



**Valutazione dell'idoneità della tecnica RT-qPCR per  
rilevare una possibile infezione e infettività delle  
persone rispetto al SARS-CoV-2.**

parere scientifico

Kämmerer, Ulrike

## **Prefisso**

La reazione a catena della polimerasi (Polymerase Kettenreaktion; PCR) è un metodo molecolare straordinario, che consente di rilevare in laboratorio minuscole tracce di un acido nucleico ricercato (DNA o RNA, a seconda della variante della PCR). Questa tecnica è un aiuto prezioso nell'analisi di modelli genetici in campioni microscopici nella ricerca, ma anche nella diagnostica di routine, come nelle indagini forensi, nel monitoraggio della contaminazione di grandi lotti di alimenti e bevande, nella ricerca di tracce di specie animali non autorizzate, ad esempio in prodotti a base di carne/salumi (parola chiave carne di cavallo nel macinato) o nel monitoraggio dei prodotti sanguigni per genomi virali di HIV e virus dell'epatite.

Tuttavia, questa estrema sensibilità rende la tecnica anche molto suscettibile a contaminazioni (vedi „Phantom von Heilbronn“ al punto 3.5) o a interpretazioni eccessive dei risultati, se la PCR viene utilizzata come unico criterio senza ulteriore contesto. Ad esempio, una firma genetica trovata su una persona ricercata in una scena del crimine può essere considerata solo come un indizio e non permette di dimostrare con certezza che la persona fosse fisicamente presente, né se la traccia genetica trovata provenga da una persona viva o deceduta. Per confronto: la sensibilità della PCR è così elevata che è paragonabile a un etilometro che rilevi ancora 0,000000008 di tasso alcolico nel sangue e dichiari la persona “ubriaca”, creando problemi a un automobilista durante un controllo, anche se non ha consumato nemmeno una goccia di alcol né mostra alcun segno di consumo.

La tecnica della PCR (anche RT-PCR o RT-qPCR) può, indipendentemente dall'estrema sensibilità, sempre e solo amplificare e rilevare il segmento genetico ricercato. Tuttavia, non è possibile determinare con questa tecnica se esso provenga da un organismo vitale o capace di replicarsi.

La reazione a catena della polimerasi quantitativa con trascrittasi inversa (RT-qPCR) utilizzata nella ricerca dei casi di SARS-CoV-2 è una variante della PCR, in cui il materiale di partenza, l'RNA, viene prima trascritto in DNA, per poi essere amplificato nella PCR in modo tale che, a ogni ciclo di copia, segnali luminosi consentano di risalire alla quantità dei genomi duplicati.

Come unico strumento diagnostico per un'infezione attiva o addirittura la contagiosità con SARS-CoV-2, questa tecnica molecolare è già inadeguata per una sperimentazione di massa per numerose ragioni. Tuttavia, con la tecnica PCR, si può supportare una diagnosi differenziale in presenza di una sintomatologia preesistente, rilevando la firma genetica di un possibile agente patogeno, che il clinico può poi correlare ai sintomi del paziente. Tuttavia, una PCR non deve e non può mai essere l'unico criterio diagnostico per una possibile malattia.

Nel dibattito sull'idoneità della RT-qPCR per identificare pazienti Covid-19, spesso un test PCR positivo in una persona sana e asintomatica viene utilizzato per definirla un “paziente asintomatico”. Tuttavia, secondo le definizioni generalmente valide dei termini, una persona

senza sintomi clinici ("asintomatica") non è né infetta né un paziente, si veda ANNEX 1 (definizioni dei termini) e i punti 1.5 e 1.6.

**Nota: molti link nel testo non funzionano direttamente, ma devono essere copiati e incollati nel browser.**

## Indice

|  |           |
|--|-----------|
| 1. Definizione e descrizione di termini importanti .....   | 4         |
| 2. Considerazioni generali sul valore diagnostico rispetto alla questione dell'infettività ..... | 6         |
| 2.1.1 Ufficio federale svizzero per la protezione della popolazione .....                        | 7         |
| 2.1.2. Dr. Antony Fauci .....  | 7         |
| 2.1.3 Prof.ssa Marion Koopmans .....   | 9         |
| 2.1.4 Ministero della Salute Svedese .....   | 10        |
| 2.1.5 National Centre for Infectious Disease di Singapore .....                                  | 11        |
| 2.1.6 Pubblicazione su Nature di Wölfel, Drosten sui casi Webasto .....                          | 11        |
| 2.1.7 Articolo su Nature Reviews di Isabella Eckerle (Ginevra) .....                             | 12        |
| 2.1.8 Zentrum für Evidenzbasierte Medizin .....  | 13        |
| 2.1.9 Informazioni dalla Cleveland Clinic .....  | 14        |
| 2.1.10 Informazioni ufficiali del Governo Canadese .....   | 15        |
| 2.1.11 Linea guida del CDC sull'Influenza .....  | 15        |
| 2.1.12 Ministero della Salute Australiano e valutazione dei "Fact-checker" .....                 | 16        |
| 2.1.13. Sito del RKI sulla valutazione della PCR come non infettiva .....                        | 18        |
| La preparazione dei campioni esclude il rilevamento di virus replicabili .....                   | 19        |
| 2.3. Conclusione intermedia: .....   | 20        |
| 2.1. Illustrazione .....   | 22        |
| <b>3. Fattori che influenzano l'affidabilità del test PCR .....</b>                              | <b>23</b> |
| 3.1. Progettazione della PCR e specificità .....   | 23        |
| 3.2. Numero dei geni target indipendenti .....   | 24        |
| 3.3. Numero di cicli effettuati (valore Ct) nella qPCR .....                                     | 27        |
| 3.3.1 Importanza del valore Ct .....   | 27        |
| 3.3.2 Prove della rilevanza del valore CT .....  | 29        |
| 3.4. Probabilità pre-test .....  | 36        |
| 3.4.1. Spiegazione di Correctiv .....  | 36        |
| 3.4.2. Spiegazione fornita dal RKI sui test rapidi antigenici (Annex 7) .....                    | 38        |
| 3.4.3. Pubblicazione sul problema della probabilità pre-test nella PCR .....                     | 40        |
| 3.5. Valutazione intermedia .....  | 40        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.6. Controlli adeguati .....   | 41        |
| 3.6.1. Fornitura di controlli adeguati .....  | 43        |
| 3.6.2. Test a circuito chiuso: anomalie al primo approccio.....   | 44        |
| 3.7. Esclusione di contaminazioni dei reagenti e problemi nei processi operativi.....                         | 46        |
| 3.7.1 Contaminazione all'interno del laboratorio dovuta a errori nei processi.....                            | 46        |
| 3.7.2. Contaminazione dei materiali/reagenti dal produttore.....  | 48        |
| 3.7.3. Valutazione intermedia .....   | 49        |
| 3.8. Kit PCR commerciali .....  | 49        |
| <b>4. Correlazione tra rilevamento positivo di acidi nucleici nella RT-qPCR, malattia e infettività .....</b> | <b>50</b> |
| 4.1. Valutazione del Deutsches Ärzteblatt.....  | 51        |
| <b>4.2. Comunicazione ufficiale del CDC.....</b>  | <b>51</b> |
| 4.3. Ufficio Sanitario di Francoforte.....  | 51        |
| <b>4.4. Pubblicazione del CDC.....</b>  | <b>52</b> |
| 4.5. Informazioni della WHO per i laboratori di analisi .....   | 52        |
| <b>4.6. Pubblicazione su Lancet .....</b>   | <b>53</b> |
| 4.7. Dichiarazioni di Christian Drosten.....  | 54        |
| 4.7.1 Perizia di Drosten per il Tribunale .....   | 54        |
| 4.7.2. NDR Podcast 94 .....   | 54        |
| 4.7.3. Pubblicazione su Science.....  | 54        |
| <b>5. Dichiarazioni sulla diagnostica PCR dai protocolli del RKI .....</b>                                    | <b>55</b> |
| <b>6. Conclusione e Sintesi .....</b>   | <b>63</b> |
| <b>7. Allegati.....</b>   | <b>64</b> |

## 1. Definizione e descrizione di termini importanti

### 1.1 Reazione a Catena della Polimerasi (PCR)

La **Reazione a Catena della Polimerasi (PCR)** è una tecnica molecolare avanzata che permette di amplificare un frammento definito di DNA, solitamente di lunghezza compresa tra **100 e 1000 basi**. Questo processo si basa sull'uso di un enzima, la polimerasi, e richiede due brevi frammenti di DNA a singolo filamento, chiamati **primer**, che delimitano la regione da amplificare.

I **primer** sono costituiti da una sequenza di basi nucleotidiche (solitamente tra **18 e 25**) specifiche per le regioni del DNA che fiancheggiano il segmento di interesse. La loro specificità è essenziale per garantire che la PCR amplifichi esclusivamente la sequenza desiderata. La progettazione dei primer utilizza banche dati genetiche e software specializzati (es. Primer-Blast), e la loro sintesi viene effettuata da aziende specializzate. Prima dell'uso, i primer

vengono testati per confermare la loro specificità in condizioni sperimentali diverse, utilizzando controlli **positivi e negativi**.

Il processo della PCR avviene in cicli ripetuti, composti da tre fasi principali:

1. **Denaturazione:** La miscela viene riscaldata a oltre **90°C**, separando i due filamenti del DNA in singoli filamenti.
2. **Annealing:** La temperatura viene abbassata per permettere l'adesione dei primer alle regioni complementari dei filamenti di DNA separati.
3. **Estensione:** La polimerasi estende i filamenti di DNA partendo dai primer, ricostruendo il filamento complementare per creare un doppio filamento, a una temperatura di circa **72°C**.

Ogni ciclo di PCR raddoppia la quantità di DNA target, portando a un'amplificazione **esponenziale**. Ad esempio, da un singolo filamento di DNA, si ottengono **1.024 copie dopo 10 cicli**, oltre **1 milione dopo 20 cicli** e più di **1 miliardo dopo 30 cicli**.

## 1.2 PCR Quantitativa (qPCR)

La **PCR quantitativa (qPCR)** è una variante della PCR che consente di monitorare l'amplificazione del DNA in tempo reale. Essa utilizza una **sonda** marcata con un **fluoroforo** e un **quencher**, progettata per legarsi a una regione specifica del DNA target. Durante l'estensione, la polimerasi degrada la sonda, liberando il fluoroforo, il cui segnale viene rilevato da uno strumento dedicato.

La quantità di fluorescenza aumenta con il progredire dei cicli, e il ciclo in cui il segnale supera una soglia prestabilita è definito valore **CT (Cycle Threshold)**. Un valore CT basso indica un'elevata quantità iniziale di DNA target, mentre un valore CT alto può indicare una scarsa quantità o la presenza di amplificazioni non specifiche.

## 1.3 Reazione di Trascrittasi Inversa (RT)

La **reazione di trascrittasi inversa (RT)** è necessaria quando il materiale genetico iniziale è RNA, come nel caso del SARS-CoV-2, un virus a RNA. L'enzima trascrittasi inversa converte l'RNA in DNA complementare (**cdNA**), che può poi essere amplificato tramite PCR.

Per valutare l'affidabilità di un test basato su RT-qPCR, si esaminano la **sensibilità** e la **specificità** del sistema utilizzando campioni noti contenenti sia il gene target corretto che geni simili ma non target.

## 1.4 Sensibilità e Specificità

La **sensibilità** della PCR (in tutte le sue varianti) indica la capacità del test di rilevare anche minime quantità del gene target, mentre la **specificità** riflette la capacità del test di evitare falsi positivi rilevando geni simili ma non target. Errori come contaminazioni possono comunque portare a falsi positivi, che possono essere minimizzati attraverso rigorose **procedure operative standard (SOP)** e controlli esterni regolari.

## 1.5 Infezione

Un'infezione è definita dalla presenza simultanea di:

- Penetrazione di microrganismi (come batteri o virus) nell'organismo.
- Moltiplicazione dei microrganismi all'interno del corpo.
- Risposta dell'organismo, come sintomi.

I sintomi di un'infezione da SARS-CoV-2, secondo il **CDC**, possono includere:

- **Febbre o brividi**
- **Tosse**
- **Affaticamento**
- **Perdita di gusto o olfatto**
- **Mal di gola**
- **Naso chiuso o che cola**
- **Diarrea**

Per ulteriori descrizioni relative alla definizione del termine "infezione", vedere l'**Allegato 1**.

## 1.6 Paziente

Un **paziente** è definito come una persona che riceve assistenza da professionisti sanitari per sintomi di malattie, lesioni o altre condizioni di salute compromessa. Pertanto, una persona **asintomatica** e priva di problemi medici non può essere definita "paziente".

Per ulteriori descrizioni relative alla definizione del termine "paziente", vedere l'**Allegato 1**.

## 2. Considerazioni generali sul valore diagnostico rispetto alla questione dell'infettività

L'inventore del test PCR, il Premio Nobel Kary Mullis, scomparso nell'agosto 2019, ha sempre sottolineato che il suo test è progettato unicamente per rendere visibile, tramite amplificazione (replicazione), una molecola altrimenti invisibile all'occhio umano (l'acido

desossiribonucleico, DNA) o un frammento di DNA. Tuttavia, **non consente di stabilire se ciò che viene rilevato sia pericoloso o causi malattia.**

**In particolare, un test PCR – anche se condotto correttamente – non può fornire alcuna indicazione sul fatto che una persona sia infettata da un agente patogeno attivo o meno.** Infatti, il test non distingue tra "materia morta", come un frammento genomico del tutto innocuo risultato dal combattimento del sistema immunitario contro un raffreddore o un'influenza (frammenti che possono essere rilevati anche mesi dopo che il sistema immunitario ha risolto il problema), e "materia viva", ovvero un virus fresco e riproducibile.

