

DIREZIONE GENERALE  
 CURA DELLA PERSONA, SALUTE E WELFARE  
 LA DIRETTRICE  
**KYRIAKOULA PETROPULACOS**

REG. CFR.FILE.SEGNATURA.XLM  
 DEL CFR.FILE.SEGNATURA.XLM

Ai Direttori Generali  
 Ai Direttori Sanitari  
 Ai Direttori Dipartimenti Sanità Pubblica  
 Ai Direttori Dipartimenti Cure Primarie  
 Ai Direttori dei Servizi ICT

delle Aziende Sanitarie  
 della Regione Emilia-Romagna

Oggetto: Indicazioni relative all'utilizzo di test sierologici in relazione alla vaccinazione contro la COVID-19 e alle modalità di refertazione dei saggi molecolari

In allegato alla presente, si trasmette una nota, condivisa dalla Cabina di regia regionale, che fornisce indicazioni sui motivi per i quali non è utile ricorrere ai test sierologici prima o dopo la vaccinazione contro la COVID-19. Vengono altresì fornite indicazioni sulla non utilità di includere nel referto dei saggi molecolari informazioni relative al valore CT.

Sempre più frequentemente vengono effettuati test sierologici prima della vaccinazione, per valutare il grado di protezione della persona, o successivamente per verificare l'efficacia del vaccino nell'indurre protezione immunitaria. Queste pratiche non sono basate su un razionale scientifico. Si indica, quindi, quanto segue:

- Non è opportuno effettuare test sierologici prima della vaccinazione per studiare eventuali infezioni pregresse non note, né per misurare il livello di anticorpi allo scopo di ottenere informazioni sulla base delle quali decidere la successiva strategia vaccinale. La decisione di vaccinare e il numero di dosi da somministrare devono essere aderenti alle indicazioni fornite dal Ministero della Salute e da AIFA.
- Non è opportuno effettuare test sierologici dopo la vaccinazione per misurare il grado di protezione dalla infezione, dalla malattia o dalla malattia grave. La protezione immunitaria dal virus si basa su diversi parametri immunologici (umorali e cellulari) e quelli più direttamente in grado di misurare l'effettivo grado di protezione (anticorpi neutralizzanti e risposta cellulare) non sono disponibili per test commerciali, né possono essere eseguiti di rou-

Viale Aldo Moro 21 - 40127 Bologna - tel 051.527.7161/7163 [dgsan@regione.emilia-romagna.it](mailto:dgsan@regione.emilia-romagna.it)  
 PEC: [dgsan@postacert.regione.emilia-romagna.it](mailto:dgsan@postacert.regione.emilia-romagna.it)

	ANNO	NUMERO	INDICE	LIV.1	LIV.2	LIV.3	LIV.4	LIV.5		ANNO	NUMERO	SUB
a uso interno	DP		Classif.						Fasc.	2021		

tine in laboratorio. Una valutazione accurata è quindi possibile solo nell'ambito di studi clinici che includano laboratori di ricerca in grado di eseguire questi test.

- La valutazione del grado di protezione basata solo sulla determinazione quantitativa degli anticorpi (anche qualora si utilizzassero test in grado di rilevare anticorpi diretti contro RDV) rischia di etichettare in modo erraneo persone come *non responder* al vaccino oppure di dare una erronea sensazione di sicurezza alle persone, che sentendosi rassicurate rischiano di adottare comportamenti non corretti.

Vengono altresì, sempre più frequentemente, inclusi nel referto di saggi molecolari informazioni sulla "carica virale" basati sui cicli CT del test. Anche in questo caso non esiste un razionale scientifico per questa pratica. I test molecolari sono concepiti per essere test qualitativi e per alcuni test l'esito non viene neanche espresso in CT. Quando ciò avviene, il calcolo del valore di CT, sulla base del quale un particolare test viene classificato come positivo o negativo, è assolutamente specifico di ogni combinazione di piattaforma diagnostica e sequenza genica target.

Esistono oggi alcuni test commerciali certificati, che sono in grado di quantificare in maniera standardizzata la quantità di RNA virale presente nel campione biologico, ma sono ancora poco diffusi e di conseguenza anche poco correlati alla reale utilità clinica.

In conclusione, l'indicazione è di non fornire alcun risultato che contenga il valore di CT nel referto al fine di impedire misinterpretazioni da parte dei clinici e degli epidemiologi.

