



Commissione
"Ars Medica"

rt-qPCR TEST

una metodica non adatta alla diagnostica clinica del SARS-Cov-2

**Spett. Tribunale Amministrativo Regionale della Campania, Sezione Quinta,
P. Zza Municipio 64 Napoli.**

Numero R. G. 4345/2020

Prefazione

La presente relazione, basata su pubblicazioni scientifiche che verranno allegate, ha lo scopo di fare luce sulla reale validità, efficacia, attendibilità, accuratezza e riproducibilità dei famigerati RT-PCR test, comunemente noti come “Tamponi”.

L’esigenza nasce dal fatto che ormai l’esito di un tampone può impattare pesantemente nella sfera pubblica e privata dei cittadini italiani, ledendo i loro diritti civili, la loro vita lavorativa e, sempre più, anche la vita familiare, emotiva e quella sociale tutta.

Analizzare gli aspetti della metodica della PCR e di conseguenza RT-PCR, oltre che le problematiche dei tamponi stessi, ci aiuterà a capire la credibilità di tutto il test così come eseguito oggi.

Sebbene dall’OMS sia arrivata una richiesta di test su scala globale a seguito di una dichiarazione di pandemia in conferenza stampa (2), ma mai seguita da un “Bollettino ufficiale”, la ratio scientifica dietro la richiesta “test, test, test” sarebbe dovuta essere di controllo epidemiologico per qualche riguarda la diffusione prettamente geografica del virus. L’uso che diversi paesi, per fortuna pochi, ne hanno invece fatto è stato creare un alibi per lo “stupro” dei diritti fondamentali dell’individuo, generando un non fondato clima di “terrore mediatico” volto a cercare appoggio nel popolino attraverso le false rassicurazioni che le misure governative avrebbero dovuto offrire.

I danni di queste misure sono stati e saranno , a lungo termine, maggiori di quelli che questa epidemia avrebbe potuto generare se fosse stata trattata come le passate (Sars, Mers, H1N1).

Si rifletta sui medici che nel 2019 sono stati **arruolati ed abilitati senza esame di stato che ne comprovi le reali capacità cliniche**, o ai medici che tra 2019 e 2020 e considerando che siamo a fine anno direi anche 2021, dovranno concludere il loro ciclo di studi. Chi avrebbe fiducia nel farsi eseguire anche una sola appendicectomia da un medico che ha ottenuto un titolo “a distanza” senza esame di stato?

I danni, quelli non virologici, saranno a venire...

PCR

La tecnica denominata **PCR** (acronimo di Polymerase Chain Reaction) è una delle più note e fondamentali tecniche della biologia molecolare. Fu ideata nel 1983 da **Kary B. Mullis**, che per essa ricevette il premio Nobel per la chimica appena dieci anni dopo.

Lo stesso Mullis ha ribadito più volte che tale tecnica non si presta bene ad analisi di tipo quantitativo, uso che oggi viene fatto in maniera forzata ed artificiosa.

Oggi la tecnica è entrata a far parte di pressoché ogni esperimento scientifico in ambito biologico, in una miriade di campi diversi: ricerca, microbiologia, caratterizzazione di cellule tumorali, paleontologia, medicina forense, ingegneria genetica e tante altre. Ve ne sono alcune varianti, così come diversi sono gli strumenti grazie ai quali viene eseguita, i **termociclatori**.

Standard PCR

Lo scopo di questa metodica è essenzialmente quello di “**amplificare**”, ossia **aumentare esponenzialmente, una piccola quantità iniziale di una molecola di acido nucleico (DNA o RNA)** fino ad ottenerne abbastanza da poter eseguire successive analisi. Gli acidi nucleici si ottengono da diverse fonti (nuclei o mitocondri di cellule eucariote, nucleoidi di cellule procariote, virus, ecc.) tramite **protocolli di estrazione** che consentono di separarli da tutte le altri componenti indesiderate.

Una volta ottenuta, in soluzione acquosa, la corretta quantità di acido nucleico vengono aggiunti i reagenti necessari per la reazione di PCR. Questa avviene fisicamente all'interno di piccole provette sterili in plastica, che a seconda del modello possono avere un volume variabile tra 0,2 e 0,5 ml. La particolarità di queste provette è avere delle pareti dallo spessore molto fine e soprattutto costante, di modo da permettere una omogenea penetrazione del calore.

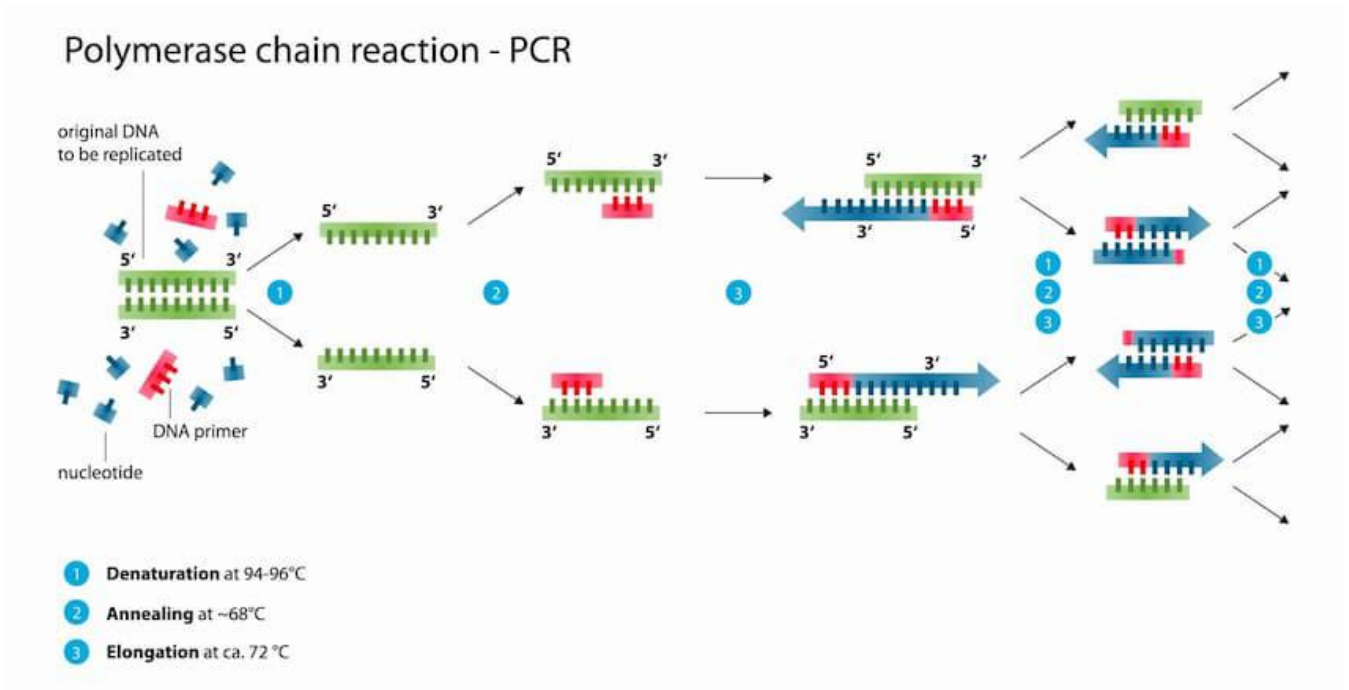
Ogni provetta contiene un differente campione e ad ogni utilizzo un termociclatore ne può ospitare alcune decine allo stesso momento. La piastra metallica che viene fisicamente scaldata e raffreddata secondo il protocollo desiderato possiede infatti numerosi alloggi. Essi sono detti “**pozzetti**”, il cui numero e grandezza può variare da un modello all'altro. Il campione, una volta inserito nel termociclatore, andrà incontro a tre fasi che si susseguono ciclicamente, ognuna delle quali è caratterizzata da specifiche reazioni enzimatiche ed avviene ad una temperatura ben precisa.

Fasi della PCR

Lo strumento con cui si esegue la PCR è chiamato “termociclatore” proprio perché è in grado di condurre le tre variazioni di temperatura consecutive necessarie per l'amplificazione enzimatica del campione per un numero di ripetizioni (“cicli”) stabilito

dallo sperimentatore. Le tre fasi di una PCR eseguita su un campione di DNA a doppio filamento sono tipicamente: denaturazione, annealing e allungamento.