*Nota: La PCR viene utilizzata, ad esempio, in ambito forense per amplificare frammenti di DNA residuo da capelli o altri materiali di traccia, al fine di identificare l'origine genetica del/i colpevole/i ("impronta genetica"). Tuttavia, anche in questi casi, l'analisi PCR non può stabilire se la persona identificata fosse effettivamente presente sul luogo (o se si tratti di materiale contaminato, vedi punto 3.5.2 sul caso "Il fantasma di Heilbronn") e, se presente, se fosse viva o morta in quel momento.*

## 2.1 Dichiarazioni ufficiali di istituzioni / esperti rilevanti

**Sull'inadeguatezza della PCR come unico test diagnostico per determinare l'infettività o il rischio di trasmissione**

**Nota preliminare:** Sul sito del Ministero federale della salute tedesco si afferma correttamente che la PCR viene utilizzata per determinare il tipo di agente patogeno nei pazienti malati. ([Ministero federale della salute](#)). Si legge nella sezione "Quali test sono adatti a cosa":

*"I test PCR basati su laboratorio, considerati il gold standard della diagnostica, vengono utilizzati principalmente per determinare, in una persona con sintomi, se vi sia un'infezione da SARS-CoV-2. Un medico può richiedere un test PCR nell'ambito di un trattamento medico. Anche in persone asintomatiche, un test PCR può essere utile per confermare un test antigenico positivo."*

**Le fonti citate di seguito (A-J) confermano tutte che la PCR (in tutte le sue varianti) può rilevare il frammento genomico di un agente patogeno nella provetta (ad esempio, frammenti di RNA del virus SARS-CoV-2), ma non può stabilire se una persona sia infettata attivamente o infettiva. Solo l'infettività dimostrata può giustificare misure di isolamento, il che con la PCR non è MAI possibile.**

Prove nel dettaglio:

### 2.1.1 Ufficio federale svizzero per la protezione della popolazione

Nel volantino informativo dell'**Ufficio federale svizzero per la protezione della popolazione (BABS)**, pubblicato dal Laboratorio di Spiez, il limite della PCR viene descritto come segue:

*"Si possono rilevare solo agenti patogeni di cui è nota la sequenza genetica. Resta sconosciuto se un agente patogeno sia infettivo (virulento, 'vivo') o meno."*

La pagina originale non è più disponibile, ma è archiviata sul Web ([https://web.archive.org/web/20210706132230/https://www.labor-spiez.ch//pdf/de/dok/pos/88\\_021\\_Plakate\\_PCR\\_d.pdf](https://web.archive.org/web/20210706132230/https://www.labor-spiez.ch//pdf/de/dok/pos/88_021_Plakate_PCR_d.pdf)).

Il documento è incluso come **ANNEX 2**.

### 2.1.2. Dr. Antony Fauci

Una dichiarazione fondamentale sull'idoneità del test PCR come parametro per il rischio di trasmissione delle malattie infettive è stata fatta dal **Dr. Antony Fauci, principale "esperto di epidemie e consulente del governo" negli Stati Uniti**, durante una trasmissione su MSNBC del 30 dicembre 2021 (The Rachel Maddow Show) (Washington DC 9:04 PM; [YouTube link](#), al minuto 6:35).

#### Domanda del giornalista:

*"...il test PCR non è nemmeno un buon parametro per la trasmissibilità e l'isolamento? Come si può effettivamente determinare se si è contagiosi durante il ciclo di infezione da Covid? Come si misura ciò, se non con un test PCR o un test antigenico?"*

**Dr. Fauci:**

*"Sì, questa è un'ottima domanda, perché **la PCR non misura il virus replicabile, ma le particelle virali, l'acido nucleico. In altre parole, potrei essere infettato, aver eliminato il virus replicabile, ma potrei continuare a risultare positivo al test PCR per diversi giorni dopo la guarigione, senza essere affatto trasmissibile. Quindi una PCR è utile per dire se si è infetti: se io sono infetto, sì, sono infetto, ma il semplice fatto che sia positiva - come ha detto il direttore del CDC - per diversi giorni o persino settimane dopo non fornisce alcuna indicazione se si è trasmissibili o meno.***

*E penso che questa sia la comprensibile confusione che le persone hanno riguardo ai test. I test dicono se si è infetti o meno, ma non se si è infetti e trasmissibili.*

***L'unico modo per determinare se un'infezione è trasmissibile è dimostrare che il virus è vivo e si replica, ma il test non misura questo. Misura la presenza o l'assenza del virus, e il virus può essere morto, inattivo e non trasmissibile.***

**Testo originale in inglese:**

**Question** of **Reporter:**  
"*...is a PCR test not a good parameter either for transmissibility and isolation? How can people actually tell if they are contagious in the cycle of having covid? How do you measure that if not with either a PCR test or an antigen test?*"

**Dr.** **Fauci:**  
"*Yes, that is a very good question **because PCR doesn't measure replication competent virus it measures viral particles, nucleic acid.** So in other words I could be infected, have cleared the replication competent virus from me **but I can continue to be positive with the PCR for several days after recovering and not being transmissible at all.** So a PCR is good to tell you if you are be - if I am infected yes I am infected but the very fact that it is positive - the CDC director said for several days and even weeks later **it doesn't give you any indication of whether or not you are transmissible.***

*And I think that's the understandable confusion that people have about testing. Testing say whether you are infected or not versus are you infected plus transmissible.*

***The only way you can tell if it is transmissible if you can show that there really is life replication virus in you and the test don't measure that.** They measure the presence or absence of the virus and the virus can be dead inactive virus that doesn't transmit.*

### 2.1.3 Prof.ssa Marion Koopmans

Anche **Marion Koopmans**, direttrice del Dipartimento di Scienze Virologiche dell'Università Erasmus e consulente dell'OMS, nonché una delle principali virologhe nella questione del Covid-19 e coautrice della pubblicazione RT-qPCR di Corman/Drosten su Eurosurveillance, ha confermato in un'intervista con NPO Radio 1 (26 novembre 2020, nell'ambito del suo podcast "Virusfeiten" [link al podcast](#)) che la **PCR non è adatta a determinare lo stato di infettività.** (L'intervista inizia al minuto **0:09** su [YouTube link](#)).

#### Passaggio decisivo dell'intervista con Marion Koopmans (MK):

**MK:**

*"...Circolano alcune storie che dicono: 'Beh, il test PCR non è buono.'"*

**Intervistatore:**

*"Almeno, non dimostra necessariamente che si è contagiosi."*

**MK:**

*"Sì, esattamente. Ed è corretto. Perché la PCR mostra che portate con voi l'RNA del virus. Questo è letteralmente ciò che fa la PCR. **E se questo RNA si trova in una particella virale ancora intatta e infettiva o se si tratta solo di frammenti di RNA che possono essere rilevati a lungo dopo un'infezione, non può essere distinto. Si può avere un'idea guardando 'quanto ce n'è?', ma questa differenza non è ben determinabile. Ciò significa che questo test è ottimo per dire 'l'avete avuto', ma è meno adatto per dire 'in questo momento siete ancora contagiosi.'"***

**Intervistatore:**

*"State parlando del test PCR, vero?"*

**MK:**

*"Sì."*

Testo originale:

**MK:**

*"...er ciruleren wat verhalen waarin gezegd wordt, nou ja, de PCR test ist niet goed."*

**Intervistatore:**

*"Althans die toont niet perse aan dat je besmettelijk bent."*

**MK:**

*"Ja precies. En dat klopt ook. Want de PCR toont aan dat jij het virus RNA bij je hebt. Dat is letterlijk wat de PCR doet. En of dat RNA in een virus deeltje zit dat nog intact is en ook besmettelijk is, of dat het gewoon restjes RNA zijn, die je nog een tijd lang nadat iemand geïnfecteerd is geweest, kunt aantonen, dat onderscheid zie je niet. Je kunt een beetje een gevoel krijgen door te kijken 'hoeveel is het?', maar dat verschil is niet goed te maken. Dat betekent, die test is prima om te zeggen 'je hebt het gehad', maar die test is minder geschikt om te zeggen 'op dit moment ben je nog besmettelijk.'"*

**Intervistatore:**

*"Over de PCR test heb je het nu, huh?"*

**MK:**

*"Ja."*

#### 2.1.4 Ministero della Salute Svedese

Il **Ministero della Salute Svedese** dichiara sul suo sito ufficiale: <https://www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/publikationsarkiv/v/vagledning-om-kriterier-for-bedomning-av-smittfrihet-vid-covid-19/> "La tecnologia PCR utilizzata nei test per rilevare i virus non può distinguere tra virus in grado di infettare le cellule e virus neutralizzati dal sistema immunitario, **e pertanto questi test non possono essere utilizzati per determinare se qualcuno sia infettivo o meno.** L'RNA dei virus può spesso essere rilevato per settimane (a volte mesi) dopo l'infezione, ma ciò non significa che una persona sia ancora infettiva."

##### Testo originale:

"PCR-tekniken som används i test för att påvisa virus kan inte skilja på virus med förmåga att infektera celler och virus som oskadliggjorts av immunförsvaret och därför kan man inte använda dessa test för att avgöra om någon är smittsam eller inte. RNA från virus kan ofta påvisas i veckor (ibland månader) efter insjuknandet men innebär inte att man fortfarande är smittsam."

Questa valutazione è stata confermata il **19 aprile 2021**.

#### 2.1.5 National Centre for Infectious Disease di Singapore

Già nel maggio 2020, il **National Centre for Infectious Disease di Singapore** ha pubblicato un position paper in cui, al punto 5, viene sottolineato che:

"È importante notare che il rilevamento di RNA virale tramite PCR non equivale a infettività o alla presenza di virus vitali."

Link al documento originale:

<https://www.ncid.sg/Documents/Period%20of%20Infectivity%20Position%20Statementv2.pdf>

##### Testo originale:

"...it is important to note that viral RNA detection by PCR does not equate to infectiousness or viable virus."

### 2.1.6 Pubblicazione su Nature di Wölfel, Drosten sui casi Webasto

In una pubblicazione su **Nature**, che analizza i primi casi di Covid-19 in Germania ([DOI link](#)), gli autori (tra cui **R. Wölfel, C. Drosten e V. Corman**) hanno identificato i casi positivi al SARS-CoV-2 utilizzando la TIB-Molbiol/Roche-PCR per il rilevamento dei geni E e RdRp, confrontando i risultati della PCR con il gold standard: l'isolamento del virus in coltura cellulare.

In merito alla PCR, gli autori hanno sviluppato un sistema diagnostico basato su RT-PCR per:

“...ottenere prove di una replicazione attiva del virus in assenza di istopatologia. Abbiamo condotto test RT-PCR per identificare RNA subgenomico virale direttamente nei campioni clinici. (...) L'RNA subgenomico virale viene trascritto solo nelle cellule infette, non viene confezionato nei virioni e indica quindi la presenza di cellule infette attivamente nei campioni.”

#### Testo originale:

*“To obtain proof of active virus replication in the absence of histopathology, we conducted RT-PCR tests to identify viral subgenomic RNAs directly in clinical samples. (...) Viral subgenomic mRNA is transcribed only in infected cells and is not packaged into virions, and therefore indicates the presence of actively infected cells in samples.”*

Questo significa che, sin dalle prime analisi, era noto e pubblicato che le **RT-qPCR comuni**, progettate per rilevare l'RNA genomico del SARS-CoV-2, **non potevano determinare la presenza di un virus replicante attivo nel campione**. Da quel momento, le raccomandazioni della WHO avrebbero dovuto spostarsi verso il rilevamento di RNA subgenomico, un metodo più preciso rispetto al rilevamento genomico ma che, comunque, indica solo la probabilità di replicazione virale a livello di RNA, senza fornire una prova definitiva della presenza di un virus infettivo.

### 2.1.7 Articolo su Nature Reviews di Isabella Eckerle (Ginevra)

In una revisione pubblicata il 2 dicembre 2022 su **Nature Reviews Microbiology** ([DOI link](#)), viene chiaramente evidenziato che la RT-PCR non è adatta a rilevare virus infettivi né a diagnosticare con certezza persone infette (contagiose). È significativo che questa pubblicazione sia stata coautorizzata da **Isabella Eckerle**, una stretta collaboratrice di Christian Drosten.

#### Citazioni principali:

1. **Introduzione, primo paragrafo:**

*“Il rilevamento dell'RNA virale nei campioni respiratori tramite RT-PCR è altamente sensibile e specifico, ma non distingue tra virus replicabili e RNA residuo. **Questo***

***perché l'RNA virale (rilevato dalla RT-PCR) rimane rilevabile in assenza di virus infettivi, mentre la positività dei test Ag-RDTs è meglio correlata alla presenza di virus infettivi.***

**Originale:**

*“Although detection of viral RNA in respiratory specimens by RT-PCR is highly sensitive and specific, it does not distinguish between replication-competent virus and residual RNA. This is because viral RNA (which would be picked up by RT-PCR) remains detectable in the absence of infectious virus, whereas positivity of Ag-RDTs better correlates with the presence of infectious virus.”*

2. **Sotto il titolo “Detection of RNA viral load”:**

***“Sebbene la RT-PCR non possa determinare direttamente l'infettività, data la sua incapacità di distinguere tra virus replicabili (infettivi) e RNA residuo (non infettivo), si è cercata una correlazione tra la carica virale di RNA e la presenza di virus infettivi.”***

**Originale:**

*“Although RT-PCR cannot directly determine infectiousness owing to its inability to differentiate between replication-competent (infectious) virus and residual (non-infectious) viral RNA, a correlation between RNA viral load and the presence of infectious virus has been sought.”*

3. **Sotto il titolo “SARS-CoV-2 diagnostic in public health”:**

***“Sfortunatamente, non esiste attualmente alcun test diagnostico Point-of-Care per determinare l'infettività del SARS-CoV-2 in un campione di paziente, e la coltura virale descritta sopra non è adatta a scopi diagnostici. Pertanto, è stata proposta una serie di approcci per trovare un valore approssimativo dell'infettività per guidare i periodi di isolamento.”***

**Originale:**

*“Unfortunately, no point-of-care diagnostic test currently exists to determine infectious SARS-CoV-2 in a patient sample, and virus culture as described above is not suited for diagnostic purposes. Thus, a range of approaches have been suggested to find a proxy for infectiousness to guide isolation periods.”*

**Nota:**

**Questa affermazione proviene dal dicembre 2022, quasi tre anni dopo l'introduzione della RT-qPCR come test diretto (Point of Care) per persone presumibilmente infette nei centri di test, come base per calcolare incidenze, valori R e misure conseguenti! Tale affermazione viene ulteriormente sottolineata nelle conclusioni dello studio:**

4. **Nella sezione “Conclusions”:**

***“Sebbene durante la pandemia siano stati fatti molti progressi nel campo della diagnostica, ad oggi non esistono test diagnostici che determinino in modo affidabile la presenza di virus infettivi.”***

**Originale:**

*“Although much progress has been made during the pandemic in the field of diagnostics, to date, no diagnostic tests exist that reliably determine the presence of infectious virus.”*

### 2.1.8 Zentrum für Evidenzbasierte Medizin

Sotto il titolo „PCR-Positivi: Cosa significa?“ (originale: “PCR positives: what do they mean?“), in un articolo pubblicato il 17 settembre 2020 sul sito del [Centre for Evidence-Based Medicine \(link originale\)](#), viene discussa l'interpretazione dei risultati della RT-PCR per il rilevamento di SARS-CoV-2.