Si rammenta che già nella nota prot. 11/09/2020 0593801.U *Precisazioni in ordine alla disposizione delle misure di isolamento domiciliare/quarantena in alcune situazioni particolari* sono state fornite indicazioni in merito alla necessità di presa in carico da parte dei Dipartimenti di Sanità Pubblica come caso COVID19 di pazienti con esito debolmente positivo al test molecolare, senza peraltro prevedere da parte dei Dipartimenti di Sanità Pubblica la richiesta di ulteriori test di conferma.

Si prega di voler dare massima diffusione alle indicazioni contenute nella nota, allo scopo di evitare il perpetrarsi di pratiche inappropriate, che possono indurre comportamenti o interventi non appropriati.

Cordiali saluti

Kyriakoula Petropulacos  
(documento firmato digitalmente)

Allegati: c.s.i.

## **INDICAZIONI RELATIVE ALL'UTILIZZO DI TEST SIEROLOGICI IN RELAZIONE ALLA VACCINAZIONE CONTRO COVID-19 E ALLE MODALITA' DI REFERTAZIONE DEI SAGGI MOLECOLARI**

### **Test sierologici e vaccinazione contro la COVID-19**

Sempre più frequentemente vengono effettuati test sierologici prima della vaccinazione, per valutare il grado di protezione della persona, o successivamente per verificare l'efficacia del vaccino nell'indurre protezione immunitaria.

Queste pratiche non sono basate su un razionale scientifico; la valutazione della risposta immunitaria prima del vaccino non serve a valutare se sia opportuna o meno la vaccinazione e la valutazione della risposta immunitaria dopo il vaccino ha significato solo nell'ambito di studi clinici, qualora sia possibile valutare la risposta immunitaria studiando tutte le sue componenti.

In commercio sono, inoltre, disponibili diversi test sierologici ed alcuni di questi non sono in grado di identificare gli anticorpi prodotti a seguito della vaccinazione.

### **Parametri correlati con la protezione immunitaria**

I correlati con la protezione sono parametri immunologici che consentono di predire il grado di protezione contro l'infezione o la malattia indotte da uno specifico patogeno. Per COVID-19 sfortunatamente il quadro non è ancora completamente chiaro, tanto che non si ritiene ancora possibile valutare l'efficacia di un vaccino sulla base di parametri immunologici<sup>1</sup>. In primo luogo, il termine protezione può avere significati diversi: protezione dalla infezione (immunità sterilizzante), protezione dalle infezioni sintomatiche oppure protezione dalla malattia grave. In secondo luogo, è probabile che non esista un solo meccanismo protettivo, ma che le diverse componenti giochino un ruolo sinergico nella protezione dal virus.

La protezione immunitaria indotta dalla infezione da SARS-Cov-2 o dalla vaccinazione contro COVID-19 rappresenta il risultato della interazione di diversi fattori e non può essere valutata con la sola determinazione della risposta anticorpale. I possibili fattori correlati alla protezione contro SARS-Cov-2 sono:

- le immunoglobuline IgG e IgM nel siero, le IgA sulle membrane mucose: gli anticorpi possono avere come bersaglio la proteina S oppure altre proteine, quale ad esempio la nucleoproteina N e tra questi la subunità S1 che ha una maggiore capacità di neutralizzare l'attività di SARS.Cov-2, in quanto ha come target la regione di legame del virus. Mentre l'infezione da SARS-Cov-2 promuove la produzione di anticorpi contro ambedue le proteine S e N, la vaccinazione contro il COVID-19 promuove solo la produzione di anticorpi contro la proteina S;
- le cellule-T CD4 e CD8+: l'attività delle cellule T è associata con una minore gravità clinica e cellule-T preesistenti e cross-reattive possono accelerare la clearance di SARS-Cov-2.

I dati disponibili indicano che non tutti i pazienti sviluppano una risposta umorale protettiva, ma tutti generano una robusta risposta cellulare; in generale, una risposta coordinata cellulare e umorale appare essere protettiva, mentre risposte non coordinate non sono efficaci a controllare la malattia.

---

<sup>1</sup> Jin, P., Li, J., Pan, H., Wu, Y., & Zhu, F. Immunological surrogate endpoints of COVID-2019 vaccines: the evidence we have versus the evidence we need. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021: 6(1), 1-6.