Questa serie di cicli si ripete diverse volte (fino a 30-40) e permette di ottenere una quantità veramente considerevole di DNA a partire da pochissime molecole.



Denaturazione

Prevede che il doppio filamento di DNA di partenza si denaturi, scomponendosi nei due singoli filamenti. Questo processo è reso possibile da un'alta temperatura, in genere tra i 94 e i 99°C.

Annealing

Caratterizzata dalla temperatura più bassa di tutto il ciclo. Permette a brevi sequenze di DNA “artificiale”, i **primers**, di legare le corrispondenti molecole del DNA da amplificare. I primer sono costruiti ad hoc in base alla sequenza da trovare e amplificare nel campione e fungono da punto di partenza per la DNA Polimerasi, l'enzima che materialmente aggiunge nucleotidi per formare nuove molecole di acido nucleico. **Di vitale importanza é che i primers siano altamente specifici.**

La temperatura in questa fase è mantenuta ad un valore preciso, solitamente situato tra i 50 e i 55°C e scelto in base alle sequenze dei primer, che al crescere della ricchezza in coppie Guanina-Citosina richiederanno una temperatura maggiore. Essa deve essere sufficientemente bassa da consentire la formazione di legami tra i primer e il DNA, ma contemporaneamente abbastanza alta perché questo appaiamento sia specifico e non interessi altre sequenze.

La temperatura di annealing, dunque, non è solo quella con la maggiore variabilità tra un esperimento e l'altro, ma rappresenta anche quella da scegliere con maggiore attenzione, poiché è fondamentale per la corretta riuscita dell'esperimento. Nonostante siano state elaborate diverse tecniche di calcolo manuale, oggi esistono molti software che rendono la progettazione dei primer e il calcolo della loro temperatura di annealing molto più accurata.

Allungamento

Vede l'attività enzimatica della **TAQ Polimerasi** per la sintesi di nuovo DNA. Questa DNA Polimerasi è un enzima altamente termostabile poiché derivante da un batterio abituato a condizioni di altissima temperatura (*Thermus aquaticus*). L'introduzione di questa polimerasi ha sostituito nell'uso il precedente Frammento di Klenow, una parte della DNA polimerasi di *Escherichia coli* che non potendo resistere alle alte temperature della PCR doveva essere aggiunto nuovamente ad ogni ciclo. Ciò ha reso questa tecnica ancora più efficiente. La temperatura è solitamente di 72°C, alla quale si raggiunge la massima efficienza dell'enzima.

Termociclatori

Questa è la “macchina” che porta avanti la reazione, la funzione del termociclatore è quella di far compiere ai campioni una serie di cicli a determinate temperature. L'efficienza e la precisione con cui avvengono i cambi di temperatura è cruciale nella riuscita degli esperimenti e nella loro **ripetibilità/riproducibilità**.

Parametri da andare ad osservare sono l'uniformità di temperatura tra un campione e l'altro, e la velocità di riscaldamento e raffreddamento, ossia il tempo necessario a passare da una temperatura ad un'altra.

Reverse Transcription PCR (rt-PCR)

Con questa tecnica è possibile ottenere una grande quantità di **DNA a partire da RNA** a singolo filamento. Questo è importantissimo per lo studio del **trascrittoma**, ossia quella parte di genoma che viene effettivamente utilizzato da una cellula e che differisce tra un tipo cellulare e l'altro. La differenza principale con la standard PCR è innanzitutto il materiale di partenza, in questo caso RNA piuttosto che DNA, e il fatto che nel processo di amplificazione viene utilizzato un enzima particolare chiamato Trascrittasi inversa. Questo enzima consente la sintesi di un filamento di DNA utilizzando come stampo un filamento di RNA. Le reazioni avvengono nel termociclatore standard, poiché l'unica differenza sostanziale consiste negli enzimi utilizzati.

Real-Time PCR (qPCR)

Questa tecnica costituisce uno sviluppo della PCR standard. Si sfruttano diversi metodi che permettono di produrre all'interno del campione una fluorescenza proporzionale alla quantità di DNA. Misurando quindi l'intensità di fluorescenza e confrontandola con valori di riferimento detti **curva standard di calibrazione** si riesce ad ottenere la

quantità assoluta di DNA. In questa metodica si usa un termociclature specifico, che integra la funzione di amplificazione del DNA propria della PCR a dei sensori che misurano la fluorescenza. Una piccola nota riguardante la nomenclatura: sebbene l'abbreviazione corretta di questa tecnica sia qPCR, per via dell'utilizzo molto maggiore rispetto alla Reverse-Transcription PCR, è frequente che ci si riferisca ad essa come rt-PCR.

Real-Time Reverse Transcription PCR (rt-qPCR)

Una combinazione delle ultime due tecniche espone, è quella in uso per i tamponi di rilevazione per il Covid-19.

PROBLEMATICHE RELATIVE ALLA METODICA

Contaminazioni

Paradossalmente, il più grande problema della PCR deriva proprio dalla sua elevata sensibilità. In effetti la reazione risulta molto sensibile alla presenza di materiale genetico contaminante che si può trovare in differenti posti: strumentazione, operatore, ambiente esterno. Una delle maggiori fonti di contaminazione consiste nell'apertura di provette contenenti materiale amplificato (contaminazione da *carry over*) il quale, a seguito dell'apertura del recipiente, può disperdersi nell'aria sotto forma di aerosol che potrebbe contaminare successive PCR.

Il problema delle contaminazioni è tanto maggiore quanto la sensibilità della PCR è elevata. Una PCR meno sensibile risulterà, ovviamente, meno soggetta a contaminazioni ma necessiterà d'una maggior presenza del proprio bersaglio per poterlo amplificare.

Un altro aspetto che deve essere considerato è la presenza di materiale contaminante di origine ambientale o cellulare. Volendo, ad esempio, amplificare materiale genomico umano, vi sarà la possibilità che lo stesso operatore sia una fonte di contaminazione (per esempio per perdita di frammenti di cute che si desquamano o per il rilascio di goccioline di saliva). Avendo a che fare con microorganismi vi può essere la possibilità che essi crescano in vicinanza ai luoghi in cui la PCR viene preparata. È anche possibile la contaminazione crociata a partire dal materiale utilizzato come controllo positivo il quale potrebbe andarsi a depositare nelle provette dei campioni da testare. **Il DNA/RNA da amplificare quindi deve essere puro in partenza, prima dei cicli.** Attualmente i campioni nasofaringei che vengono prelevati portano con sé residui di epitelio della mucosa naso-faringea, oltre che batteri, virus e funghi che normalmente vivono in tale mucosa. A tutt'oggi non è noto come vengano trattati i campioni prima della PCR perché non esistono delle SOP (Standard operation procedures) ovvero delle procedure standardizzate per arrivare ad escludere tutti questi elementi di contaminazione pre PCR.

Qualora volessimo ammettere che ogni laboratorio abbia una propria robusta procedura, vista la miriade di Kit in circolazione di diversi produttori, vista la differenza

che anche l'uso di un diverso termociclatore può fare da laboratorio a laboratorio e visto che il produttore certifica il proprio Kit/Test in base a condizioni di idealità riscontrate in base alle strumentazioni e procedure adottate nelle proprie strutture, **il risultato del test stesso non sarebbe facilmente riproducibile.** Possiamo quindi giungere alla conclusione che la stessa persona testata con kit e laboratori differenti potrebbe avere positività in alcuni e negatività in altri.

Scelta di Primers non adeguatamente specifici o ricerca di porzioni di DNA/RNA non esclusivo

Per ottenere buoni risultati con la PCR è essenziale progettare in modo accurato gli oligonucleotidi (primer) più adatti allo scopo che vogliamo raggiungere e che serviranno da innesco alla DNA polimerasi durante la reazione di amplificazione. Nella fase di progettazione dei primer è fondamentale considerare una serie di fattori, quello che ha maggior importanza tra questi è la **specificità di appaiamento**. Anche quando i primers vengono progettati per avere il 100% di complementarità col gene bersaglio, per una serie di motivi chimico-strutturali, inerenti alla metodica stessa, e per la presenza di altri reagenti, non si raggiunge MAI il 100% della specificità, anzi talvolta i primers possono reagire con parti complementari di se stessi.