Facendo riferimento a una revisione condotta da Jefferson T – inizialmente un preprint e successivamente pubblicata nel dicembre 2021 sulla rivista “Clinical Infectious Diseases” ([Viral Cultures for Coronavirus Disease 2019 Infectivity Assessment: A Systematic Review - PubMed](#)) – viene tratto il seguente punto chiave:

*“Il rilevamento tramite PCR di virus è utile, purché la sua accuratezza sia comprensibile: offre la capacità di rilevare RNA in quantità minime, **ma potrebbe non essere chiaro se questo RNA rappresenti un virus infettivo.**”*

Testo originale:

*“PCR detection of viruses is helpful so long as its accuracy can be understood: it offers the capacity to detect RNA in minute quantities, **but whether that RNA represents infectious virus may not be clear.**”*

Conclusione esplicita del riassunto della pubblicazione:

*“Per la trasmissione sono necessari virus vivi completi, non i frammenti identificati tramite PCR. I test di routine prospettici su campioni di riferimento e di coltura e la loro relazione con sintomi, segni e cofattori dei pazienti dovrebbero essere utilizzati per determinare l'affidabilità della PCR nella valutazione del potenziale infettivo. È improbabile che i campioni con un Ct alto abbiano un potenziale infettivo.”*

Testo originale:

*“Conclusions: **Complete live viruses are necessary for transmission, not the fragments identified by PCR.** Prospective routine testing of reference and culture specimens and their relationship to symptoms, signs, and patient co-factors should be used to define the reliability of PCR for assessing infectious potential. Those with high Ct are unlikely to have infectious potential.”*

### 2.1.9 Informazioni dalla Cleveland Clinic

Per quanto riguarda la domanda sul motivo per cui un test PCR possa risultare positivo anche se le persone interessate non sono né sintomatiche né contagiose, una [pagina informativa della Cleveland Clinic](#) ([PCR Test for COVID-19: What It Is, How It's Done, What The Results Mean](#)) afferma:

**"Questo significa che il test può continuare a rilevare frammenti del virus SARS-CoV-2 anche dopo che vi siete ripresi dal COVID-19 e non siete più contagiosi. Potreste quindi continuare a risultare positivi se in passato avete contratto il COVID-19, anche se non siete più in grado di trasmettere il virus SARS-CoV-2 ad altri."**

**Testo originale:**

*"This means that the test can continue to detect fragments of SARS-CoV-2 virus even after you've recovered from COVID-19 and are no longer contagious. So you may continue to test positive if you've had COVID-19 in the distant past, even though you can't spread the SARS-CoV-2 virus to others."*

### 2.1.10 Informazioni ufficiali del Governo Canadese

Anche il [Governo Canadese](#), noto per le sue misure particolarmente severe contro il COVID-19, aveva già confermato, con ultima modifica al 10 giugno 2021, nel capitolo „Valori CT e Infettività“ (*originale: „Ct values und infectiousness“*), che una persona viene considerata infettiva:

**„...se espelle particelle virali che sono integre e in grado di infettare altri. I test PCR non possono distinguere tra materiale genomico virale proveniente da particelle virali integre in persone infettive e frammenti di particelle virali presenti in individui che si sono ripresi.“**

**Testo originale:**

*"A person is deemed infectious if they shed virus particles that are intact and able to go on to infect others. PCR tests cannot distinguish viral genomic material coming from intact viral particles in persons who are infectious or viral particle fragments that are present in individuals who have recovered."*

### 2.1.11 Linea guida del CDC sull'Influenza

**Quanto affermato per la diagnosi PCR di SARS-CoV-2 era già valido in precedenza per l'influenza, secondo le linee guida del CDC.** L'aspetto qui menzionato per SARS-CoV-2, e supportato da numerosi riferimenti, che un risultato positivo di un test PCR non equivale a un'infezione attiva né fornisce alcuna indicazione sul fatto che una persona sia infettiva (contagiosa), è stato esplicitamente sottolineato dal CDC nel contesto della diagnostica influenzale sul proprio sito web ([Information on Rapid Molecular Assays, RT-PCR, and other Molecular Assays for Diagnosis of Influenza Virus Infection | CDC](#)). Con ultima modifica al 21 ottobre 2019, la conclusione sotto la sezione „Interpretazione dei risultati dei test“ (interpretation of testing results) è la seguente:

**„Un risultato positivo indica che nell'esemplare respiratorio analizzato sono state rilevate RNA o acidi nucleici del virus influenzale, confermando un'infezione da virus influenzale, ma ciò non significa necessariamente che sia presente un virus infettivo o che il paziente sia contagioso.“**

**Testo originale:**

*“A positive result indicates detection of influenza viral RNA or nucleic acids in the respiratory specimen tested, confirming influenza virus infection, but does not necessarily mean infectious virus is present or that the patient is contagious.”*

Già nell'introduzione (Background) si legge:

**„Il rilevamento di RNA o acidi nucleici del virus influenzale attraverso test molecolari non indica necessariamente il rilevamento di un virus vitale o di una replicazione in corso del virus influenzale.“**

**Testo originale:**

*“Notably, the detection of influenza viral RNA or nucleic acids by molecular assays does not necessarily indicate detection of viable virus or on-going influenza viral replication.”*

### 2.1.12 Ministero della Salute Australiano e valutazione dei "Fact-checker"

Il senatore **Gerd Rennik** ha chiesto l'11 novembre 2021 all'**autorità australiana per i farmaci TGA (Therapeutic Goods Administration)** se il test PCR fosse in grado di «distinguere tra un virus vivo e uno morto». L'autorità ha risposto il 31 gennaio 2022, come riportato nell'Annex 6:

**„I test PCR sono altamente sensibili e rilevano il materiale genetico del virus SARS-CoV-2, ma non possono distinguere tra il virus vivo e quello morto. (...)**

***Talvolta, quando il virus non è più vivo e non si replica più, frammenti genetici virali possono essere rilevati tramite PCR, dando risultati debolmente positivi.***

**Testo originale:**

*“While PCR tests are highly sensitive and detect the genetic material of the SARS-CoV-2 virus, they cannot differentiate between live and dead virus. (...) Sometimes, when the virus is no longer alive and replicating, viral genetic fragments can be detected by PCR and produce weak positive results.”*

Nel „**Fact-check della DPA**“ del 20 maggio 2022 ([Australische Behörde betont Wert von PCR-Tests](#)), viene sottolineato sin dall'introduzione che:

***„È indiscutibile che i test PCR utilizzati per determinare le infezioni da coronavirus non siano infallibili al 100%.“***

**Testo originale:**

*„Dass die PCR-Tests zur Feststellung von Corona-Infektionen nicht hundertprozentig fehlerfrei sind, ist unbestritten.“*

**Più avanti, viene ribadito:**

***„È noto che i test PCR possano produrre sia risultati falsi negativi che falsi positivi fin da quando esistono.“***

**Testo originale:**

*„Die Tatsache, dass es bei PCR-Tests sowohl zu falsch-negativen als auch zu falsch-positiven Testergebnissen kommen kann, ist bekannt, seit es solche Tests gibt.“*

Anche i "**Fact-checker di Correctiv**", in un articolo del 14 giugno 2022 ([Australische Arzneimittelbehörde erklärte PCR-Tests nicht für sinnlos](#)), riportano:

***„Il Ministero della Salute australiano ha dichiarato che i test PCR rilevano la presenza di materiale genetico del coronavirus, anche se il virus non può più replicarsi. Questo è noto da tempo e non implica che i test siano privi di valore.“***

**Testo originale:**

*„Das australische Gesundheitsministerium hat erklärt, dass PCR-Tests das Vorhandensein von Erbmateriale des Coronavirus nachweisen, auch wenn das Virus*

*sich nicht mehr vermehren kann. Das ist lange bekannt und bedeutet nicht, dass die Tests keine Aussagekraft haben.“*

Nel testo viene citato **Friedemann Weber**, direttore dell'Istituto di Virologia della Justus-Liebig-Universität di Gießen, che ha dichiarato a Correctiv:

**„I PCR non possono effettivamente distinguere se un materiale genetico proviene da un virus in fase di replicazione oppure no. Tuttavia, quel materiale genetico deve essere stato prodotto in qualche modo, e ciò può derivare solo da un'infezione.“**

**Testo originale:**

*„PCR kann tatsächlich nicht erkennen, ob ein Genmaterial von einem sich vermehrenden Virus stammt oder nicht. Allerdings muss das Genmaterial ja irgendwie mal produziert worden sein. Und das kann eigentlich nur von einer Infektion stammen.“*

Weber aggiunge che, **nella fase finale di un'infezione, il segnale PCR può effettivamente derivare da particelle inattivate dal sistema immunitario.**

*„Ma anche in quel caso, è necessario che vi sia stata un'infezione in precedenza.“*

**Infine, nel "Fact-check" viene evidenziato che:**

**„Un test PCR positivo indica un'infezione con una probabilità del 98%.“**

Tuttavia, questa probabilità del 98% si applica solo a un gruppo con un'alta incidenza di malattia, in base alla cosiddetta „probabilità pre-test“ o prevalenza (vedi anche il capitolo 3.4). Questo concetto è stato chiaramente illustrato nel 2022 da Christel Weiß, biostatistica di Mannheim, in un articolo pubblicato in Notfall Rettungsmed ([SpringerLink](#)).

Dettagli statistici:

- Con una sensibilità del 99% e una specificità del 99,5% per un test PCR, in una popolazione con alta prevalenza (20%), come in un gruppo ad alto rischio in una casa di cura, su 10.000 test ci si aspetta che 2020 risultino positivi, di cui 40 falsi positivi.
- Con una bassa prevalenza (1%), come nei test di massa su una popolazione sana (es. adolescenti), **un terzo dei risultati positivi sarà falso**. Nella tabella dell'articolo, su 10.000 adolescenti testati, si calcola che, tra 100 infetti reali, ci siano 99 positivi autentici e 49,5 falsi positivi.

Nella sintesi si ribadisce:

**„Una positività rilevata da un test PCR non significa necessariamente che la persona sia contagiosa o malata.“**

### 2.1.13. Sito del RKI sulla valutazione della PCR come non infettiva

Sul sito del **RKI (Robert Koch Institut)** dedicato al tema „Hinweise auf Testungen von Patientinnen und Patienten auf SARS-CoV-2“ ([linee guida sui test per pazienti con SARS-CoV-2, consultato il 02.08.2023](#)), nella sezione intitolata „Positive PCR-Ergebnisse bei Genesenen“ si legge:

**„A differenza dei virus replicabili, l'RNA virale di SARS-CoV-2 può essere rilevata tramite RT-PCR in molti pazienti convalescenti anche settimane dopo l'insorgenza dei sintomi (Xiao et al., 2020; Zheng et al., 2020; Zhou et al., 2020). È stato dimostrato già all'inizio della pandemia che questi risultati positivi della RT-PCR nei pazienti convalescenti non sono necessariamente associati alla contagiosità,** sia attraverso la conduzione parallela di test PCR e colture virali (Bullard et al., 2020; Covid-Investigation Team, 2020; Singanayagam et al., 2020; Wolfel et al., 2020) sia attraverso uno studio su larga scala del CDC coreano, che ha esaminato i contatti di pazienti convalescenti con un risultato positivo della PCR ripetuto (Korea Centers for Disease Control, 2020).“

**Testo originale:**

*„Im Unterschied zu replikationsfähigem Virus ist SARS-CoV-2 virale RNA bei vielen konvaleszenten Patienten noch Wochen nach Symptombeginn in der RT-PCR nachweisbar (Xiao et al., 2020; Zheng et al., 2020; Zhou et al., 2020). Dass diese positiven RT-PCR-Ergebnisse bei konvaleszenten Patienten nicht zwingend mit Kontagiosität gleichzusetzen sind, wurde bereits zu Beginn der Pandemie demonstriert, zum einen durch die parallele Durchführung von PCR und Virusanzucht (Bullard et al., 2020; Covid-Investigation Team, 2020; Singanayagam et al., 2020; Wolfel et al., 2020) und zum anderen durch eine großangelegte Studie des koreanischen CDC, die unter anderem Kontaktpersonen von genesenen Patienten mit erneut positiver PCR untersuchte (Korea Centers for Disease Control, 2020).“*

**Questa dichiarazione conferma che, secondo il RKI, era noto già nelle fasi iniziali della pandemia che un risultato positivo della PCR non equivale necessariamente a contagiosità (Kontagiosität). Questo fatto contraddice chiaramente l'uso improprio dei risultati positivi della PCR per giustificare misure di isolamento.**

## La preparazione dei campioni esclude il rilevamento di virus replicabili

Un altro aspetto importante nella valutazione della domanda se un test RT-qPCR possa fornire informazioni sull'infettività di una persona risultata positiva, ossia fino a che punto il risultato positivo dell'RT-qPCR possa indicare la presenza di virus replicabili, riguarda la preparazione del campione per l'RT-qPCR.