I fattori correlati con la protezione possono essere diversi in caso di infezione o vaccinazione e possono variare tra vaccini.<sup>2</sup> Inoltre, non è ancora noto quale sia il titolo anticorpale protettivo, anche a causa della sola recente introduzione di materiali biologici di riferimento, il cui ruolo per sviluppare la comparabilità dei risultati ottenuti con differenti metodi analitici è fondamentale.<sup>3</sup>

## I test di laboratorio

Esistono diverse tipologie di test sierologici: qualitativi, semi-quantitativi, quantitativi; test che rilevano tutte o alcune tipologie di anticorpi (IgG, IgM, IgA); test che rilevano anticorpi diretti verso la proteina N (nucleocapside), la proteina S (Spike), la regione di legame (*Regional binding domain*-RBD) oppure il lisato di virus intero; test che si basano su prelievo di sangue venoso oppure su goccia di sangue eseguita con pungidito. Recentemente sono stati introdotti test diretti verso antigeni ricombinanti derivanti da porzioni di RBD della proteina S, eseguibili con tecnica ELISA o DELFIA a partire da dry blood spots.

I test qualitativi sono in grado solo di stabilire se una persona ha sviluppato o meno degli anticorpi, secondo una logica positivo/negativo. In genere, si tratta di test rapidi basati sul prelievo capillare (pungidito).

I test sierologici quantitativi richiedono, invece, un prelievo di sangue e uno specifico analizzatore in dotazione alle strutture sanitarie. I test quantitativi che dosano le quantità di anticorpi si differenziano anche in ragione della tipologia di anticorpi testati.

Alcuni test di laboratorio rilevano solo la presenza di anticorpi diretti contro la proteina N (nucleocapside): tali test saranno sempre negativi dopo la vaccinazione contro COVID-19, perché i vaccini stimolano la produzione di anticorpi contro la sola proteina S (spike).

Gli anticorpi più in grado di riflettere l'effettiva protezione immunitaria sono gli anticorpi neutralizzanti che correlano con gli anticorpi diretti verso RBD, ma i test commerciali attuali non sono in grado di misurare direttamente gli anticorpi neutralizzanti<sup>4</sup>.

Si possono rilevare anticorpi correlati a questi, ossia gli anticorpi diretti verso RBD: alti livelli di questi anticorpi possono essere correlati con la protezione (anche se non è ancora definita quale sia l'effettiva soglia di protezione), tuttavia, in assenza di anticorpi neutralizzanti, o di livelli bassi di questi, altri parametri immunologici quali le cellule B di memoria, le cellule T CD4 e CD8 possono conferire protezione dalla malattia. I test in grado di misurare la risposta cellulare non sono però eseguiti normalmente in laboratorio e possono essere effettuati solo da alcuni laboratori nell'ambito di studi clinici.

## Indicazioni

- Non è opportuno effettuare test sierologici prima della vaccinazione per studiare eventuali infezioni pregresse non note, né per misurare il livello di anticorpi allo scopo di ottenere informazioni sulla base delle quali decidere la successiva strategia vaccinale. La decisione di vaccinare e il numero di dosi da somministrare devono essere aderenti alle indicazioni fornite dal Ministero della Salute e da AIFA.

---

<sup>2</sup> Koch, T.; Mellinghoff, S.C.; Shamsrizi, P.; Addo, M.M.; Dahlke, C. Correlates of Vaccine-Induced Protection against SARS-CoV-2. *Vaccines* 2021, 9, 38. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030238>

<sup>3</sup> Kristiansen PA, Page M, Bernasconi V, Mattiuzzo G, Dull P, Makar K, Plotkin S, Knezevic I. WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin. 2021. *The Lancet* 397. Doi: [10.1016/S0140-6736\(21\)00527-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00527-4)

<sup>4</sup> New and Emerging Respiratory Virus Threats Advisory Group (NERVTAG). NERVTAG: Certifying COVID-19 immunity, 19 November 2020. GOV.UK.

- Non è opportuno effettuare test sierologici dopo la vaccinazione per misurare il grado di protezione dalla infezione, dalla malattia o dalla malattia grave. La protezione immunitaria dal virus si basa su diversi parametri immunologici (umorali e cellulari) e quelli più direttamente in grado di misurare l'effettivo grado di protezione (anticorpi neutralizzanti e risposta cellulare) non sono disponibili per test commerciali, né possono essere eseguiti di routine in laboratorio. Una valutazione accurata è quindi possibile solo nell'ambito di studi clinici che includano laboratori di ricerca in grado di eseguire questi test.
- La valutazione del grado di protezione basata solo sulla determinazione quantitativa degli anticorpi (anche qualora si utilizzassero test in grado di rilevare anticorpi diretti contro RDV) rischia di etichettare in modo erroneo persone come *non responder* al vaccino oppure di dare una erronea sensazione di sicurezza alle persone, che sentendosi rassicurate rischiano di adottare comportamenti non corretti.