Per essere specifico il primer deve discriminare tra regioni di genoma simili di organismi differenti in questo caso virus. Per essere sicuri di progettare quindi il primer giusto **dobbiamo conoscere l'intero genoma del virus che cerchiamo**, solo questo ci garantisce che il primer sia esclusivo per la nostra ricerca. Ricordiamo, inoltre, che le fonti di contaminazione già discusse, batteri, funghi ed epitelio, hanno un DNA con un genoma spropositatamente più ampio di quelle dei virus e che in fase di progettazione dei primers si fa una comparazione tra virus simili ma non sappiamo come si possa escludere ad esempio il DNA epiteliale di ogni singolo essere umano visto che ognuno ha la sua unica e peculiare impronta genetica.

Nel caso del SARS-Cov-2 (Covid-19), **non abbiamo mai avuto l'intero genoma**, in quanto il virus **non è mai stato isolato propriamente** come lo studio di Eurosurveillance ci dice chiaramente (1) e come altri studi che menzioneremo confermeranno. Tutto quello che sino ad oggi abbiamo sono pezzi di genoma che diversi laboratori sparsi per il globo hanno sequenziato (sequenziare non vuol dire isolare) ed inviato presso delle banche dati genetiche. Raccogliendo tutti questi pezzi e confrontandoli tra di loro e con tutto quello che si sa far parte del genoma di tutti i coronavirus si è **dedotto a tavolino un genoma funzionale** che ripetiamo non è ancora completo e non sappiamo per quale percentuale.

Nella fattispecie del Covid-19 sappiamo che:

“Le sequenze nucleotidiche complete di 13 SARS-CoV-2 (Covid-19) riportate da 13 paesi diversi hanno mostrato un'identità di sequenza dell'82% con SARS-CoV (SARS). Inoltre, tutte e 13 le sequenze dividevano tra loro più del 99% di identità di sequenza. La

replicasi poliproteina (ORF 1ab) di 13 isolati, che sono maggiormente conservati in tutti i coronavirus, condivideva l'identità massima (87%) con SARS-CoV, che è inferiore al valore soglia (90%) per la demarcazione delle specie di betacoronavirus. L'analisi filogenetica ha rivelato che tutti i 13 SARS-CoV-2 identificati da diverse posizioni geografiche mostrano un' unica appartenenza filogenetica al SARS-CoV" (7). Come se non bastasse il SARS-CoV-2 ha ben il 96,2% di sovrapposibilità genetica al BatCoV RaTG13.

Non esistendo un genoma completo, non esistendo uno standard qualitativo di riferimento ed avendo tassi di sovrapposibilità tanto elevati con altri virus, il risultato di un test PCR svolto su queste basi ha valore quasi nullo se uno specialista medico non lo inquadra in un contesto più ampio, valutando esposizione e sintomi, come vedremo di seguito.

TAMPONI E LORO AFFIDABILITA'

Sulla mancanza di validazioni/certificazioni e standard di riferimento

Secondo quanto riportato ufficialmente dalla Commissione Europea con nota del 15/04/2020 dal titolo "Orientamenti riguardanti i test diagnostici in vitro per la Covid-19 e le relative prestazioni":

“Ai test per la Covid-19 attualmente si applica la direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Al fine di immettere tali test sul mercato dell'UE, il fabbricante deve conformarsi alle disposizioni pertinenti della direttiva. In particolare, deve redigere un fascicolo tecnico che mostri esplicitamente che il test è sicuro e funziona come previsto, dimostrando la conformità ai requisiti di cui all'allegato I della direttiva. Come spiegato al punto 3 dei presenti orientamenti, i fabbricanti possono destinare i test ad essere utilizzati dagli operatori sanitari o da utilizzatori "profani" (test auto-diagnostici). Per quanto riguarda i test per la Covid-19 destinati ad essere utilizzati dagli operatori sanitari, la marcatura CE può essere apposta a seguito di una dichiarazione del fabbricante attestante che i requisiti della direttiva sono soddisfatti (dichiarazione di conformità). I dispositivi destinati a essere utilizzati come test auto-diagnostici richiedono l'intervento di un organismo notificato che deve svolgere ulteriori verifiche della documentazione tecnica. **In via eccezionale, nell'interesse della tutela della salute, la direttiva stabilisce che uno Stato membro possa, in risposta a richiesta debitamente motivata, autorizzare l'immissione in commercio nel proprio territorio di singoli dispositivi per i quali non siano state ancora espletate le procedure di valutazione della conformità applicabili.** Nell'adottare tali deroghe nazionali, l'autorità nazionale competente dello Stato membro deve valutare attentamente i rischi rispetto al beneficio di disporre del dispositivo per uso immediato”.

A tutt'oggi, **nessuno dei test in circolazione risulta aver ricevuto validazione o valutazione di conformità**, da nessun ente terzo al produttore, in Italia grazie al comma 12 dell' art.9 del *D. lgs. 25.01.2010, n.37 - Recepimento Direttiva 2007/47/CE* che così recita:

“ In deroga ai commi 1, 2, 3 e 4, il Ministero della sanità può autorizzare, su richiesta debitamente motivata, l'immissione in commercio e la messa in servizio, nel territorio italiano, di singoli dispositivi per i quali le procedure di cui ai medesimi commi, non sono state espletate, ma il cui impiego è nell'interesse della tutela della salute. La domanda di autorizzazione deve contenere la descrizione del dispositivo, dell'azione principale cui è destinato ed i motivi per i quali la domanda è stata presentata. Il Ministero della sanità comunica, entro trenta giorni, il provvedimento in merito all'autorizzazione.”

All'inizio di Aprile 2020 è stata apposta soltanto la marcatura CE a norma della direttiva 98/79/CE al seguente numero approssimativo di dispositivi Covid-197 : 78 test RT-PCR, 13 test rapidi dell'antigene, 101 test anticorpali, la maggior parte dei quali rapidi.

Quindi ad oggi TUTTI i test, anche se riportanti il marchio CE, sono autocertificati dal produttore, il che è come chiedere alla VolksWagen se le loro macchine inquinino in base alle norme europee...(NdR)

Nello stesso documento della Commissione Europea citato ad inizio paragrafo non possiamo non notare che all' art. 7 , tra tutti gli altri punti, nelle azioni da intraprendersi dichiara esplicitamente:

“... La Commissione, in collaborazione con gli Stati membri, faciliterà l'immissione sul mercato di dispositivi di test sicuri e affidabili. La Commissione discuterà con l'industria e le autorità competenti quali sono gli ulteriori orientamenti necessari per quanto riguarda la valutazione della conformità. La Commissione assisterà gli Stati membri nelle loro attività di vigilanza del mercato predisponendo soluzioni che consentano di accedere alle informazioni e di condividerle in modo efficiente.

Le autorità nazionali competenti hanno individuato una serie di dispositivi contraffatti che sono stati immessi sul mercato illegalmente, ad esempio con prove falsificate relative alla registrazione nazionale, con un certificato falsificato dell'organismo notificato o senza la documentazione regolamentare. Gli Stati membri hanno adottato provvedimenti per toglierli dal mercato. La Commissione continuerà ad agevolare la massima collaborazione delle autorità di regolamentazione, anche a livello internazionale, per individuare e togliere tali dispositivi dal mercato. Si raccomanda alle autorità competenti di cooperare anche con gli importatori e in particolare con i distributori, i quali possono entrambi contribuire a individuare gli scambi di dispositivi contraffatti...”