Dal materiale prelevato tramite tampone deve essere isolato l'RNA del gene ricercato (in questo caso il genoma del virus SARS-CoV-2) per poterlo utilizzare nel rilevamento genetico tramite RT-qPCR. Un passaggio cruciale in questo processo è la denaturazione completa di tutto il materiale biologico e la separazione delle componenti principali: proteine, lipidi e acidi nucleici, per ottenere infine solo l'RNA come base di partenza per l'RT-qPCR. Il protocollo originale sviluppato da Chomczynski e Sacchi nel 1987 ([PubMed 1](#); [PubMed 2](#)) è tuttora parte integrante di quasi tutti i protocolli per la purificazione del materiale biologico al fine di isolare l'RNA, sia che venga eseguito in laboratorio sia che si utilizzino kit di estrazione acquistati. Le componenti della soluzione di estrazione originale includono fenolo/cloroformio e alcool isoamilico, oppure, in alcune soluzioni commerciali modificate, sostanze simili ma meno tossiche. Tutte queste soluzioni hanno in comune la capacità di distruggere completamente qualsiasi struttura biologica vivente o replicabile.

Questo implica che: **nel processo di laboratorio di preparazione di un campione prelevato con tampone, che precede necessariamente l'RT-qPCR, ogni materiale biologico – che si tratti di una cellula vitale, un virus replicabile o anche solo frammenti cellulari e residui genetici – viene denaturato a tal punto che non è più possibile determinare se il materiale provenga da un organismo integro e replicabile o da campioni già danneggiati o distrutti.** A causa di questo processo di estrazione e preparazione, non è in alcun modo possibile concludere, sulla base di un risultato positivo dell'RT-qPCR, che frammenti genomici rilevati indichino la presenza di virus replicabili nel campione prelevato con tampone. Si può rilevare solo l'RNA isolato, indipendentemente dalla sua origine.

### 2.3. Conclusione intermedia:

Anche qualora la PCR, inclusi tutti i passaggi preparatori (progettazione e stabilizzazione della PCR, prelievo del campione, preparazione e esecuzione della PCR), venga eseguita in maniera impeccabile e il test risulti positivo, ossia riconosca una sequenza genomica eventualmente presente in un virus "Corona" (SARS-CoV-2), questa tecnica **non può in alcun caso dimostrare che la persona risultata positiva sia infetta da un SARS-CoV-2 replicante e di conseguenza contagiosa = pericolosa per altri individui.**

Una maggiore plausibilità di un risultato positivo della PCR riguardante un'infezione virale, in particolare un virus replicante nei tessuti, sarebbe stata fornita dal rilevamento dell'RNA subgenomico, descritto nella pubblicazione citata al punto 2.1.F. **Poiché questo sgRNA si manifesta solo durante la formazione di nuovi virus in una cellula infetta, potrebbe essere considerato come indicatore (e non come prova) di un'infezione virale attiva.** Questo aspetto è ben descritto nella pubblicazione menzionata al punto 2.1.G, sotto la sezione "SARS-CoV-2 diagnostics in public health":

"Un esempio è il rilevamento di trascritti sgRNA, che vengono generati durante la replicazione virale, in particolare durante la sintesi dell'RNA a filamento negativo. Sebbene le sgRNA vengano trascritte nelle cellule infette, non sono incorporate nei virioni e possono quindi servire come **indicatore di una replicazione attiva e dunque di virus infettivi.** Sono stati sviluppati specifici test RT-PCR per rilevare le sgRNA in aggiunta al rilevamento diagnostico dell'RNA genomico del SARS-CoV-2, **ma tali test non sono stati introdotti nell'uso diagnostico di routine a causa della loro sensibilità inferiore rispetto ai test RT-PCR convenzionali.**

[...]

Pertanto, se l'assenza di sgRNA indica una mancanza di replicazione virale, **la presenza di sgRNA non indica necessariamente infettività."**

**Testo originale:**

*"One example is the detection of sgRNA transcripts, which are generated during virus replication, and specifically the synthesis of negative-strand RNA. Although sgRNAs are transcribed in infected cells, they are not packaged in the virions and can therefore serve as an indicator of active replication and thus of infectious virus. Specific RT-PCR assays were developed to detect sgRNAs in addition to the diagnostic detection of genomic SARS-CoV-2 RNA, but such assays have not made their way into routine diagnostic use owing to their lower sensitivity than conventional RT-PCR assays.*

[...]

*Thus, although the absence of sgRNA would indicate absence of viral replication, the presence of sgRNA does not necessarily indicate infectiousness."*

**In generale, per determinare un'infezione attiva e valutare se una persona "produca" e rilasci virus contagiosi, è necessario impiegare metodi diagnostici concreti, oltre alla valutazione dei sintomi clinici, come l'isolamento di virus replicabili (Gold Standard).** Su questo argomento, sotto la sezione "Detection of infectious Virus" nella pubblicazione citata al punto 2.1.G, si trova la seguente affermazione:

**"Il gold standard per determinare la presenza di virus infettivi (cioè replicanti) nei campioni respiratori è il recupero del virus in colture cellulari, una procedura comunemente definita isolamento virale."**

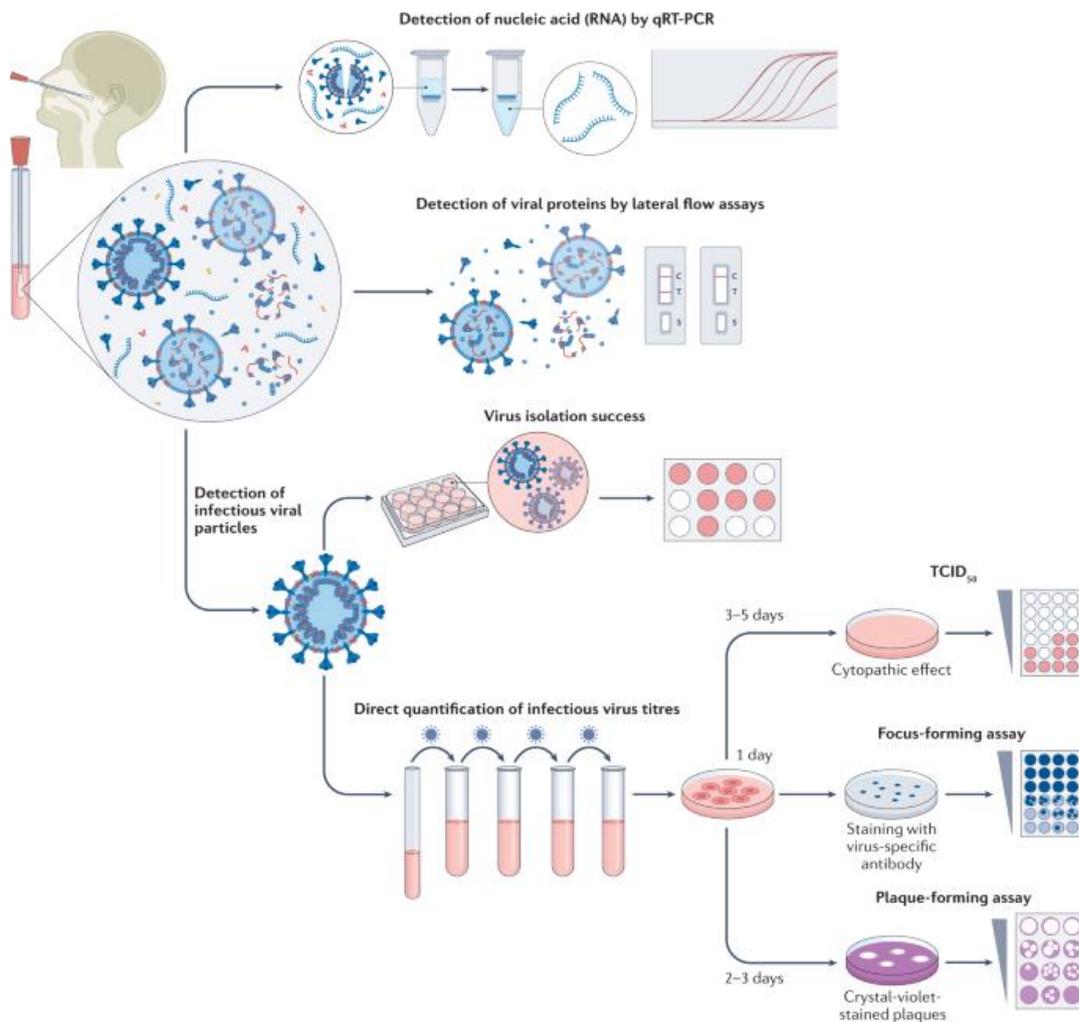
**Testo originale:**

*"The gold standard for determining the presence of infectious (that is, replication competent) virus in respiratory specimens is the recovery of virus in cell culture, a procedure that is commonly termed virus isolation."*

## 2.1. Illustrazione

A scopo di migliorare la comprensione, riportiamo qui di seguito l'**Illustrazione 1** tratta dal lavoro scientifico disponibile al link (<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>). Questa figura rappresenta visivamente le diverse metodologie di rilevamento:

- Il rilevamento dell'acido nucleico virale (RNA) tramite RT-qPCR (denominata qRT-PCR nella figura).
- Il rilevamento dei componenti proteici virali tramite test rapido dell'antigene (lateral-flow assay).
- Il rilevamento di virus infettivi tramite varie metodologie di isolamento in colture cellulari.



### Legenda dell'illustrazione:

Per il rilevamento della carica virale di **SARS-CoV-2**, vengono utilizzati campioni prelevati tramite tampone dal rinofaringe o dall'orofaringe. I metodi illustrati includono: **Rilevamento di acidi nucleici virali (RNA) mediante PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR):** L'RNA virale viene estratto da virus lisati, trascritto in DNA complementare (cDNA) e amplificato mediante qPCR utilizzando primer specifici per una o più regioni bersaglio nel genoma virale. Il ciclo di amplificazione in cui il segnale della sonda supera la soglia definita (soglia del ciclo, o cycle threshold - Ct) indica la quantità di RNA virale presente. La carica virale può essere espressa come numero di copie di RNA virale per millilitro o in termini del valore Ct specifico per il test. **Lateral Flow Assays (test rapido dell'antigene):** Rilevano la presenza di proteine virali specifiche nei particelle virali lisate. Nei test diagnostici rapidi per l'antigene, si utilizza comunemente la proteina nucleocapsidica di SARS-CoV-2. **Rilevamento di virus infettivi (replicanti) tramite colture cellulari: Isolamento virale:** Il medium contenente il virus infettivo viene applicato su una monostrato di cellule. Il successo dell'isolamento è determinato dall'insorgenza di un effetto citopatico (CPE) circa 3-5 giorni dopo l'infezione. Le aree bianche indicano la presenza di effetti citopatici nelle cellule. **Quantificazione del titolo virale infettivo:** Si utilizzano diluizioni seriali dei campioni respiratori per inoculare cellule monostrato. Con il metodo **TCID<sub>50</sub>** (dosi infettive al 50% in coltura cellulare), l'effetto citopatico indotto dal virus viene determinato al microscopio 3-5 giorni dopo l'infezione. **Focus-forming assays:** Le cellule infettate vengono fissate un giorno dopo l'infezione e sottoposte a immunocolorazione con anticorpi specifici per il virus per rilevare i gruppi di cellule infette (foci). I foci che indicano la presenza di virus infettivi sono rappresentati in **blu**. **Saggi di formazione di placche:** I piatti vengono fissati 2-3 giorni dopo l'infezione e colorati con cristallo violetto; le depressioni contenenti singole placche vengono utilizzate per determinare il titolo virale. Le placche che indicano la presenza di virus infettivi sono rappresentate in **bianco**.

### 3. Fattori che influenzano l'affidabilità del test PCR

In realtà, i risultati di un test PCR dipendono da una serie di parametri che, da un lato, possono introdurre notevoli incertezze e, dall'altro, possono essere influenzati in modo tale da generare un numero elevato o ridotto di risultati (apparentemente) positivi.

### 3.1. Progettazione della PCR e specificità

Una PCR può essere progettata in modo molto efficace utilizzando banche dati (ad esempio, GenBank, GISAID) e software consolidati (i cosiddetti programmi di ricerca dei primer). In questo processo, l'obiettivo del test (cosa deve essere rilevato e con quale precisione) determina i requisiti della regione target utilizzata e la corrispondenza dei primer.

Se l'obiettivo è effettuare una ricerca generale di rappresentanti di un ampio gruppo di virus simili (ad esempio, tutti i coronavirus), i primer vengono posizionati in quelle che vengono chiamate regioni conservate e specifiche del gruppo. Questo è paragonabile a dire a un software: "Riconosci in modo affidabile tutte le auto rosse in un parcheggio (ma non camion, motociclette o veicoli di altri colori)." Con questa impostazione, è possibile verificare se in un campione siano presenti tracce genetiche di un rappresentante del gruppo di virus ricercato (ad esempio, coronavirus).

Se si desidera rilevare solo un sottogruppo (ad esempio, i Sarbecovirus all'interno dei coronavirus), analogamente a un marchio specifico all'interno della categoria delle auto rosse, i primer possono essere progettati per essere specifici del sottogruppo. Questo approccio è stato utilizzato, ad esempio, per il gene "E" e il gene RdRp nella PCR raccomandata dall'OMS, progettata dalla Charité (Corman/Drosten), per identificare il gruppo dei Sarbecovirus, al quale appartiene il SARS-CoV-2.

