
| IgG                | <0,9      | 0  | 0,0   | Negativo        |
| IgG                | >1,1      | 13 | 100,0 | Positivo        |
| IgG                | 0,9 - 1,1 | 0  |       | Dubbio          |
| Totale             |           | 13 | 100   |                 |
| IgM                | <1,0      | 2  | 15    | Negativo        |
| IgM                | >1,0      | 11 | 85    | Positivo        |
| Totale             |           | 13 | 100   |                 |

## DISCUSSIONE

Anticorpi anti-SARS-CoV-2 di classe IgG: il metodo appare dotato di buona specificità (95,1%, 95%IC 89,7 – 100%), anche se non mancano i falsi positivi, e valori di poco superiori a 1,1 AU/mL (valore soglia) dovrebbero essere ricontrollati con un metodo alternativo prima di catalogare il paziente come soggetto che ha incontrato il virus. Non siamo in grado al momento di ipotizzare il motivo per questi falsi positivi; potrebbe trattarsi di un segnale aspecifico oppure potrebbe trattarsi di anticorpi contro qualche altro tipo di coronavirus. Questo dato è parzialmente in contrasto con quanto riportato sul foglietto informativo del metodo che riporta una specificità del 100%, verificata su 370 soggetti. La sensibilità, dando per assodato che i soggetti guariti o in corso di guarigione debbano presentare anticorpi di tipo IgG, appare buona (97,6%, 95%IC 92,8 – 100%), ma la casistica è piuttosto ristretta ed un allargamento dei casi potrebbe portare a stime migliori. L'unico soggetto risultato negativo aveva avuto una patologia di lieve entità, con tampone risultato negativo dopo soli 16 giorni dal tampone positivo. Il nostro dato peraltro è migliore di quanto riportato nel foglietto informativo (91,21%).

Per quanto riguarda l'utilizzo dell'esame in contesti di Pronto Soccorso si conferma l'utilità molto limitata con una elevata percentuale (51%) di soggetti che, almeno nella nostra piccola casistica, risultano avere IgG negative, negatività che in alcuni soggetti permane anche oltre i 10 giorni dall'inizio della sintomatologia; peraltro i pochi dati di letteratura danno indicazioni di tempi lunghi per la siero conversione. La maggioranza dei soggetti da noi analizzati (47 su 55) ha richiesto ospedalizzazione, indicando quindi condizioni cliniche compromesse. Guo et al. (5) indicano 14 giorni per le IgG, Okba et al. che la sieroconversione avviene nell'arco di 2 settimane (9), come anche Padoan et al (7); una sintesi più completa dei risultati ad oggi disponibili è fornita da Infantino et al (10).

Difficile interpretare il risultato delle IgM; la specificità appare in linea con quanto riportato dal produttore (100%); per quanto riguarda la sensibilità i nostri dati non

consentono valutazioni precise, ma appare inferiore al 48,3% indicato dal produttore. La letteratura indica che le IgM sono più precoci (5) o circa contemporanee alle IgG (10) mentre i nostri risultati sembrano indicare una presentazione più tardiva (Figura 2). Si sarebbe portati a credere che il metodo non sia sufficientemente sensibile e quindi non in grado di rilevare la presenza di IgM anti-SARS-CoV-2 se non quando presenti in quantità molto elevata. Questo è in contrasto con quanto pubblicato da Padoan et al. (7) che, con lo stesso sistema analitico vedono comparire IgG ed IgM all'incirca nello stesso momento temporale. La nostra casistica è limitata e la differenza potrebbe essere legata alla diversa tipologia di pazienti.

In conclusione, il lavoro conferma le buone prestazioni del metodo, in particolare per lo scopo primario di indagini epidemiologiche, avendo dimostrato, pur su una casistica limitata, buone prestazioni nella identificazione dei soggetti immunizzati e limitato numero di segnali aspecifici.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia Medical Systems per la fornitura dei reattivi utilizzati nel lavoro.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China Lancet 2020 doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
- Ren LL, Wang YM, Wu ZQ, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. Chin Med J (Engl) 2020 doi: 10.1097/CM9.0000000000000722
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, et al. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. Euro Surveill 2020 doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000180.
- Guo L, Ren L, Yang S, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19) Clin Infect Dis 2020 doi: 10.1093/cid/ciaa310.
- Petherick A. Developing antibody tests for SARS-CoV-2. Lancet 2020;395:1101-2.
- Padoan A, Cosma C, Sciacovelli L, et al. Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics. Clin Chem Lab Med. 2020. doi: 10.1515/cclm-2020-0443.
- Lippi G, Salvagno GL, Pegoraro M, et al. Assessment of immune response to SARS-CoV-2 with fully automated MAGLUMI 2019-nCoV IgG and IgM chemiluminescence immunoassays. Clin Chem Lab Med 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-0473.

9. Okba NMA, Müller MA, Li W, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease 2019 patients. *Emerg Infect Dis* 2020 doi: 10.3201/eid2607.200841.
10. Infantino M, Damiani A, Gobbi FL, et al. Serological assays for SARS-CoV-2 infectious disease: benefits, limitations and perspectives. *Isr Med Assoc J.*2020;22:203-10.