Stiamo assistendo ad una dichiarazione da parte della commissione che, al momento, asserisce che **gli stessi test finora in circolazione non sono sicuri e non sono affidabili e che addirittura in circolo fossero stati trovati test contraffatti dal produttore.**

Citando ancora dallo stesso art.7 :

“La Commissione, insieme agli Stati membri, si impegnerà nello sviluppo di strumenti che consentano di valutare le prestazioni dei dispositivi e di allineare gli approcci in tutta l'Unione, quali i materiali e i metodi di riferimento per il confronto standardizzato. Ciò richiederà una stretta cooperazione tra le autorità di regolamentazione, gli organismi di valutazione delle tecnologie sanitarie, l'ECDC, la rete di laboratori di riferimento per la Covid-19 e gli organismi e l'industria della ricerca al fine di garantire il miglior risultato possibile. La Commissione valuterà le opportunità di finanziamento più adatte a sostenere tali attività”

Ancora una volta ci troviamo di fronte ad una sconcertante dichiarazione, ovvero:

Non esistono al momento strumenti per valutare le prestazioni dei dispositivi in uso e non esistono metodi e materiali di riferimento per il confronto standardizzato (il famoso golden standard).

Per capire come e se da Aprile 2020 (data del documento europeo) ad oggi, Novembre 2020, la situazione in merito ai test PCR sia cambiata basta dare uno sguardo sul database ufficiale europeo dei test attualmente in commercio al seguente link:

https://covid-19-diagnostics.jrc.ec.europa.eu/devices?marking=&principle=NucleicAcid-PCR%20based&format=&manufacturer=&text_name=

Impostando nei campi di ricerca solo i Test che usano la PCR avremo una lunghissima lista di test, di cui per sintesi riportiamo solo la prima pagina in grafica (ma sono centinaia...)

Come è possibile notare dalla figura sono attualmente commercializzati Test che neanche soddisfano i requisiti per poter ricevere il semplice marchio CE, eppure, come già detto, **sono sul mercato** ad usufrutto dei laboratori statali e regionali che li acquistano ed usano.

CE Marking 	Detection Principle	Manufacturer	Commercial Name	Target	Format	Commercial Status
No	NucleicAcid-PCR based	Landcent Europe B.V.	Real time RT-PCR Kit for the detection of SARS-CoV-2	Nucleic acid	Manual NAT	In development
No	NucleicAcid-PCR based	AnyGenes	Efficient 2019-nCoV detection kit, one step RT-qPCR (N1 & N2)	Nucleic acid	Rapid diagnostic test	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	3B BlackBio Biotech India Ltd	TRUPCR SARS-CoV-2 RT qPCR Kit	Nucleic acid	Manual NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	Aura Biotechnologies Ltd	Quick COVID-19 Colorimetric LAMP PCR	Nucleic acid	Manual NAT	In development
No	NucleicAcid-PCR based	Aura Biotechnologies Ltd	Quick COVID-19 Realtime Multiplex PCR	Nucleic acid	Manual NAT	In development
No	NucleicAcid-PCR based	Becton Dickinson	BioGX SARS-CoV-2 Reagents for BD MAX System	Nucleic acid	Automated lab-based, near-POC NAT or POC NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	A*ccelerate	A*STAR Fortitude Kit 2.0 (Singapore HSA) – PCR kit	Nucleic acid	Manual NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	EMG	Detection Kit for the SARS-CoV-2 RNA Presence in Biological Material Using Real-Time (RUO)	Nucleic acid		Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	Acumen Research Laboratories Pte Ltd	Acu-Corona 2.0	Nucleic acid	Manual NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	Acumen Research Laboratories Pte Ltd	Acu-Corona	Nucleic acid	Manual NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	ADT Biotech	LyteStar 2019-nCoV RT-PCR Kit 1.0	Nucleic acid	Manual NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	BIONEER Corporation	SCVR-2122 AccuPower SARS-CoV-2 Real-Time RT-PCR Kit (50 tests)	Nucleic acid	Manual NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	Medical & Biological Laboratories Co., Ltd	FLUOROSEARCH Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Detection Kit	Nucleic acid	Manual NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	BIOTECON Diagnostics GmbH	Acu-CoronaTM 2.0/3.0 SARS-CoV-2 Real-time PCR Kits	Nucleic acid	Automated lab-based, near-POC NAT or POC NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	Aldatu Biosciences	PANDAA qDx SARS-CoV-2	Nucleic acid	Manual NAT	In development
No	NucleicAcid-PCR based	BIOTECON Diagnostics GmbH	virusproof SL SARS-CoV-2 Real-time PCR Kit	Nucleic acid	Automated lab-based, near-POC NAT or POC NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	MedStar Medical Co., Ltd	One-step Direct Realtime PCR Test Kit of 2019-nCoV Coronavirus	Nucleic acid	Manual NAT	In development
No	NucleicAcid-PCR based	MiCo Biomed Co. Ltd	VERI-QTM PCR 316 COVID-19 detection system	Nucleic acid	Automated lab-based, near-POC NAT or POC NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	Curative Inc. (in conjunction with KorvaLabs, Inc.)	Curative-Korva SARS-Cov-2 Assay	Nucleic acid	N.A.	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	Mobidiag	Novodiag COVID-19 + InfA/B	Nucleic acid	Automated lab-based, near-POC NAT or POC NAT	In development
No	NucleicAcid-PCR based	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Bio-Rad SARS CoV-2 ddPCR Assay	Nucleic acid	Automated lab-based, near-POC NAT or POC NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	Molbio Diagnostics Pvt Ltd	Truenat SARS CoV-2 (lab-based or near-POC)	Nucleic acid	Automated lab-based, near-POC NAT or POC NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	DNA XPERTS XPERTS COVID19	FAST RT-PCR KIT, Real time PCR kit for COVID19 detection	Nucleic acid	Manual NAT	Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	Schweitzer Biotech Company Ltd	SBC RNP qPCR Kit	Nucleic acid		Commercialised
No	NucleicAcid-PCR based	Mylab Discovery Solutions Pvt. Ltd	PathoDetect CoVID-19 Detection Kit	Nucleic acid	Automated lab-based, near-POC NAT or POC NAT	Commercialised

Sull'attuale impiego, gli scenari di utilizzo, e la significatività del risultato

Lo scopo dei famigerati Tamponi, sia dal punto di vista clinico che dal punto di vista delle intenzioni dei produttori di questi test, è quello di fornire al medico una conferma strumentale di una probabile diagnosi che lo specialista deve rilasciare, come chiarito esplicitamente nell'ultimo bollettino del British Medical Journal, BMJ Best Practice Covid-19 (3), massima autorità medico scientifica per USA, UK, Australia e Nuova Zelanda ed altri paesi britannici.

Nell'edizione recentemente aggiornata al 23 Ottobre 2020 alla pagina 23, quarto punto della Sezione "Key Recommendations" possiamo leggere:

"Order a real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to confirm the diagnosis. Upper and lower respiratory specimens are preferred. Serologic testing may be useful in some settings.[360] Results should be interpreted in the context of the pretest probability of Disease"

Traduzione:

"Ordinare una real-time PRC con trascrittasi inversa (RT-PCR) per confermare la diagnosi. Campioni dal tratto respiratorio inferiore e superiore sono i preferiti. In alcuni casi analisi sierologiche possono essere utili. I risultati dovrebbero essere interpretati nel contesto delle probabilità di pre-esposizione alla malattia"

Questo importante bollettino medico non si limita a quanto evidenziato sopra ma a pag. 28 ci suggerisce anche a chi sia il caso di fare il tampone, ovvero pazienti sintomatici, con tosse persistente, febbre, con alterazione sensoriale di gusto e olfatto, con sindrome simil influenzale, con difficoltà respiratorie.

Nel caso di pazienti asintomatici è raccomandato il test **solo** se il soggetto sia stato in contatto con una persona "documentata come infetta" per più di 15 minuti a meno di un metro di distanza (come vedremo positività al tampone non vuol dire necessariamente sintomo di infezione).

Proseguendo la lettura del BMJ e grazie alla lettura di altri studi in bibliografia, che riportiamo, si può apprendere che l'interpretazione dei risultati del test RT-PCR e seguente diagnosi di positività e/o contagiosità è un ATTO MEDICO (anche in Italia l'unica figura legalmente riconosciuta a fornire una diagnosi è il medico, non una macchina, non un test) che va fatto con estrema cautela.

Le prove per l'uso della RT-PCR a supporto di una diagnosi di COVID-19 stanno ancora emergendo e permangono incertezze sulla sua efficacia e accuratezza. Le stime dell'accuratezza diagnostica devono essere interpretate con cautela in assenza di uno standard di riferimento definitivo per diagnosticare o escludere COVID-19. Inoltre, sono necessarie ulteriori prove sull'efficacia dei test al di fuori delle strutture ospedaliere e in casi asintomatici o lievi.