Tuttavia, è anche possibile (non sempre, ma spesso) progettare una PCR altamente specifica in grado di rilevare e amplificare esclusivamente il gene ricercato (ad esempio, il gene virale di SARS-CoV-2). Analogamente, sarebbe come riconoscere un modello specifico all'interno del gruppo delle auto rosse di un determinato marchio. Per fare ciò, il design deve assicurare che la regione utilizzata non abbia omologie con virus strettamente correlati (ad esempio, SARS1 o virus dei pipistrelli correlati a SARS-CoV-2) o con altre firme genetiche già note (genoma umano o altri organismi).

I programmi di ricerca possono rendere questo processo molto affidabile. Nella qPCR si aggiunge un terzo frammento genetico, che deve reagire specificamente solo con la regione genica ricercata: la "sonda".

Di conseguenza, un buon design PCR prevede due elementi altamente specifici per una PCR standard e tre per una qPCR (primer/sonde), progettati per riconoscere esclusivamente le sequenze target desiderate, consentendo così il rilevamento estremamente specifico del gene bersaglio.

**Anche per SARS-CoV-2 sarebbe stato possibile progettare una PCR così specifica, ma ciò non è stato fatto nei protocolli iniziali e fondamentali dell'OMS.**

Dopo il design, è essenziale testare in laboratorio la coppia di primer e la sonda su campioni reali. A tal fine, sono necessari campioni sicuri contenenti il materiale genetico da identificare (ad esempio, campioni di persone sicuramente infettate da SARS-CoV-2 o, idealmente, un isolato virale completamente caratterizzato). Inoltre, è necessario disporre di un ampio spettro di virus e di altri agenti patogeni che possono causare sintomi simili nei pazienti, ma che non devono generare alcun segnale con la PCR utilizzata.

Quando tutte queste condizioni sono soddisfatte, e la PCR rileva esattamente il gene target desiderato dal progettista – sia esso un'intera famiglia di virus o un singolo patogeno specifico – e questo risultato è dimostrato senza ambiguità attraverso test sperimentali completi con controlli positivi e negativi, il design può essere considerato affidabile e specifico, idoneo a supportare una diagnosi clinica.

### 3.2. Numero dei geni target indipendenti

Nel protocollo pubblicato inizialmente dall'OMS il 13 gennaio 2020, intitolato "*Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time PCR*" ([link al documento](#)), viene descritta una sequenza di rilevamento tramite PCR di tre geni indipendenti del virus successivamente rinominato SARS-CoV-2. La sequenza faceva riferimento al gene E, al gene RdRp e successivamente al gene N. Tuttavia, già il 17 gennaio 2020 l'OMS modificò il protocollo con una nuova versione intitolata "*Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time PCR*" ([link al documento](#)), eliminando il gene N come target. Di conseguenza, invece delle tre regioni target originali, ne furono raccomandate solo due.

Il 2 marzo 2020, in un'ulteriore versione aggiornata del protocollo di test dell'OMS, intitolata "*Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases*" ([link al documento](#)), viene indicato quanto segue:

*"...In aree in cui il virus COVID-19 è ampiamente diffuso, potrebbe essere adottato un algoritmo più semplice, in cui, ad esempio, lo screening tramite RT-PCR di un singolo target discriminatorio è considerato sufficiente..."*  
(traduzione dall'inglese, pagina 3, in basso).

Di conseguenza, molti laboratori adottarono un approccio semplificato analizzando un solo gene target, spesso focalizzandosi esclusivamente sul gene E, come descritto esplicitamente dal laboratorio di Augusta il 3 aprile 2020 ([link all'archivio web](#)).

**L'importanza fondamentale del numero di geni target indipendenti analizzati nei test PCR, specialmente nei test singoli non specifici come quelli raccomandati dall'OMS tramite il**

**protocollo della Charité (successivamente adottato rapidamente e su larga scala da TIB MolBiol/Roche a livello globale), può essere illustrata da un esempio di calcolo pratico.**

Secondo il protocollo iniziale dell'OMS per il rilevamento del SARS-CoV-2, erano previste tre regioni target: il gene **E**, il gene **RdRp** e il gene **N**. Questi geni sono stati rapidamente implementati in diversi sistemi di test, sia di laboratorio che commerciali.

Un primo *ring test* condotto dall'Istituto Instant e.V. ([link al rapporto](#)) ha determinato la specificità media dei test per queste regioni target:

| Gene target del SARS-CoV-2 | Numero di kit testati | Specificità con sola coltura cellulare | Specificità con Coronavirus correlati (HCoV 229E) | %     | Specificità media assoluta | Tasso di errore medio (1-specificità) |
|----------------------------|-----------------------|--|---|-------|----------------------------|---------------------------------------|
| E                          | 24                    | 99,46%                                 | 95,17%  | 97,31 | 0,9731                     | 0,0269                                |
| RdRp                       | 13                    | 97,80%                                 | 90,66 %   | 94,23 | 0,9423                     | 0,0577                                |
| N                          | 21                    | 98,20%                                 | 87,95 %   | 93,08 | 0,9308                     | 0,0692                                |

In una popolazione mista di 100.000 test, anche senza alcuna persona effettivamente infetta, il tasso medio di errore porterebbe ai seguenti risultati:

- **Con un test che rileva solo il gene E:**  
 $100.000 \times 0,0269 = 2.690$  falsi positivi
- **Con test sequenziali che rilevano i geni E e RdRp:**  
 $100.000 \times (0,0269 \times 0,0577) = 155$  falsi positivi
- **Con test che rilevano tutti e tre i geni (E, RdRp e N):**  
 $100.000 \times (0,0269 \times 0,0577 \times 0,0692) = 10$  falsi positivi

Ciò significa che la direttiva dell'OMS del marzo 2020, prima della dichiarazione ufficiale della pandemia, di ridurre progressivamente il numero di geni target analizzati nei test da tre a uno (mantenendo al contempo i parametri originali della PCR del "protocollo Corman/Drosten" per SARS-CoV-2), ha portato a un aumento significativo dei falsi positivi. Nello specifico,

l'esempio sopra mostra un aumento da 10 falsi positivi (con tre target) a quasi 2.700 (con solo il gene E) per ogni 100.000 test effettuati.

Se i 100.000 test effettuati fossero rappresentativi di 100.000 cittadini di una città o distretto nell'arco di 7 giorni, l'impatto sulla "incidenza a 7 giorni" derivante dal numero di geni target analizzati si tradurrebbe in una differenza significativa:

- **10 casi** (con 3 "Target")
- **155 casi** (con 2 "Target")
- **2690 casi** (con 1 "Target").

Questa differenza influenzerebbe direttamente la gravità delle restrizioni alla libertà imposte ai cittadini.

**Valutazione intermedia:** L'esempio di calcolo dimostra come la manipolazione dei parametri relativi ai geni target da rilevare nei laboratori possa influenzare il numero giornaliero di casi positivi. Considerando le enormi conseguenze delle decisioni politiche basate sui numeri assoluti di test positivi e sulla "incidenza a 7 giorni" derivata, l'indicazione dell'OMS (e anche del RKI) di ridurre il numero di geni target è chiaramente risultata idonea ad amplificare artificialmente la "pandemia" tramite direttive di test errate, con un fattore di aumento fino a 300.

Questo approccio è privo di basi scientifiche, causando da un lato enormi restrizioni personali attraverso quarantene o isolamenti imposti a individui erroneamente "testati positivi" e, dall'altro, accettando deliberatamente le gravi limitazioni e i danni sociali ed economici derivanti dalla "incidenza a 7 giorni". Inoltre, questa metodologia ha gettato le basi per giustificare la "necessità di vaccinazione".

Se fosse stata applicata in modo coerente la corretta analisi basata su tre geni, o addirittura fino a sei (come inizialmente adottato in Thailandia), il tasso di test positivi e, di conseguenza, l'"incidenza a 7 giorni" si sarebbe ridotto quasi a zero.

### 3.3. Numero di cicli effettuati (valore Ct) nella qPCR

**“Le persone infettive hanno in genere una carica virale RNA superiore a  $10^6$  copie genomiche per millilitro, che corrisponde in gran parte a un valore Ct di 25 nella maggior parte dei test RT-PCR.”**

Questa definizione di un valore Ct significativo è esplicitamente riportata nella già citata revisione pubblicata il 2 dicembre 2022 su *Nature Reviews Microbiology*, nel capitolo **“SARS-CoV-2 Diagnostics in public health”**, e riassume in modo efficace gli aspetti discussi di seguito.

**Nel testo originale:** "*Infectious individuals typically have RNA viral loads of  $>10^6$  genome copies per millilitre, which corresponds largely with a Ct of 25 in most RT-PCR assays.*"

### 3.3.1 Importanza del valore Ct

Oltre al numero di geni target rilevati, soprattutto quando viene analizzato solo uno o al massimo due, il numero di cicli di amplificazione nella qPCR necessari per dichiarare un test "positivo" e il conseguente valore Ct rappresentano un parametro cruciale. Più basso è il valore Ct di un campione nella qPCR, maggiore è la quantità iniziale di DNA presente nel campione.

**Questo parametro si correla, in condizioni standardizzate, con la quantità iniziale di genomi virali presenti nel campione**, ossia la cosiddetta *carica virale*. Questa carica virale, idealmente espressa come "numero di copie virali per millilitro di campione", è correlata nel caso di SARS-CoV-2 alla capacità di isolamento di virus infettivi in coltura cellulare, come già pubblicato nel marzo 2020 (*Figura 1e in Wölfel et al.*, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>).

È stata necessaria una quantità minima di  **$10^6$  copie di RNA/ml** per isolare virus dalle colture cellulari. In un successivo studio condotto con la partecipazione di C. Drosten, pubblicato nel maggio 2021, si è osservato che erano necessarie in media  **$10^8$  copie virali** per ottenere un risultato positivo in coltura cellulare (*Supplemental Figure S4*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34035154/>).

In quest'ultimo studio, si è inoltre rilevato che nessuna delle 25.381 persone testate presentava una carica virale inferiore a  **$10^5$  copie genomiche/ml** nel campione (*Tabella S1*). Al contrario, la RT-qPCR basata sul protocollo originale (*Corman V et al.*, <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>) può restituire un risultato positivo già con circa **4 copie per reazione** (5  $\mu$ l, corrispondenti a circa  **$10^3$  copie/ml**), mostrando una sensibilità di rilevamento fino a 1.000-10.000 volte superiore rispetto a quella necessaria per individuare una carica virale realmente infettiva.

Anche i **sistemi PCR commerciali, detti "kit"**, di cui al maggio 2022 esistevano già circa 630 versioni diverse a livello globale (<https://www.finddx.org/covid-19/test-directory>), spesso presentano limiti di rilevamento inferiori a 10 copie per reazione. Ad esempio, i kit della società TIB-MolBiol ([https://www.roche-as.es/lm\\_pdf/MDx\\_53-0777\\_96\\_Wuhan-R-gene\\_V200204\\_09155376001%20%282%29.pdf](https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_53-0777_96_Wuhan-R-gene_V200204_09155376001%20%282%29.pdf), sezione 5 "Specification"). Un esempio che evidenzia la differenza tra la sensibilità del rilevamento e un limite di rilevamento significativo è illustrato in **ANNEX 3**.

***Dal punto di vista tecnico, si deve distinguere tra una "contaminazione" del tratto respiratorio superiore con una piccola quantità di virus incapaci di causare un'infezione e***

**una vera "infezione", che implica la presenza di virus replicabili in grado di causare:**

- a) una malattia sintomatica, e  
b) infettività, ovvero la capacità di contagiare altre persone.**

*Nota: „Abbiamo imparato che, a differenza dei batteri, non esiste una colonizzazione normale delle mucose con coronavirus.“  
(K. Henning nel podcast 58 con C. Drosten)*

Christian Drosten aveva già descritto questa distinzione tra contaminazione e infezione vera nel 2014, in un'intervista alla *Wirtschaftswoche* in relazione al MERS ([Link all'intervista](#)):

„Sì, ma il metodo [nota: si riferisce alla PCR] è così sensibile da poter rilevare anche una singola molecola genetica di questo virus. Per esempio, se un patogeno passa per un solo giorno sulla mucosa nasale di un'infermiera (nota: questo sarebbe il caso della "contaminazione" menzionata sopra), senza che lei si ammali o noti nulla, all'improvviso diventa un caso di MERS. In precedenza venivano riportati solo casi di pazienti gravemente malati; ora nella statistica dei casi compaiono anche quelli lievi o persone che sono sostanzialmente in salute.“

„Perché ciò che inizialmente interessa sono i veri casi [nota: questi sono gli "infetti"]. Dubito che operatori sanitari asintomatici o con sintomi lievi siano davvero portatori del virus. Ancora più dubbio è che possano trasmettere il virus ad altri.“

**Ma proprio questo punto della trasmissione del virus (e quindi della propagazione della pandemia) è il fondamento delle misure adottate, come le ordinanze di quarantena/isolamento, i "lockdown" e le cosiddette regole distanza, igiene, mascherine.**

### 3.3.2 Prove della rilevanza del valore CT

#### 3.3.2.1. Studio canadese

Uno **studio canadese** di Jared Bullard e Guillaume Poliquin, pubblicato su *Clinical Infectious Diseases* nel 2020, consultabile al link <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa638>, ha evidenziato già a maggio 2020 che sopra un valore CT di 24 non è stato trovato alcun virus riproducibile. Ciò significa che i tentativi di coltivare virus replicabili da campioni di tampone che risultavano positivi a un test con un valore CT più alto sono falliti. Secondo questo studio, sopra un valore CT di 24 la quantità di materiale genetico virale rilevabile è così ridotta che il test positivo non può più essere interpretato come indicativo di un'infezione attiva.