### **Modalità di refertazione dei saggi molecolari per la diagnosi di infezione da SARS CoV2**

*(documento redatto a cura del coordinamento dei Laboratori di riferimento regionali per la diagnostica SARS-CoV-2 delle Aziende Sanitarie)*

La diagnosi tempestiva di COVID-19, così come il seguente monitoraggio, si basa sull'uso di saggi che utilizzano la tecnica di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT), oggi ancora considerati "*gold standard*", per la rilevazione di SARS CoV2 RNA.

Questi saggi si basano su differenti tipi di reazioni chimiche, le più diffuse utilizzano la real time-PCR (RT-PCR), ma esistono in commercio numerosi sistemi che utilizzano altre tecniche, come la Transcription-mediated amplification (TMA) o la Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), il cui esito, oltretutto, non viene espresso in CT.

I test in NAAT sono molto sensibili e oggi anche molto specifici, rilevando livelli molto bassi di RNA virale, specificamente di SARS CoV2, e sono concepiti per essere test "Qualitativi", quindi non in grado di dare una misura quantitativa o anche solo semi-quantitativa delle copie di RNA virale presenti nel campione biologico originario. E' da considerarsi che tali test hanno ricevuto la certificazione CE/IVD solo come saggi qualitativi, quindi ogni loro utilizzo alternativo non rispetta tale indicazione.

I saggi in RT-PCR generalmente forniscono un risultato mediante un valore, il CT (*cycle threshold*), che rappresenta il numero di cicli di amplificazione necessari per rilevare in maniera definita il segnale di fluorescenza che identifica il bersaglio come rilevato, e quindi positivo: per i campioni in cui lo RNA virale sia sotto il valore soglia, il risultato definitivo è quindi "non rilevabile".

Il calcolo del valore di CT di ogni singolo campione, basato sul numero di cicli necessario a completare il processo di amplificazione utile alla definizione del risultato finale, positivo o negativo, è quindi assolutamente specifico di ogni combinazione di piattaforma diagnostica e sequenza genica target.

Generalmente, la positività si ottiene con un range di CT che va da 15 a 40 (benché siano accettabili anche valori di CT, rispettivamente inferiori a 15 e superiori a 40, purché interpretati in modo corretto dal software di analisi dei dati specifico per ogni sistema analitico). Questo determina il fatto che il valore di CT per uno stesso campione analizzato è variabile a seconda della combinazione di strumento e sequenza target impiegati. Non è quindi mai possibile considerarlo una unità di misura standardizzata, ma è strettamente correlata a ciascuna metodica impiegata. Inoltre, vanno considerati in dettaglio alcuni limiti intrinseci di ciascuna metodica, sotto riportati, da cui discende ulteriormente che il valore di CT non si debba utilizzare come sistema di espressione quantitativa dei risultati di un test RT PCR QUALITATIVO:

- Tipologia di materiale biologico e omogeneità di dispersione dell'RNA virale al suo interno;
- Condizioni di trasporto e conservazione del campione biologico primario;
- Uso o meno dei sistemi di estrazione;
- Efficienza dell'estrazione degli acidi nucleici e del processo (spesso eseguito come step preliminare alla fase di amplificazione del cDNA nella stessa reazione) di retro-trascrizione delle molecole di RNA in cDNA ;
- Quantità di RNA presente nel campione biologico;
- Tipologia e affinità dei target per i primers ed i probes usati;
- Efficienza della reazione polimerasica di RT-PCR.

Pertanto, l'uso del valore di CT non può essere considerato un dato quantitativo da trasmettere nel referto come sinonimo di carica virale.

In aggiunta va considerato che il valore di CT rilevati dipende anche dal tipo di sequenza genica rilevata da ciascun kit diagnostico: la scelta di geni molto rappresentati o meno potrebbe determinare risultati diversi. Potrebbe quindi verificarsi che su uno stesso campione valutato con due test diversi, che hanno come target frammenti di geni diversi, si ottengano risultati discordanti.

Descrizione dei diversi test con target e valori di CT positivi:

- Abbott Alinity m SARS-CoV-2 Target: N, RdRp; CN positività fino a 42.00
- Abbott Real Time SARS-CoV-2 (m 2000) Target: N, RdRp; CN positività fino a 31.5
- Seegene SARS-CoV-2 Assay Target: E, RdRp/S, N; CT positività fino a 40.00
- Applied biosystems TaqPath COVID-19 RT-PCR KIT Target: N, ORF1ab, S; CT positività fino a 40.00 (Software CT 37.00)
- CEPHEID Xpert Xpress SARS-CoV-2 Target: E, N2; CT positività fino a 45.00
- DiaSorin Simplexa COVID-19 Direct Target: ORF1ab, S; CT positività fino a 34 per S e 33 per ORF1ab
- Elitech SARS CoV-2 eLITE MGB kit Target: Orf 8, RdRP; CT positività fino a 43.