Pochi sono gli studi che hanno tentato di coltivare il virus SARS-CoV-2 vivo da campioni umani. Questo è un problema, perché la coltura virale è considerata un test gold

standard rispetto al quale deve essere misurato e calibrato qualsiasi test di indice diagnostico per i virus, per comprendere le proprietà predittive di quel test.

Poiché non esiste un "gold standard" chiaro per i test COVID-19, la valutazione dei risultati dei test può essere difficile. Il giudizio clinico può essere il miglior "gold standard" disponibile sulla base di ripetizioni di tamponi, anamnesi, presentazione del quadro clinico e imaging del torace.

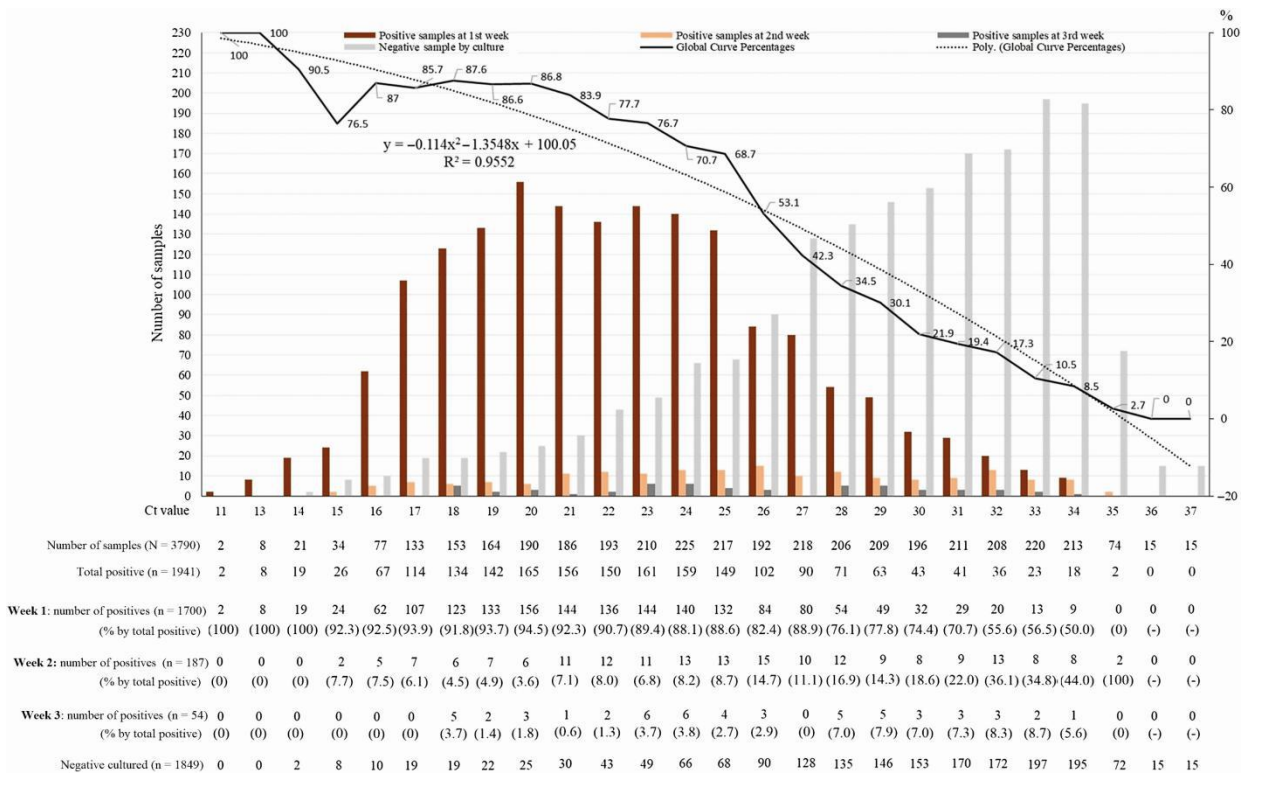
E' sempre più chiaro che un risultato positivo non indichi sempre la presenza di virus infettivo.

L' RT-PCR rileva frammenti di RNA virale, ma non è completamente compreso come questo possa essere rappresentativo di un virus infettante ai fini di una diagnosi di contagiosità, che alla fine potrebbe portare a restrizioni per le persone che non presentano un rischio di infezione. Poiché l'RNA inattivato (anche dopo una debellata infezione) si degrada lentamente nel tempo, può ancora essere rilevato molte settimane dopo che il paziente non è più contagioso.

La probabilità di rilevare virus infettivi è maggiore quando il numero di cicli soglia PCR è inferiore a 25 cicli e quando tra la comparsa dei sintomi ed il momento del test intercorre un lasso di tempo breve. (5)

Quest' ultima affermazione è frutto di un importante studio condotto su 3790 campioni risultati positivi alla PCR a 25 cicli, 30 cicli e 35 cicli.

Lo studio ha dimostrato che in pratica le colture virali di campioni giudicati positivi dopo 35 cicli di PCR restituivano un virus infettante solo nel 3% dei casi (vedi figura), **quindi mettendo in evidenza che 97 persone su 100 fossero state giudicate positive ed infettanti senza un fondato motivo** ma solo perché fosse stato amplificato a dismisura un residuo di RNA virale di cui non ci si prende la briga di capire da dove venga.



Su questo ed un altro significativo studio pubblicato sull'autorevolissimo "the Lancet" (6) che conferma quanto detto finora, si basa anche la sentenza della Corte d'Appello portoghese che giudica i tamponi inaffidabili e, su questa base, tutte le violazioni delle libertà e dei diritti, individuali e collettivi sono illegittime.

Anche in Italia uno studio simile ha portato agli stessi risultati, infatti, il Dott. Fausto Baldanti, Responsabile dell'Unità Virologica Molecolare al Policlinico San Matteo di Pavia, ha spiegato che, da un'indagine da loro condotta su quasi 400 pazienti dimessi dall'ospedale con CT 30, media positività, solo 9 (il 2,3%) risultavano in grado di trasmettere l'infezione alle colture cellulari.

N. B. per implicita ammissione del Ministero della Salute sappiamo che in Italia il ciclo soglia è 35 cicli, lo possiamo leggere alla pag. 4, righe 3 e 4 della circolare ministeriale 0009480 del 19/03/2020.

Questi studi confermano che **la positività al test non è sinonimo di contagiosità**, in quanto riscontrare un frammento di RNA virale non implica aver trovato un virus intero e funzionale, al massimo vuol dire aver trovato una traccia del contatto tra il virus ed il soggetto del tampone, evento che **come tutti gli asintomatici mostrano, non scatena necessariamente la malattia**.

L'interpretazione dei risultati del test dipende dall'accuratezza del test stesso e dalle probabilità di esposizione alla malattia pre e post test. L'accuratezza del risultato dipende da vari fattori tra cui il sito e la qualità del campionamento, lo stadio della malattia, il grado di moltiplicazione o eliminazione virale, prevalenza della malattia.

- **Sensibilità e specificità:** La sensibilità è la percentuale di pazienti con malattia che hanno un test positivo o il vero tasso positivo. La specificità è la percentuale di pazienti senza malattia che hanno un test negativo o un vero tasso negativo. La sensibilità aggregata è stata stimata essere dell'87,8%, con una specificità "stimata" compresa con valori che partono dall' 87%

- **Probabilità pre-test:** la stima della probabilità pre-test deve essere effettuata utilizzando la conoscenza dei tassi locali di infezione dai dati nazionali e regionali, nonché i sintomi del paziente, la potenziale esposizione ai casi, una precedente storia medica di COVID-19 o la presenza di anticorpi, e la probabilità di una diagnosi alternativa.

Quando la probabilità di pretest è bassa, i risultati positivi dovrebbero essere interpretati con cautela e, idealmente, un secondo campione andrebbe testato per la conferma.

- **Probabilità post-test:** minore è la prevalenza della malattia in una data popolazione, minore è la probabilità post-test.