### 3.3.2.2. Studio francese

Un ampio **studio di Jaffar et al.**, consultabile al link <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491>, ha stabilito la soglia di coltivabilità del SARS-CoV-2 da campioni di pazienti con un valore CT pari a 30.

### 3.3.2.3. Studio del CDC americano

In uno **studio del CDC americano** sul confronto tra test antigenici, RT-qPCR e coltivazione virale (consultabile al link <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491>), è stata riportata una coltivazione virale efficace per un intervallo di valori CT compreso tra 17,4 e 29,8. Tuttavia, solo i campioni con un valore CT fino a 25 provenivano interamente da individui sintomatici e presentavano coltivazioni virali di successo. Nel caso di valori CT compresi tra 25 e 29, solo il 18,5% (5 su 27) dei campioni ha mostrato una coltivazione positiva. Nel documento originale:

"Virus was isolated from specimens with Ct values ranging from 17.4–29.8; virus was isolated from all specimens with a Ct value <25 and from 18.5% (5/27) of specimens with a Ct value ≥25." (*pagina 9, sezione centrale*).

Nonostante questa analisi basata sulla coltivazione virale, tutti i campioni positivi per due sequenze bersaglio del gene *N*, con un valore CT fino a 40, sono stati considerati "realmente positivi".

### 3.3.2.4. Raccomandazioni di C. Drosten nel podcast NDR

Nel suo **podcast dell’NDR del 16 febbraio 2021, Christian Drosten** ha dichiarato esplicitamente che un aumento del valore CT da 25–27 oltre la soglia di 28 indica che le persone da cui sono stati ottenuti questi tamponi con un valore CT più alto non sono più infettive.

Nel documento originale:

"E anche qui si nota uno spostamento del valore CT da circa 25 a 27, 27, 28. Ed è una fascia in cui, secondo la nostra valutazione, l'infettività termina. Se si analizza un campione del paziente e ci si chiede se il paziente è ancora infettivo, risponderai: **no, questo non è più un intervallo infettivo.**" (*pagina 4, colonna destra superiore*).

Drosten si riferisce presumibilmente a uno studio sull'efficacia del vaccino in Israele, verificato tramite RT-qPCR, dal titolo [“Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine”](#). Anche il Robert Koch-Institut (RKI) ha menzionato questo studio in una comunicazione al Ministero Federale della Salute (AZ: ID3176 del 31 marzo 2021). Lo

studio dimostra che nei soggetti vaccinati, a partire dal giorno 12 dopo la prima dose del vaccino BNT162b2, **i valori CT per i tre geni testati (E, N, RdRp, utilizzando il kit Seegene Allplex) sono aumentati da una media di 25 a una media di 27.**

Nel confronto con **una coorte di individui non vaccinati e positivi al SARS-CoV-2, il successo del vaccino è stato quantificato tramite una riduzione del valore CT di 1,64–2,33. Tuttavia, questo successo è praticamente impercettibile, poiché i soggetti vaccinati risultano ancora chiaramente positivi al SARS-CoV-2 nei test PCR.**  
Nel documento originale:

"Finally, applied on all infections (post-vaccination and unvaccinated, n=5,794), a multivariate linear regression model accounting for age, sex and vaccination quantify Ct regression coefficients ranging from 1.64 (N gene) to 2.33 (RdRp) for vaccination after 12 days or longer prior to infection sampling."

"As a difference of 1 Ct unit is equivalent to a factor of about 1.94 in viral particles per sample, these Ct differences represent a viral load ratio ranging from 2.96 to 4.68."

È notevole che anche in questa pubblicazione siano stati analizzati e valutati valori CT fino a 40 (Extended Data Figure 4 dello studio).

### 3.3.2.5. Raccomandazioni del CDC

Il **CDC**, in una raccomandazione del 16 aprile 2021, ha indicato che il valore CT nella PCR per SARS-CoV-2 non dovrebbe superare 28 per inviare prodotti di PCR da casi di "breakthrough vaccinali" (persone positive all'RT-qPCR dopo la vaccinazione completa) al laboratorio per la sequenziazione. (<https://www.cdc.gov/vaccines/covid-19/downloads/Information-for-laboratories-COVID-vaccine-breakthrough-case-investigation.pdf>)

### 3.3.2.6. Studio della Corea del Sud

Uno **studio condotto in Corea del Sud** ha stabilito un valore  $CT \leq 25$  come limite massimo per considerare clinicamente rilevanti i risultati positivi e ha utilizzato tale valore per confrontare l'accuratezza dei test antigenici. Citazione originale: „ [...] based on a **clinically significant Ct value of  $\leq 25$**  (...)“ (S. 3 in <https://jkms.org/DOIx.php?id=10.3346/jkms.2021.36.e101>)

### 3.3.2.7. Articolo del New York Times

Secondo l'opinione condivisa di scienziati, inclusi Dr. Fauci del CDC statunitense e vari altri intervistati dal **New York Times nell'agosto 2020**, qualsiasi risultato positivo ottenuto dopo **35 cicli non ha alcuna base scientifica o evidenza**. <https://www.nytimes.com/2020/08/29/health/coronavirus-testing.html> Il test RT-qPCR propagandato a livello globale dall'OMS per il rilevamento di SARS-CoV-2 era impostato su 45 cicli, senza definire un valore CT per considerare un risultato "positivo".

### 3.3.2.8. Nationales CDC Singapur

Il **National Center for Infectious Diseases di Singapore**, (<https://www.ncid.sg/Documents/Period%20of%20Infectivity%20Position%20Statementv2.pdf>) già a maggio 2020, ha pubblicato un documento in cui affermava che:

1. Il rilevamento dell'RNA virale tramite PCR non equivale a infettività né alla presenza di virus replicabili.

**Citazione originale:**

"It is important to note that viral RNA detection by PCR does not equate to infectiousness or viable virus."

2. Sopra un valore CT di 30, il test rileva ancora RNA virale, ma non più virus replicabili, e le persone testate non sono infettive.

**Citazione originale:**

"When the Ct value was 30 or higher (i.e., when viral load is low), no viable virus (based on being able to culture the virus) has been found."

**Testo Originale:**

*"6. A surrogate marker of 'viral load' with PCR is the cycle threshold value (Ct). A low Ct value indicates a high viral RNA amount, and vice versa. As noted above, **detection of viral RNA does not necessarily mean the presence of infectious or viable virus**. In a local study from a multicenter cohort of 73 COVID-19 patients, when the Ct value was 30 or higher (i.e. when viral load is low), no viable virus (based on being able to culture the virus) has been found."*

### 3.3.2.9. Homepage del RKI

Anche il **Robert Koch-Institut (RKI)**, già dall'11 agosto 2020, riportava:

([https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Vorl\\_Testung\\_nCoV.html#doc13490982bodyText4](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html#doc13490982bodyText4)) "Primi risultati diagnostici presso l'RKI mostrano che la perdita della capacità di coltivazione in coltura cellulare era associata a una quantità di RNA, determinata tramite PCR real-time (RT-qPCR), inferiore a 250 copie/5 µL di RNA. Questa concentrazione corrispondeva in quel sistema di test a un valore CT > 30."

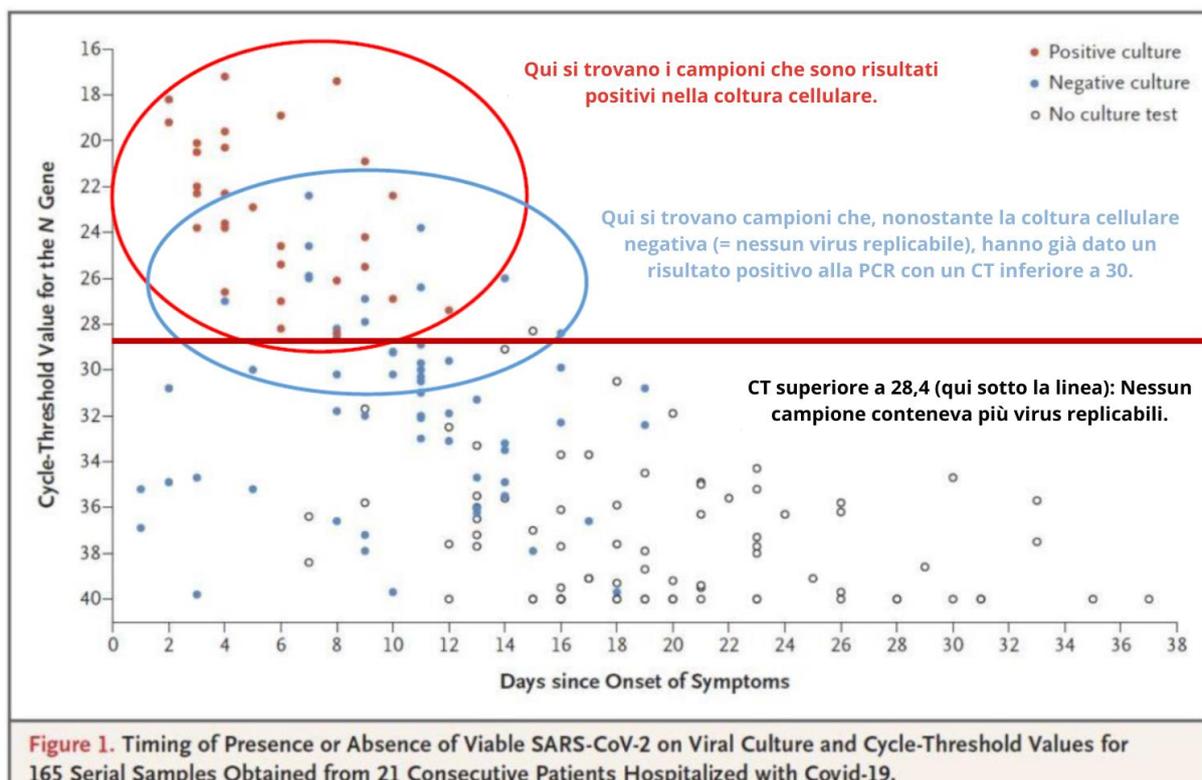
#### Citazione

#### Originale:

*"Erste Ergebnisse aus der Diagnostik am RKI zeigen, dass der Verlust der Anzuchtbarkeit in Zellkultur mit einer per real-time PCR (Anmerkung: ist die RT-qPCR) ermittelten RNA Menge von <250 Kopien/5 µL RNA einherging. Diese RNA-Konzentration entsprach im verwendeten Testsystem einem Ct-Wert >30."*

### 3.3.2.9. Studio aggiuntivo dalla Corea del Sud e discussione svizzera

Uno studio coreano (<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2027040>) ha fissato la soglia per la capacità di coltivazione virale a un valore CT di 28,4. Questo studio è stato discusso il 28 gennaio 2021 dall'ex capo del reparto di infettivologia dell'Ospedale Cantonale di San Gallo, Prof. em. Dr. med. Pietro Verjazza, in un articolo intitolato Infettività e positività PCR – non sono la stessa cosa. ([Infektiosität und PCR-Positivität - Nicht das Gleiche - infekt.ch](http://infektiositaet.ch)) Verjazza ha evidenziato un grafico dello studio, che mostra come anche per pazienti sintomatici ma negativi alla coltura cellulare, il risultato PCR fosse positivo con valori CT superiori a 28. Inoltre, è stato osservato che persino con valori CT tra 22 e 28 alcune persone non avevano una coltura cellulare positiva, e quindi non ospitavano virus realmente replicabili.



**Figura** tratta dallo studio sudcoreano (DOI: 10.1056/NEJMc2027040) con integrazioni proprie. In questa figura è chiaramente visibile la correlazione tra la positività della coltura cellulare, utilizzata come indicatore della presenza di virus capaci di replicarsi, e il valore soglia dei cicli (CT).

### 3.3.2.10. Studio di Francoforte

In uno **studio condotto a Francoforte** (<https://www.mdpi.com/2077-0383/10/2/328>) è emerso che, su 64 campioni RT-qPCR positivi (un solo gene testato), solo in 33 casi (=52%) è stato possibile coltivare il virus in coltura cellulare. Questi campioni infettivi risultavano positivi fino a un valore medio di CT pari a 26 (Figura Supplementare 1), mentre nei campioni con CT più elevato non è stato possibile coltivare virus.

### 3.3.2.11. Ufficio Nazionale di Statistica Inglese (ONS)

Il valore soglia di CT 25 è stato introdotto già a dicembre 2020 dall'**Office of National Statistics (ONS)** inglese, considerando negativi i risultati con CT superiore a 25. Nel foglio di calcolo Excel (tabella 2 - Dati) disponibile al link sotto, si afferma:

*"L'analisi mostra che le persone con una maggiore concentrazione di materiale genetico virale (casi positivi con CT bassi, sotto 25) hanno maggiori probabilità di essere infettive in un contesto familiare rispetto a quelle con concentrazioni più basse (casi positivi con CT elevati, sopra 25)."*

Testo originale: „*The analysis shows: - People with a higher concentration of viral genetic material (positive cases with low Ct values; below 25) are more likely to be infectious in a household than those with lower concentrations (positive cases with high Ct values; above 25).*”

(<https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/conditionsanddiseases/adhocs/12683coronaviruscovid19infectionsurveycyclethresholdandhouseholdtransmissionanalysis>).

### 3.3.2.12. Studio di coorte di Münster

Riferendosi al limite di CT 25 definito dall'ONS, gli autori di un ampio **studio di coorte condotto a Münster** nell'estate del 2021 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8166461/>) hanno concluso che: *"La positività del test RT-PCR non dovrebbe essere considerata una misura accurata dell'incidenza infettiva di SARS-CoV-2."* Nello studio, 2,6% dei 162.457 campioni testati erano positivi all'RT-qPCR, con un limite di CT

fissato a 40. I campioni sono stati analizzati anche per la proporzione di positivi fino al limite di 25 CT (entrambi i geni testati, informazione personale ottenuta da A. Spelsberg, coautrice).