Esistono oggi alcuni test commerciali certificati, che sono in grado di quantificare in maniera standardizzata la quantità di RNA virale presente nel campione biologico, ma sono ancora poco diffusi e di conseguenza anche poco correlati alla reale utilità clinica.

Sono oggi disponibili alcuni lavori scientifici che hanno messo in correlazione la cinetica di rilevazione dell'RNA virale con il tempo di malattia/guarigione, inteso come presenza/assenza dei principali sintomi COVID correlati (febbre, raffreddore, sintomi respiratori). In particolare, si è rilevato che, secondo la cinetica virale, dopo 10 giorni dall'esordio dei sintomi, solo pazienti in protratto trattamento corticosteroidico presentavano ancora virus in carica infettante. Altri autori hanno inoltre evidenziato che solo il 2-3% dei campioni positivi per SARS CoV2 RNA ottenuti dopo la guarigione era in grado di contenere virus infettante, se il range di CT si attestava a > di 35, nel caso specifico era utilizzato kit Seegene, mentre nella maggior parte dei casi sono evidenziabili solo frammenti di RNA non replicabili. Per tale motivo l'AMCLI ha proposto un algoritmo operativo per orientare i laboratoristi nei casi in cui si trovano situazioni di positività *border line*, con alti CT, in pazienti già noti per pregressa infezione COVID19.

Va inoltre sottolineato che tutte le indagini eseguite con tecnologie non RT PCR (principalmente TMA, ma anche le altre tecnologie isoterliche) non esprimono alcun valore soglia in qualche modo correlabile al CT della RT PCR.

Al momento attuale, stante la dinamica situazione epidemiologica dovuta alla diffusione di nuove varianti potenzialmente più rischiose, si concorda nel mantenere un atteggiamento di allerta elevato e di massima precauzione nei percorsi diagnostici di sorveglianza, pertanto è indispensabile la revisione costante dei percorsi diagnostici ed interpretativi fino ad ora utilizzati.

**In conclusione, l'indicazione è di non fornire alcun risultato che contenga il valore di CT nel referto al fine di impedire misinterpretazioni da parte dei clinici e degli epidemiologi.**

## **Bibliografia**

- Francesca Falasca, Ilaria Sciandra, Daniele Di Carlo, Massimo Gentile, Alberto Deales, Guido Antonelli and Ombretta Turriziani. Detection of SARS-COV N2 Gene: Very low amounts of viral RNA or false positive? J Clin Virology (2020) 133: 104660
- Bernard La Scola, Marion Le Bideau, Julien Andreani, Van Thuan Hoang, Clio Grimaldier, Philippe Colson, Philippe Gautret & Didier Raoult. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. 27 April 2020; Eur J Clin Microbiol Infect Dis. (2020) 39:1059-1061
- Antonio Piralla, Matteo Ricchi, Maria Grazia Cusi, Paola Prati, Nadia Vicari, Giada Scarsi, Claudia Gandolfo, Gabriele Anichini, Chiara Terrosi, Elena Percivalle, Edoardo Vecchio Nepita, Federica Bergami, Monica Tallarita, Raffaella Di Martino, Alessandro Ferrari, Francesca Rovida, Giovanna Lunghi, Roberta Schiavo, Fausto Baldanti. Residual SARS-CoV-2 RNA in nasal swabs of convalescent COVID-19 patients: Is prolonged quarantine always justified? International J Infect Dis (2021) 102: 299-302
- Sukbin Jang, Ji-Young Rhee, Yu MiWi, Bo KyeongJung. Viral kinetics of SARS-CoV-2 over the preclinical, clinical, and postclinical period. Intern J Infect Dis (2021) 102: 561-565
- Liotti FM, Menchinelli G., Marchetti S., Posteraro B., Landi F., Sanguinetti M., Cattani P. Assesment of SARS CoV-2 RNA Test Results among patients who recovered from COVID-19 with prior negative results. JAMA (2021) 181: 702-704.
- Indicazioni operative AMCLI su quesiti frequenti relativi alla diagnosi molecolare di infezione da SARS CoV-2. AMCLI 4 gennaio 2021
- APHL. Ct values: what they are and how they can be used. Vers.1. Nov 2020
- Cycle threshold (Ct) Values Questions & Answers. College of Americans pathologist. December 29, 2020
- Understanding cycle threshold (Ct) in SARS-CoV-2 RT-PCR. Public health England. October 2020.