Ad esempio, se un test con una specificità del 99% viene utilizzato per testare una popolazione **sintomatica**, ad alto rischio, in cui la probabilità di infezione è del 50%, il valore predittivo positivo è del 99%. Ciò significa che per ogni 100 persone con un risultato del test positivo, 99 persone avranno un'infezione da SARS-CoV-2 ma 1 persona senza infezione avrà un risultato falso positivo.

Al contrario, in una popolazione **asintomatica**, a basso rischio, in cui la probabilità di infezione è bassa (es. 0,05%), il valore predittivo positivo è di circa il 4,3%. **Ciò significa che per ogni 100 persone con un risultato del test positivo, da 4 a 5**

persone avranno una reale infezione da SARS-CoV-2, ma da 95 a 96 persone senza infezione avranno un risultato falso positivo.

Anche un rapporto del ISS (Istituto Superiore di Sanità) conferma questo studio (11).

“ Nella tabella che segue, tratta dal documento Rapid diagnostic tests for COVID-19, viene mostrato con un esempio numerico come la capacità di identificare correttamente i positivi (colonna PPV) sia correlata sia alla sensibilità e specificità del test, sia alla prevalenza del marcatore nella popolazione target, esemplificata da quattro coorti di 1.000 individui con quattro diversi valori di prevalenza: 2%, 5%, 10% e 30%.

Cohort	Pre-test probability (prevalence)	Sensitivity	Specificity	Cases	Non-cases	True positive (TP)	False negative (FN)	True negative (TN)	False positive (FP)	PPV	NPV
High performance											
1,000	2.0%	95%	98%	20	980	19	1	960	20	49.2%	100%
1,000	5.0%	95%	98%	50	950	48	2	931	19	71.4%	100%
1,000	10.0%	95%	98%	100	900	95	5	882	18	84.1%	99%
1,000	30.0%	95%	98%	300	700	285	15	686	14	95%	98%
Mid performance											
1,000	2.0%	85%	90%	20	980	17	3	882	98	14.8%	100%
1,000	5.0%	85%	90%	50	950	43	8	855	95	30.9%	99%
1,000	10.0%	85%	90%	100	900	85	15	810	90	48.6%	98%
1,000	30.0%	85%	90%	300	700	255	45	630	70	78%	93%
Low performance											
1,000	2.0%	75%	85%	20	980	15	5	833	147	9.3%	99%
1,000	5.0%	75%	85%	50	950	38	13	808	143	20.8%	98%
1,000	10.0%	75%	85%	100	900	75	25	765	135	35.7%	97%
1,000	30.0%	75%	85%	300	700	225	75	595	105	68%	89%

Impiegando **su una popolazione con bassa prevalenza (2%)** un saggio low performance, con sensibilità 75% e specificità 85%, il saggio rileva $15 + 147 = 162$ positivi, dei quali però solo 15 sono veri positivi (PPV: 9,3%), quindi **sostanzialmente il test non è di alcuna utilità pratica per identificare i positivi su tale popolazione**. I risultati migliorano molto impiegando sulla stessa popolazione un saggio high performance, con sensibilità 95% e specificità 98%: in tal caso il test rileva un totale di $19 + 20 = 39$ positivi, dei quali 19 sono veri positivi (PPV: 49,2%). I valori riportati in tabella mostrano che al crescere dei valori di prevalenza nella popolazione aumenta la proporzione di veri positivi identificati con tutti i tipi di test, con le differenze tra i valori di PPV che si attenuano. Poiché però i valori di prevalenza in una popolazione sono spesso poco noti o del tutto ignoti, è chiaro che è sempre preferibile l'impiego di test con i valori più alti possibile di sensibilità e specificità; diventa poi indispensabile l'impiego di test con alta/altissima sensibilità e

specificità se già ci si attende una bassa prevalenza”.

I risultati falsi positivi possono essere causati anche da un errore di laboratorio o da una reazione crociata con anticorpi formati dall'esposizione attuale e/o passata a infezioni stagionali causate da altri coronavirus umani (ad es. comune raffreddore) o anche ad Influenza A e B(3)

I risultati falsi positivi sono più probabili quando la diffusione di SARS-COV-2 è da moderata a bassa.

Lo studio a cui abbiamo già accennato su “The Lancet” (6) mette in evidenza, ancora la mancanza di un golden standard ma anche un’ altro fattore di cui tener conto, ovvero questi kit sono spesso testati in condizioni idealizzate con campioni ospedalieri contenenti carichi virali più elevati di quelli di individui asintomatici che vivono nella comunità. Pertanto, le prestazioni diagnostiche o operative dei test del tampone nel mondo reale potrebbero differire sostanzialmente dalla sensibilità e dalla specificità analitiche. A testimonianza dell’ inaffidabilità dei tamponi lo studio evidenzia anche la presenza di falsi negativi, e proprio nelle situazioni ove questi possono fare più danno ovvero condizioni di pre test di grande esposizione, come personale sanitario, si immagini un infermiere falso negativo libero di circolare in ospedale.

La preziosità di questo studio si basa anche nel considerare il valore che un test falso positivo ha nel suo impattare sulla società e sull’ individuo.

Sempre il BMJ mette a disposizione un prezioso tool interattivo online, insieme ad uno studio (8), che aiuta a valutare il valore del risultato di un test, anche in questo studio emerge che “...Sono necessarie ulteriori prove e validazione indipendente dei test covid-19. Poiché gli studi attuali mostrano notevoli variazioni e tendono a sopravvalutare la sensibilità (del test)...” e che il risultato del test non è significativo se non inquadrato in un contesto clinico e di reale esposizione.

Sempre inerente l’interpretazione dei risultati bisogna toccare un tasto dolente, tutto italiano, con la circolare del Ministero della Salute 0009480 del 19/03/2020 già menzionata si stabilisce a tavolino che:

”In aree con diffusa trasmissione COVID-19 è considerata sufficiente quale diagnosi di laboratorio la positività al test RT-PCR rilevata su un singolo gene target di SARS-CoV-2. Test di conferma devono essere effettuati solo per i campioni in cui il risultato è difficilmente interpretabile o il ciclo soglia in RT-PCR è maggiore di 35. In questi casi si raccomanda di ripetere il test su una nuova raccolta di campione.”

Questa circolare può di per sé sembrare senza un particolare valore, in realtà crea dei presupposti per invalidare la positività di tutti i tamponi effettuati seguendo i dettami del documento per un semplice motivo:

Senza addentrarci nei particolari dello studio del Dott. Stefano Scoglio, cosa che questa commissione si riserva di fare in un secondo momento, **la circolare invalida le specifiche ed i termini di validità tecniche del produttore dei test.**

Ipotizzando per assurdo che tutti i test in commercio siano affidabili, sicuri, sensibili e

specifici quanto il produttore riporta al momento della richiesta di immissione in commercio, essi lo sono entro le condizioni ideali che il produttore indica. Generalmente l'orientamento dei produttori è di specificare i requisiti minimi dei laboratori che useranno il test dovrebbero avere (vedi figura)

EMERGENCY USE AUTHORIZATION (EUA)
SUMMARY
DSL COVID-19 Assay
(SARS-CoV-2 detection based on N1, N3, and S genes)
Diagnostic Solutions Laboratory, LLC

For *In vitro* Diagnostic Use
Rx Only
For use under Emergency Use Authorization (EUA) only

The DSL COVID-19 assay will be performed at the Diagnostic Solutions Laboratory, certified under the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA), 42 U.S.C. §263a to perform high complexity tests as per Laboratory Standard Operating Procedure that was reviewed by the FDA under this EUA.

INTENDED USE

The DSL-COVID19 assay is a RT-qPCR test intended for the qualitative detection of nucleic acid from the SARS-CoV-2 in upper respiratory specimens (such as nasal, mid-turbinate, nasopharyngeal, and oropharyngeal swabs) and bronchioalveolar lavage (BAL) specimens from patients suspected of COVID-19 by their healthcare provider. Testing is limited to Diagnostic Solutions Laboratory, LLC which is certified under the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA), 42 U.S.C. § 263a, and meets requirements to perform high complexity tests.