Tra i campioni asintomatici, solo lo 0,4% (68 su 16.874) aveva un risultato positivo con un CT medio di quasi 29, e solo il 27% di questi (18 persone) aveva un  $CT \leq 25$ , suggerendo una probabile infettività (definizione originale: "*indicating a likelihood of the person being infectious*"). Questo corrisponde a 0,1% degli asintomatici testati.

Tra i 6.212 sintomatici delle prime due ondate di COVID-19, solo il 6,5% (403 persone) risultava positivo all'RT-qPCR con CT medio di 27,8 (prima ondata) e 26,6 (seconda ondata). Di questi, solo il 40% nella seconda ondata (145 su 367) e il 26,5% nella prima ondata (10 su 36) avevano un  $CT \leq 25$ , indicando una possibile infettività.

### 3.3.2.13. Studio sul controllo delle infezioni in Inghilterra

Uno **studio sul controllo delle infezioni da COVID-19 in Inghilterra** (<https://elifesciences.org/articles/64683>) ha analizzato i risultati di test PCR su 3,3 milioni di campioni (3 geni, test commerciale Thermo Fisher). Complessivamente, lo 0,83% dei campioni era positivo con un CT medio di 29,2. La positività veniva determinata anche con un solo gene positivo (N-gen) senza limite definito di CT.

Le infezioni con "*bassa evidenza*" venivano classificate nei soggetti asintomatici con un singolo gene positivo a un  $CT \geq 34$ , mentre i casi "*altamente probabili*" erano definiti da sintomi e positività di due o tre geni. Un CT basso (24,9) correlava con la presenza di anticorpi nel siero (indicativo di una vera infezione), mentre CT elevati (oltre 33) spesso non mostravano una risposta anticorpale.

### 3.3.2.14. Confronto tra kit PCR commerciali a livello internazionale

Il **confronto tra kit PCR commerciali** ([http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag\\_tab](http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag_tab)) evidenzia una notevole variabilità nei valori di CT tra i diversi kit e geni bersaglio. Nei test di controllo di qualità condotti da Instand e.V., i valori di CT per la stessa diluizione di SARS-CoV-2 (campione 340061) variavano enormemente tra i laboratori certificati:

- E-Gen: 15-40
- N-Gen: 20-40,7
- RdRp-Gen: 19,5-42,8

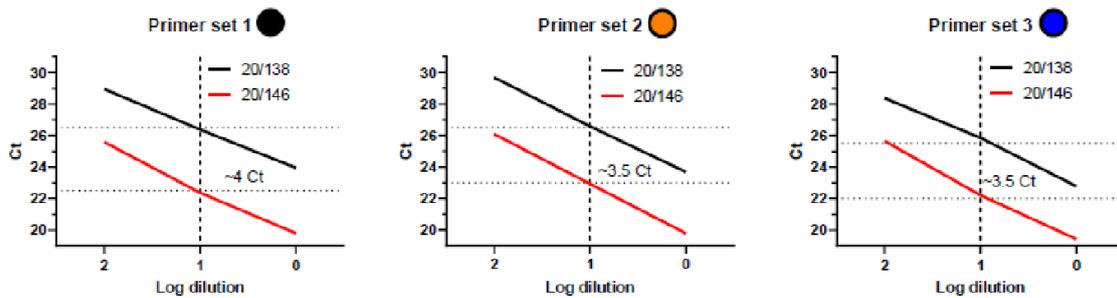
Questo dimostra una grave mancanza di standardizzazione tra i laboratori partecipanti (<https://fragdenstaat.de/anfrage/herausgabe-der-auswertung-des-ringversuchs-der-gruppe-340-termin-4-2020/#nachricht-533736>).

### 3.3.2.15. Valutazione dei controlli standardizzati WHO

Durante la **valutazione di due controlli standardizzati WHO** per l'RT-qPCR in diversi laboratori e con vari approcci RT-qPCR (Bentley E, WHO/BS/2020.2402, disponibile al link: <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2402>), è emerso quanto segue:

- Per il campione di controllo 20/138 (una prova sintetica con sequenza Wuhan1, rappresentata dalla linea nera nella figura), una quantità di genoma pari a  $10^{6,73}$  (correlata a una potenziale carica virale infettiva) risultava positiva con un CT compreso tra 23 e 24. Una quantità di genoma pari a  $10^{5,73}$  (sotto la soglia della carica virale potenzialmente infettiva) risultava positiva con un CT compreso tra 25,5 e 26,5. Questo indica che, con questo approccio, una carica virale potenzialmente infettiva di  $10^6$  genomi virali si troverebbe in un intervallo di CT compreso tra **23 e 26,5**.
- Per un SARS-CoV-2 inattivato (campione 20/146, linea rossa nella figura), con una quantità virale definita di  $10^{7,7}$  nella soluzione madre, si osservava un rilevamento positivo dell'RNA già con un CT inferiore a **20**. Una quantità di genoma di  $10^{6,7}$  mostrava un CT compreso tra **22 e 23**, mentre una quantità di genoma di  $10^{5,7}$  mostrava un CT compreso tra **25,5 e 26**. Questo significa che, anche in un campione definito contenente SARS-CoV-2, un equivalente di una dose infettiva poteva essere rilevato già con un CT compreso tra **22 e 26**.

Segue la figura rilevante tratta dalla pubblicazione (Bentley E, WHO/BS/2020.2402, pagina 63). Le quantità standardizzate di RNA iniziale per il campione 20/138 sono indicate al punto 3 (Unitage) a pagina 66 con **6,73 log<sub>10</sub> IU/ml**, mentre per il campione 20/146 sono specificate a pagina 64 al punto 3 con **7,7 log<sub>10</sub> IU/ml**.



**Figure 2.** Relative potency of 20/138 compared to 20/146 by Real-time RT-PCR quantification using three primer sets. There is an approximate 0.5 Ct shift between the standard curves using primer set 1 which targets the region of lower coverage, in comparison to primer sets targeting the junction (primer set 2) and region of higher coverage (primer set 3).

### 3.4. Probabilità pre-test

#### 3.4.1. Spiegazione di Correctiv

I fact-checker di **Correctiv** hanno affrontato già il **18 giugno 2020** il tema della probabilità pre-test ([Articolo: Corona-PCR-Test und Vortestwahrscheinlichkeit: So kann es zu falschen Ergebnissen kommen - Correctiv](#)) e hanno citato l'avvertimento originariamente presente sul sito del RKI:

“Si sconsiglia di testare persone asintomatiche a causa della scarsa significatività di un risultato negativo e della possibilità di risultati falsi positivi, che dipendono dalla prevalenza/incidenza.”

#### Testo

#### Originale:

„Von einer Testung von asymptomatischen Personen wird aufgrund der unklaren Aussagekraft eines negativen Ergebnisses sowie der Möglichkeit falsch positiver Befunde in Abhängigkeit von der Prävalenz/Inzidenz in der Regel abgeraten.“

Questo avvertimento è stato rimosso il **2 giugno 2020** e sostituito da un'indicazione sulla probabilità pre-test: “In generale, l'accuratezza dei risultati dei test diagnostici è influenzata anche dalla diffusione di una malattia. Più rara è la malattia e meno mirati sono i test effettuati, maggiori saranno i requisiti di sensibilità e specificità per i test applicati.”

#### Testo

#### Originale:

„Generell wird die Richtigkeit des Ergebnisses von diagnostischen Tests auch von der Verbreitung einer Erkrankung beeinflusst. Je seltener die Erkrankung und je ungezielter getestet wird, umso höher sind die Anforderungen an Sensitivität und Spezifität der zur Anwendung kommenden Tests.“

Su una pagina interattiva collegata all'articolo di **Correctiv** e fornita dal **British Medical Journal** (ancora attiva al 10 gennaio 2024), è possibile inserire i parametri del test per calcolare la probabilità di risultati falsi o corretti in funzione della probabilità pre-test, della sensibilità e della specificità. (Covid-19 test calculator | The BMJ)

**Esempio** di **calcolo**  
Considerando i risultati del primo **INSTANT e.V. Ringversuch** per la RT-qPCR (Test **340**, vedi anche Punto 3.6.2.) e il test **TIB Molbiol E-Gentest**, ampiamente utilizzato e originariamente raccomandato dall'OMS, si ottiene quanto segue:

- La specificità del test, secondo la pagina 28 del **Rapporto INSTANT**, è del **97,1%**, mentre la sensibilità, riportata nella tabella a pagina 32, è del **97,06%**.

**Caso 1:** *10 persone su 100 sono realmente infette*  
Con una **probabilità pre-test** del **10%** (10 persone su 100 sono realmente infette):

- **10 persone** vengono correttamente identificate come positive (*true positive*).
- **3 persone** ricevono un risultato falso positivo (*false positive*).

Se si considera un test condotto su 10.000 persone:

- Con un'incidenza reale di **1000**, l'incidenza apparente risulterebbe **1300**.
- Questo avrebbe un impatto limitato sulle misure adottate.

**Caso 2:** *1 persona su 100 è realmente infetta*  
Con una **probabilità pre-test** dell'**1%** (1 persona su 100 è realmente infetta):

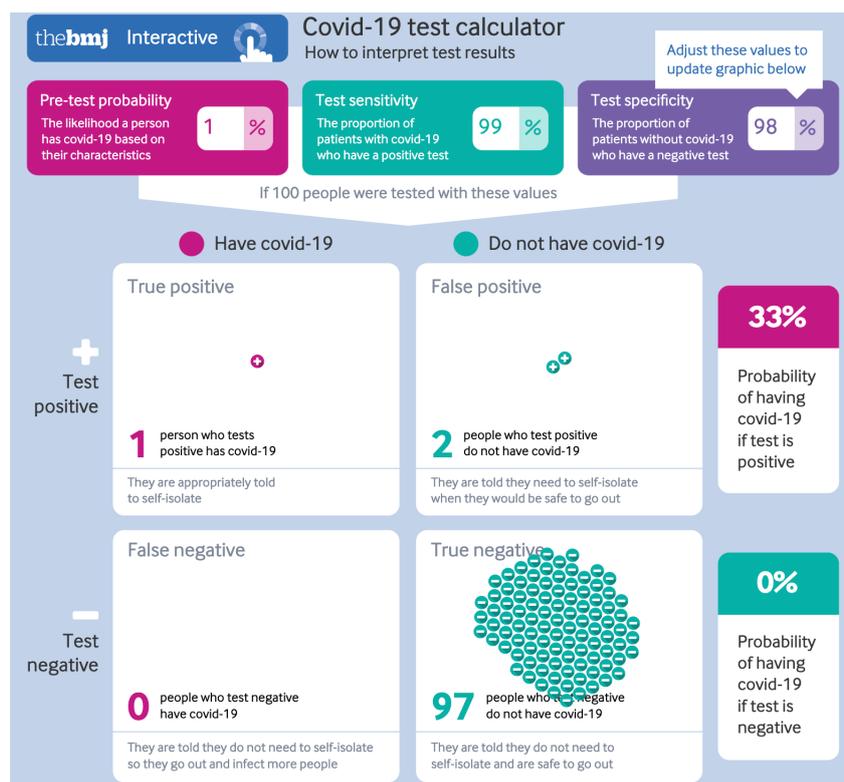
- **1 persona** viene correttamente identificata come positiva (*true positive*).
- **3 persone** ricevono un risultato falso positivo (*false positive*).

Se si considera un test condotto su 10.000 persone:

- Un'incidenza reale di **100** risulterebbe come **400**, a causa dei risultati falsi positivi.
- Questo avrebbe un impatto significativo sulle misure adottate.

**Correctiv** ha calcolato che con un test più preciso, in condizioni di bassa incidenza, **2 test positivi su 3 sarebbero falsi**.

**Vedi** **figura** **seguinte:**  
Calcolatore del test presente nella pagina web del **British Medical Journal**.



### 3.4.2. Spiegazione fornita dal RKI sui test rapidi antigenici (Annex 7)

In un'infografica intitolata *“Capire i risultati dei test rapidi per il coronavirus”* ([link all'infografica RKI](#)), il RKI illustra in modo chiaro come la probabilità che un risultato di test sia corretto dipenda dalla cosiddetta **probabilità pre-test**, ovvero dal numero effettivo di persone realmente infette nella popolazione testata.

**Questo aspetto della probabilità pre-test si applica sia ai test rapidi antigenici che ai test RT-qPCR.**

L'esempio fornito dal RKI per interpretare i risultati dei test rapidi antigenici assume uno scenario realistico con una sensibilità (capacità di rilevare correttamente i positivi) dell'80% e una specificità (capacità di evitare i falsi positivi) del 98%. Anche in questo caso ([fonte](#)), viene sottolineato:

*“Occorre considerare le notevoli differenze di prestazioni tra i vari test disponibili in commercio”* ([riferimento](#)).

Se, per ipotesi, 5 persone su 10.000 testate sono effettivamente infette da SARS-CoV-2, nell'esempio considerato si otterrebbero **200 falsi positivi** e 4 veri positivi. Ciò significa che 1 persona infetta su 10.000 verrebbe non rilevata, mentre **200 riceverebbero un risultato falso positivo** e sarebbero quindi sottoposte a quarantena/isolamento.

Nel caso di una scuola con, ad esempio, 1.000 studenti sottoposti a test, 20 riceverebbero un falso “*Sei positivo al coronavirus*” e la scuola potrebbe essere temporaneamente chiusa come “*focolaio*” fino a quando ulteriori test non forniscano rassicurazioni. Episodi simili sono già stati riportati dalla stampa.

