



Istituto Nazionale per le Malattie Infettive
Struttura Complessa Laboratorio di Virologia e Laboratori di Biosicurezza
Direttore: D.ssa M.R. Capobianchi
e-mail: maria.capobianchi@inmi.it; Tel. 0655170434 Fax 065594555

Asunto: Informe de actividades previstas para la fase I del acuerdo de colaboración científica entre DIESSE Diagnostica Senese S.p.A. y el Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “L. Spallanzani”

Este documento relaciona las actividades de la Fase I previstas en el acuerdo de colaboración científica "Proyecto Coronavirus" entre DIESSE Diagnostica Senese S.p.A y el Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) “L. Spallanzani” (firmado en el 18.03.2020).

Los dos propósitos principales de la Fase I de la colaboración científica incluyeron:

- implementación por DIESSE Diagnostica Senese S.p.A. de kits ELISA para la detección de anticuerpos IgM, IgG e IgA específicos para el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) utilizando el material biológico proporcionado por el INMI que incluía virus aislado (*2019-nCoV/Italy-INMII*) y un panel de 11 sueros anonimizados que se habían caracterizado en el INMI por inmunofluorescencia indirecta (IFA), obtenidos de pacientes afectados por COVID-19 (n = 5) y de pacientes negativos (n = 6).
- la evaluación en el Laboratorio de Virología del INMI de los kits ELISA producidos por DIESSE Diagnostica Senese S.p.A. utilizando un panel más amplio de sueros caracterizados en el INMI con IFA.

Los kits ELISA producidos en esta fase experimental por DIESSE Diagnostica Senese S.p.A. se basan en el antígeno nativo obtenido de células VERO E6 infectadas con la cepa aislada *2019-nCoV/Italy-INMII*, y se desarrollaron utilizando el panel de sueros proporcionado por el INMI caracterizado por el título de anticuerpos.

La sucesiva fase de evaluación de las pruebas ELISA tuvo lugar en el Laboratorio de Virología del INMI durante los días 15 y 16 de Abril en presencia de dos profesionales de DIESSE Diagnostica Senese S.p.A .

Se evaluaron dos lotes de producción diferentes para los tres tipos de pruebas (IgA, IgM e IgG) y se analizaron un total de 135 muestras de suero, de las cuales 74 positivos para anticuerpos anti-SARS-

CoV-2 y 61 negativos en IFA. Entre las muestras negativas, 20 sueros pertenecían a pacientes positivos para otros coronavirus humanos (por ejemplo, HKU, NL63, 229E).

El método IFA empleado como prueba de referencia en esta fase de evaluación es un ensayo interno desarrollado en el Laboratorio de Virología del INMI y se basa en el uso de portaobjetos con células VERO E6 infectadas con virus vivo (aislado *2019-nCoV/Italy-INMI1*) producidos en los laboratorios de bioseguridad del INMI. Esta prueba se utiliza en el Laboratorio de virología para el diagnóstico de rutina de la respuesta específica IgA, IgM, IgG para el SARS-CoV-2.

Los ELISA se realizaron manualmente, sin el uso de un dispensador automático. Los lavados se realizaron con la lavadora Biotek en uso en el laboratorio. Cada muestra se analizó en ELISA a una dilución 1:101 y por duplicado. La absorbancia relacionada con la presencia de anticuerpos se determinó en el lector de microplacas Synergy HTX (Biotek) empleado en el Laboratorio de Virología del INMI.

Los dos lotes examinados mostraron resultados superponibles. Además, la prueba (realizada en modo manual) requiere un tiempo de ejecución de aproximadamente 3 horas, de un pequeño volumen de muestra de suero (5 ul por cada parámetro, IgA, IgM e IgG), y la interpretación de los resultados se basa en el uso de un control cut-off para el cálculo del valor del índice.

Los resultados obtenidos de las pruebas realizadas en las 135 muestras analizadas mostraron los siguientes rendimientos comparados con la prueba de referencia (**Tabla 1**):

Tabla 1			
	ENZY-WELL SARS-CoV-2 IgG	ENZY-WELL SARS-CoV-2 IgM	ENZY-WELL SARS-CoV-2 IgA
Sensibilidad:	92,5%, (CI 83,7 - 96,8)	87,6%, (CI 77,5 - 93,6)	93,6%, (CI 84,8 - 97,5)
Especificidad:	89,7%, (CI 80,2 - 94,9)	88,0%, (CI 76,2 - 94,4)	97,8%, (CI 88,9 - 99,6)
Concordancia:	91,1%	87,8%	95,4%

Como se muestra en la **Tabla 2**, el análisis de los resultados de 29 muestras con fecha conocida de inicio de síntomas mostró que la sensibilidad de las pruebas ELISA aumenta después de 10 días desde el inicio de los síntomas.

Específicamente, se observa una sensibilidad del 100% después de 10 días para IgG y después de 12 días para IgA; para IgM, se alcanza el 87,5% después de 12 días.

Tabla 2			
Días desde el inicio de los síntomas	Sensibilidad		
	IgA	IgG	IgM
<10	58,3%	66,7%	58,3%
>10	94,1%	100,0%	70,6%
>12	100,0%	-	87,5%

Además, entre las muestras analizadas se evaluaron varias muestras del mismo paciente, recogidas varios días después del inicio de los síntomas. Las pruebas ELISA revelaron suero-conversión para los tres tipos de anticuerpos y mostraron un 100% de concordancia con el IFA en las muestras recogidas 10 días después del inicio de los síntomas.

Tras la fase de evaluación realizada en el INMI, DIESSE Diagnostica Senese S.p.A. analizó sueros negativos adicionales (n = 300) recogidos de pacientes antes de la pandemia de COVID-19 (2016, 2017 y enero de 2019).

De los resultados obtenidos en los laboratorios de Siena, por un total de 435 muestras analizadas, los valores de especificidad obtenidos se muestran en la **Tabla 3**:

Tabla 3			
	ENZY-WELL SARS-CoV-2 IgG	ENZY-WELL SARS- CoV-2 IgM	ENZY-WELL SARS- CoV-2 IgA
Especificidad:	95,7%, (CI 93,4-97,3)	96,9%, (CI 94,5-98,4)	96,25%, (CI 93,9-97,7)

Roma, 24/04/2020

Il Responsabile Scientifico

D.ssa Concetta Castilletti