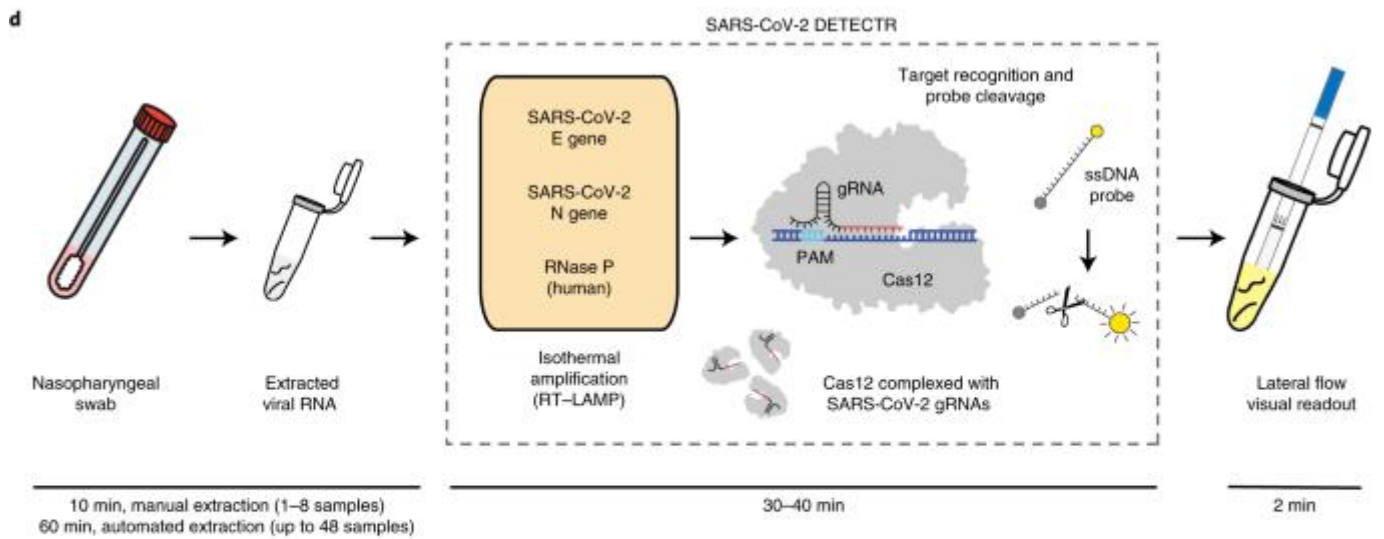
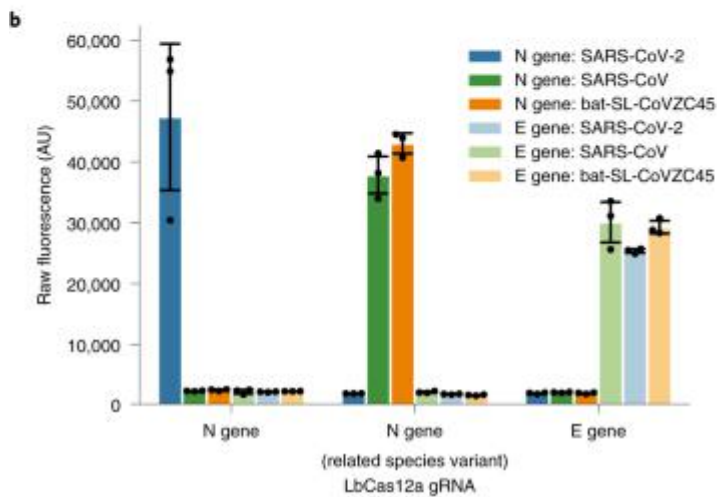
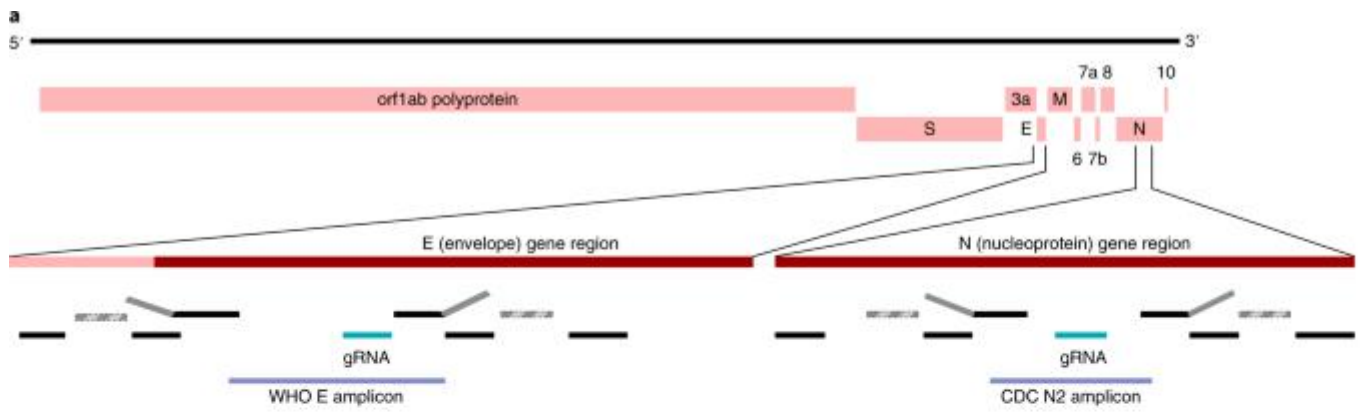
Results are for the detection of SARS-CoV-2 RNA. The SARS-CoV-2 RNA is generally detectable in upper respiratory specimens and BAL during the acute phase of infection. Positive results are indicative of the presence of SARS-CoV-2 RNA; clinical correlation with patient history and other diagnostic information is necessary to determine patient infection status. Positive results do not rule out bacterial infection or co-infection with other viruses. The agent detected may not be the definite cause of disease.

e la lettura della valenza di positivo che il test può avere in base alla corrispondenza ai geni trovati specifici per i primer utilizzati.

Quindi se un produttore auto-certifica che entro certi limiti strumentali ed ambientali (dettati dalle condizioni operative del laboratorio) il test darà positività solo se tutti e tre i geni individuati dai primers verranno trovati, non si può con un atto meramente burocratico sovrascrivere questi requisiti minimi e senza aver ascoltato preventivamente tutti i produttori di tutti i test in commercio. Un esempio in figura.

Esame	Esito	U.M.	Valori di Riferimento
M-BIOLOGIA MOLECOLARE / tel.: 06.3306.2651			
Materiale: tampone Provenienza: naso-faringeo			
SARS-CoV2 (COVID-19) PCR			
E-gene (Sarbecovirus)	NON RILEVATO		
RdRp2-gene (SARS-CoV-2)	NON RILEVATO		
N-gene (SARS-CoV-2)	RILEVATO		
ESITO	POSITIVO		
<p><i>Rilevata positività con valori di Ct >35. Si ricorda che tale condizione in più del 95% dei casi non è associata a presenza di infettività. (Nota AMCLI prot. U060-2020 del 28/08/2020). Si consiglia, a ogni buon fine, controllo nel tempo.</i></p> <p><i>Note:</i></p> <p><i>- dal 02/04/2020, in accordo con il centro coordinatore regionale, la rilevazione anche di un singolo gene target di SARS-CoV-2 viene interpretata come esame POSITIVO.</i></p>			
T-Real Time PCR			
Il Responsabile D.ssa Maria Cristina Puzolo			

Vediamo adesso, nella seguente pagina, invece, quello che l'ideatore del test dichiara nello studio ed indicazioni di operatività che supporta la validità del proprio test



Come si può osservare il produttore dichiara che **per avere positività certa il numero di geni trovati deve essere almeno 2**, mentre nel caso del solo gene E come nel caso del solo Gene N la positività è solo presunta, questo perché E e N sono geni a cui anche il vecchio virus della SARS può rispondere, più o meno parzialmente, mentre RNP ha la funzione di controllo ovvero se la PCR non lo rileva vuol dire che bisogna ripetere il test in quanto ci deve essere stato un errore, come la seconda linea dei test di gravidanza per intenderci.

Per maggior chiarezza vista la estrema somiglianza del SARS al SARS-CoV-2 sarebbe strano che che il primer del Gene E non rispondesse ad entrambi, non a caso il gene E viene parzialmente usato anch'esso come controllo come vediamo nella seguente figura (10)

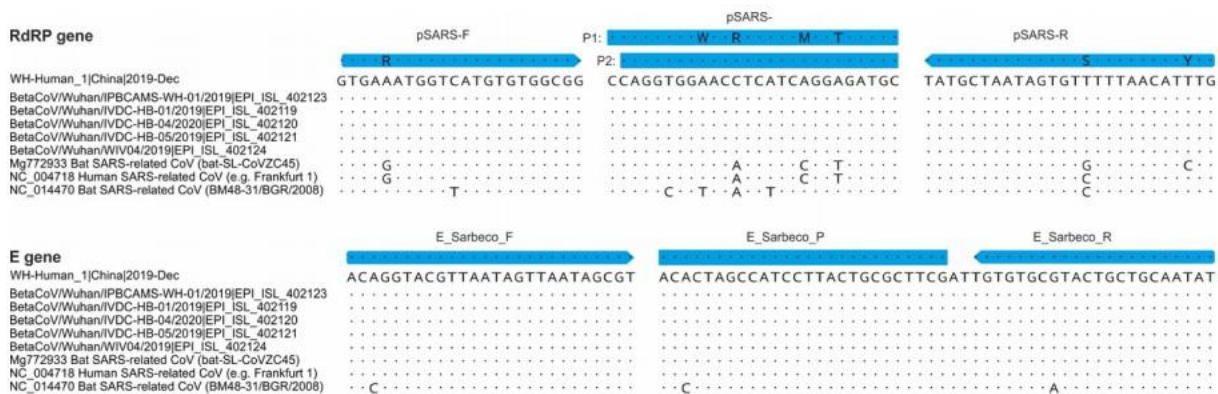


Figure 2 Partial alignments of oligonucleotide binding regions. Panels show six available sequences of 2019-nCoV, aligned to the corresponding partial sequences of SARS-CoV strain Frankfurt 1, which can be used as a positive control for all three RT-PCR assays. The alignment also contains the most closely-related bat virus (Bat SARS-related CoV isolate bat-SL-CoVZC45, GenBank Acc.No. MG772933.1) as well as the most distant member within the SARS-related bat CoV clade, detected in Bulgaria (GenBank Acc. No. NC_014470). Dots represent identical nucleotides compared to sequence Wuhan-Hu 1. Substitutions are specified. More comprehensive alignments in the Appendix.

Figura 2 Allineamenti parziali delle regioni di legame degli oligonucleotidi. I pannelli mostrano sei disponibili sequenze di 2019-nCoV, allineate alle corrispondenti sequenze parziali del ceppo SARS-CoV di Francoforte 1, che può essere utilizzato come controllo positivo per tutti e tre i test RT-PCR. L'allineamento contiene anche il più strettamente correlato virus del pipistrello (Bat-SL-CoVZC45, GenBank CoV correlato alla SARS) Acc.No. MG772933.1) nonché il membro più distante all'interno del clade CoV pipistrello correlato alla SARS, rilevato in Bulgaria (GenBank Acc. No. NC_014470). I punti rappresentano nucleotidi identici rispetto a sequenza Wuhan-Hu 1. Le sostituzioni sono specificate. Allineamenti più completi nell'Appendice.

Come si evince dalle linee di punti senza alcuna lettera il primer e quindi il gene corrisponde a diverse altre specie virali oltre che SARS-CoV e SARS-CoV-2

A scanso di equivoci ci si tiene a sottolineare che virus come SARS e MERS (ma anche tanti altri) sono scomparsi dal panorama epidemiologico, ma non si sono estinti o hanno smesso di circolare. Questi virus così come avverrà anche per il SARS-CoV-2, si sono adattati all'ospite (che gli occorre per sopravvivere e replicarsi) non causando più le sintomatologia patologica che li contraddistingueva. Nell' ambito dei coronavirus questo processo è sempre esistito dall'inizio della vita sulla terra.

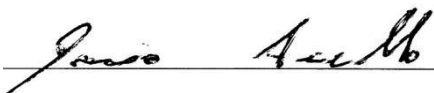
CONCLUSIONI

Per tutti i motivi finora esposti dobbiamo concludere che i Test RT-PCR rivolti alla ricerca del virus SARS-CoV-2 attualmente utilizzati in Italia non sono sufficientemente affidabili come strumento diagnostico, soprattutto quando fatti “a tappeto” senza una preventiva anamnesi medica e senza contestualizzazione alcuna dei pazienti. I valori che i test restituiscono non sono sufficientemente riproducibili per mancanza di standard metodici e strumentali, e per mancanza di campioni di calibrazione e per la molteplicità di test in commercio e per le differenze di operatività che immancabilmente si riscontra tra i vari laboratori. L'interpretazione stessa dei test viene eseguita al di fuori delle specifiche dei produttori, per circolare ministeriale, e soprattutto si dà senza motivo medico alcuno al valore di positività il sinonimo di infettività cosa che il test non riesce e non può stabilire per vizi metodici, quali Ct troppo alti, e di interpretazione ovvero mancanza di valori predittivi prima dell'esecuzione del tampone. Si ricorda inoltre che in Italia gli unici professionisti riconosciuti per legge rilasciare una diagnosi medica sono appunto i medici e nessun test, nessun Decreto e nessuna ordinanza regionale o comunale può ad oggi cambiare questo dato di fatto. La seguente relazione viene rilasciata con diritto di integrazione

Belluno, 29 Novembre 2020

Per la commissione “Ars Medica”

Dott. Dario Aiello
Chimico Farmaceutico
Membro del General Pharmaceutical Council (2088234)
Iscritto all'Ordine dei farmacisti della Provincia di Belluno



Revisione da parte di:

Dott. Roberto Risi
Medico Chirurgo
Specialista in Dermatologia
Master universitario di secondo livello in Agopuntura e Medicina Cinese



BIBLIOGRAFIA

- 1) Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR
<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045;jsessionid=HATNrQuFxiAoHtG5y271ann4.i-ob3d9850f4681504f-ecdclive>
- 2) WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020
<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19--11-march-2020>
- 3) BMJ Best Practice Covid-19
<https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/3000201/pdf/3000201/Coronavirus%20disease%202019%20%28COVID-19%29.pdf>
- 4) Public Health Laboratory Network. PHLN statement on nucleic acid test false positive results for SARS-CoV-2. 2020 [internet publication]. Full text (<https://www.health.gov.au/resources/publications/phln-statement-on-nucleic-acid-test-false-positive-results-for-sars-cov-2>)
- 5) Correlation Between 3790 Quantitative Polymerase Chain Reaction–Positives Samples and Positive Cell Cultures, Including 1941 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Isolates
<https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa1491/5912603>
- 6) False-positive COVID-19 results: hidden problems and costs
[https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600\(20\)304537/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(20)304537/fulltext)
- 7) Comparative genome analysis of novel coronavirus (SARS-CoV-2) from different geographical locations and the effect of mutations on major target proteins: An in silico insight
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0238344>
- 8) Interpreting a covid-19 test result
<https://www.bmj.com/content/369/bmj.m1808>
- 9) CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2
<https://www.nature.com/articles/s41587-020-0513-4>
- 10) Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR
<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf>
- 11) ISS COVID-19 n. 46/2020 - Dispositivi diagnostici in vitro per COVID-19. Parte 2: evoluzione del mercato e informazioni per gli stakeholder. Versione del 23 maggio 2020
https://www.iss.it/rapporti-covid-19/-/asset_publisher/btw1J82wtYzH/content/id/5421422?_com_liferay_asset_publisher_web_portlet_AssetPublisherPortlet_INSTANCE_btw1J82wtYzH_redirect=https%3A%2F%2Fwww.iss.it%2Frapporti-covid-19%3Fp_id%3Dcom_liferay_asset_publisher_web_portlet_AssetPublisherPortlet_INSTANCE_btw1J82wtYzH%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26_com_liferay_asset_publisher_web_portlet_AssetPublisherPortlet_INSTANCE_btw1J82wtYzH_cur%3D0%26p_r_p_resetCur%3Dfalse%26_com_liferay_asset_publisher_web_portlet_AssetPublisherPortlet_INSTANCE_btw1J82wtYzH_assetEntryId%3D5421422