Nelle “*Indicazioni per la valutazione dei risultati dei test AG*” (nota: test rapidi antigenici) pubblicate sul sito del **RKI**, si affronta la problematica dei falsi positivi nei test antigenici: “*Un **risultato positivo** tramite test AG solleva il sospetto di un’infezione rilevante per la trasmissione del SARS-CoV-2 e richiede, per evitare falsi positivi, un ulteriore test tramite PCR. Considerando le potenziali conseguenze significative di risultati incorretti, non solo la sensibilità dei test antigenici deve soddisfare requisiti elevati, ma anche la specificità. In caso di bassa prevalenza/probabilità pre-test e bassa specificità dei test, **ci si aspetta un alto numero di risultati falsi positivi e un conseguente aumento del carico per i servizi sanitari pubblici (ÖGD) dovuto all’imposizione e, eventualmente, alla revoca di misure.***”

**Testo Originale:** „*Ein positives Testergebnis mittels AG-Test löst den Verdacht auf eine übertragungsrelevante Infektion mit dem SARS-CoV-2 aus und bedarf zur Vermeidung falsch-positiver Befunde einer Nachtestung mittels PCR. In Anbetracht der potenziell erheblichen Konsequenzen inkorrekt er Ergebnisse bestehen nicht nur an die Sensitivität von Antigentesten hohe Anforderungen, sondern auch an die Spezifität. So wäre bei niedriger Prävalenz/Vortestwahrscheinlichkeit und geringer Testspezifität mit einer hohen Zahl falsch-positiver Ergebnisse und einer entsprechenden zusätzlichen Belastung des ÖGD durch Auferlegung und ggf. Rücknahme von Maßnahmen zu rechnen.*“

[Link: Informazioni RKI sui test antigenici](#)

### 3.4.3. Pubblicazione sul problema della probabilità pre-test nella PCR

Anche l'affidabilità dei risultati della PCR dipende, oltre ai problemi tecnici legati al design e all'esecuzione del test, dalla probabilità pre-test, come illustrato nel punto 3.5.1 con il calcolatore BMJ e pubblicato in modo chiaro nel 2022 in un **articolo della biostatistica Prof. Christel Weiß di Mannheim** (*Notfall Rettungsmed 2022; 25:48-50 PCR-Tests und Schnelltests – Wie zuverlässig sind sie?* | [SpringerLink](#)).

In questo studio, considerando una sensibilità del 99% e una specificità del 99,5% per un test PCR, è stato dimostrato che:

- In una situazione di **alta prevalenza (20%)**, ad esempio in un gruppo ad alto rischio come una casa di riposo, su 10.000 test eseguiti, **2.020 risultano positivi**, di cui **40 sono falsi positivi**.

- In una situazione di **bassa prevalenza** (ad esempio, nei test di massa su una popolazione sana di adolescenti con una prevalenza stimata all'1%), l'autrice sottolinea la necessità di cautela: **“Un terzo di tutti i risultati positivi è infatti errato”** (Testo Originale: „Ein Drittel aller positiven Befunde ist nämlich falsch“).

Questa affermazione si basa sul calcolo illustrato nella tabella 1 della pubblicazione. Prendendo come esempio un gruppo di 10.000 adolescenti:

- 100 persone sarebbero realmente infette, con **99 risultati positivi reali**.
- Tuttavia, ci sarebbero anche **49,5 risultati falsi positivi**, portando a un totale di 148,5 risultati positivi.

Nella sintesi della pubblicazione, viene inoltre sottolineato: **“Inoltre, si deve considerare che un'infezione rilevata tramite un test PCR non implica necessariamente che la persona interessata sia contagiosa o malata”**

**Testo Originale:** „Ferner ist zu beachten: Eine nachgewiesene Infektion mittels eines PCR-Tests bedeutet nicht zwangsläufig, dass die betreffende Person ansteckend oder erkrankt ist“

### 3.5. Valutazione intermedia

Alla luce dei punti A-P precedentemente elencati, risulta sconcertante che la RT-qPCR venga tuttora considerata dal RKI come "gold standard" senza definire in maniera precisa le condizioni di validazione, le certificazioni esterne e i valori soglia del CT (e senza che queste siano pienamente monitorate dalle autorità competenti).

In generale, una RT-qPCR, per via della metodologia impiegata, **non può rilevare virus intatti e replicabili (infettivi)**, né l'intero genoma virale integro, ma esclusivamente il segmento di acido nucleico ricercato. È possibile, tuttavia, che attraverso una validazione accurata, **eseguita parallelamente a un'isolamento virale in coltura cellulare**, si definisca un valore soglia (CT) oltre il quale un segnale PCR positivo non corrisponde più a virus replicabili. Questo approccio è da anni una pratica consolidata nel monitoraggio dei prodotti ematici.

Tale validazione rigorosa consente – **finché il sistema di test NON viene modificato** – di utilizzare il valore soglia come marcatore surrogato per stimare la carica virale e la possibile infettività del campione testato. Tuttavia, non sarà mai possibile ottenere una conferma definitiva. **Qualsiasi modifica** a una componente del sistema PCR (reagenti chimici, materiali plastici, enzimi, protocolli o apparecchiature) richiede necessariamente una nuova calibrazione dell'intero sistema.

In base a tutte le informazioni pubblicate finora (vedi sopra), si può concludere che **qualsiasi valore CT superiore a 35 non corrisponde più alla capacità di isolamento di virus infettivi e,**

pertanto, rappresenta il limite assoluto per dichiarare un risultato "positivo", indipendentemente dal sistema di test utilizzato. Il range di CT tra 25 e 35 può essere considerato valido come marcatore surrogato per "positivo" in termini di una carica virale potenzialmente sufficiente per l'infettività, ma solo se adeguatamente validato attraverso un confronto con l'isolamento virale nel laboratorio che esegue il test.

Interpretazione dei valori CT:

- **CT ≤ 25:** rilevazione positiva del genoma, alta carica di mRNA nel campione.
- **CT 26-35:** positivo solo se validato con isolamento virale.
- **CT > 35:** negativo.

La valutazione rigorosa del valore di CT è particolarmente importante quando si analizza un singolo segmento genico nella PCR, ma è applicabile in generale a ogni target individuale.

### 3.6. Controlli adeguati

Per valutare correttamente la sensibilità e la specificità di una RT-qPCR, è fondamentale includere campioni di controllo adeguati in ogni ciclo di reazione. Questo processo inizia con l'uso di "tamponi vuoti" nei punti di raccolta dei campioni per escludere eventuali contaminazioni. Prosegue poi con l'uso di controlli di estrazione, necessari per garantire la corretta isolamento dell'RNA replicabile e il corretto completamento di tutti i passaggi successivi. A tale scopo, si utilizzano RNA sintetici definiti o, preferibilmente, isolati virali inattivati a concentrazione nota. Questi campioni seguono tutte le fasi del processo, inclusa la PCR, e consentono di verificare che non ci siano sostanze inibitorie o errori che possano interferire con l'amplificazione dell'RNA.

Dal **dicembre 2020**, l'OMS ha reso disponibili controlli definiti ([link](#)), e dal **novembre 2020**, anche Instant e.V. ha fornito campioni standardizzati ([manuale](#)).

Dal manuale d'accompagnamento fornito da Instant e.V. emergono alcuni punti chiave:

- È stato utilizzato il ceppo **BetaCoV/Munich/ChVir984/2020**, inattivato e con un numero definito di copie virali ( $10^6$  e  $10^7$  RNA/ml), considerato il limite per giudicare i pazienti "probabilmente contagiosi" (sezione 2.2 del manuale). Questo ceppo, raccolto il 28 gennaio 2020 a Monaco di Baviera, è distribuito dalla Charité ([database](#)).

I risultati dei laboratori hanno evidenziato una notevole variabilità nei valori di CT, anche utilizzando lo stesso campione standardizzato:

- **E-Gen:** valori CT variabili da **21,9** (Laboratorio 4) a **28,7** (Laboratorio 1).

- **RdRp-Gen:** valori CT variabili da **24,8** (Laboratorio 4) a **33,0** (Laboratorio 1).
- Complessivamente, i valori di CT sono oscillati da **12 a 38** per campioni con  $10^6$  copie/ml e da **10 a 36** per campioni con concentrazioni più elevate.

Questi risultati dimostrano che ogni laboratorio deve includere sempre campioni definiti per calibrare i propri valori CT rispetto alla carica virale reale.

La notevole variabilità nei valori di CT tra i diversi sistemi di test è stata discussa anche da **C. Drosten** nel podcast NDR 94 del 22 giugno 2021 ([trascrizione](#)):

- **Variabilità tra i produttori di test:**

*"I valori di CT non sono facilmente comparabili tra i diversi produttori di test. [...] In alcuni test, un valore di 25 non è preoccupante, mentre in altri indica una concentrazione infettiva significativa. **Questo perché i produttori non standardizzano i valori di CT.**"* (pagina 17).

**Testo Originale:** *„Und zwar die Ct-Werte, die wir hier haben, die sind zwischen den einzelnen Testherstellern nicht so ohne Weiteres vergleichbar.“....“ Aber nur so lange, wie wir uns in demselben Testsystem bewegen, können wir die zahlenmäßig vergleichen. Die Unterschiede sind da zum Teil erheblich. Es gibt Testhersteller, bei denen ist ein Wert von sagen wir mal 25 überhaupt nichts Besorg-niserregendes, während derselbe Wert von 25 in dem Test eines anderen Herstellers zeigt, dass das schon ernsthaft eine infektiöse Konzentration ist. Das liegt einfach daran, dass diese Testhersteller nicht auf den Ct-Wert standardisieren.“*

- **Mancata regolamentazione:**

Drosten ha sottolineato che la tecnologia per la calibrazione dei test era disponibile già dall'autunno 2020, ma non è stata implementata uniformemente dalle autorità sanitarie: *"Il problema dell'incomparabilità dei valori di CT è stato tecnicamente risolto già dall'autunno. Tuttavia, manca l'implementazione e la regolamentazione da parte delle autorità."* (pagina 18).

**Testo Originale:** *„Wir können das eben sogar so, dass dieses inhärente Problem der Nichtvergleichbarkeit der Ct-Werte schon gelöst ist. Wohlgedemert im Herbst. Die Technik und die Labortestung ist hier nicht der Haken, sondern es ist wieder mal die Umsetzung und die Regulation.“*

Dal **2020**, sono disponibili controlli adeguati per calibrare i test sulla base della carica virale. Tuttavia, la mancata implementazione di queste procedure da parte delle autorità competenti ha portato a incertezze nell'interpretazione dei risultati della PCR, con potenziali conseguenze sull'affidabilità diagnostica.

### 3.6.1. Fornitura di controlli adeguati

In ogni serie di test correttamente eseguita è necessario includere una serie di controlli negativi esterni (ossia condotti parallelamente alle analisi sui campioni dei pazienti) e un controllo positivo, che idealmente dovrebbe consistere in un ceppo di SARS-CoV-2 definito e inattivato.

In Germania questa sarebbe una responsabilità primaria del RKI (con il supporto di altre istituzioni pubbliche idonee, come il Bernhard Nocht-Institut o il Friedrich-Löffler-Institut), sfruttando le infrastrutture di laboratorio disponibili (di livello di biosicurezza 4). In queste strutture, si dovrebbe isolare un numero sufficiente di virus SARS-CoV-2 da campioni di pazienti, coltivare ceppi definiti da utilizzare come controlli, inattivarli e distribuirli, in quantità definite, come controlli ai laboratori di test tramite le autorità locali di vigilanza.

Tuttavia, nonostante l'importanza cruciale di questa attività, tale servizio non viene ancora offerto in modo sistematico, nemmeno dopo tre anni dall'inizio della "pandemia". Pertanto, il controllo positivo si limita nella maggior parte dei casi a un'RNA sintetica che codifica esclusivamente per i geni target del sistema di test.

Grazie a questo controllo positivo, è possibile determinare anche il limite inferiore di rilevazione della PCR. Alcuni kit commerciali dichiarano un limite di rilevazione di 20 o meno genomi virali per campione, rilevando quindi una quantità di virus nel tampone inferiore di un fattore  $10^5$  rispetto alla dose infettiva, il che rende tale risultato privo di valore diagnostico o prognostico (vedi punto 1.3.2).

Una panoramica sui kit commerciali attualmente in uso, con le relative prestazioni tecniche, è disponibile al link seguente: [finddx.org](http://finddx.org).

### 3.6.2. Test a circuito chiuso: anomalie al primo approccio

Tra i controlli eseguiti correttamente rientra anche la partecipazione dei laboratori che effettuano i test a cosiddetti "**test a circuito chiuso**" (*Ringversuche*). In tali test, un fornitore esterno mette a disposizione un pannello anonimo di campioni di prova.

Nel caso di rilevamento di virus, questi campioni includono:

- **Campioni negativi** e campioni contenenti virus strettamente correlati (inattivati), utilizzati per verificare la **specificità** (in questi casi, non devono essere rilevati segnali positivi).
- **Campioni positivi** con diverse diluizioni del virus cercato (inattivato), utilizzati per determinare la **sensibilità** (ossia, il numero minimo di particelle virali necessario per ottenere un risultato positivo nella PCR e il relativo CT).

## **Tentativo di Instant e.V.**

Nel caso del SARS-CoV-2, il primo test a circuito chiuso (*Ringversuch*) per il "rilevamento del genoma virale - SARS-CoV-2 (340)" è stato condotto dall'associazione **INSTANT e.V.** già nell'aprile 2020. A questo test hanno partecipato, secondo il rapporto, **488 laboratori**, di cui **463 hanno restituito i risultati**. I risultati possono essere consultati nel commento pubblicato: **Zeichhardt M: Kommentar zum Extra Ringversuch Gruppe 340 Virusgenom-Nachweis SARS-CoV-2**

Disponibile su: <https://corona-ausschuss.de/wp-content/uploads/2020/07/Instand-Ringversuch-Virusgenom-Nachweis-SARS-CoV-2.pdf>.

Il rapporto evidenzia due anomalie rispetto alla consueta procedura di test a circuito chiuso, le quali indicavano già problemi nei laboratori con la RT-qPCR per il rilevamento del SARS-CoV-2:

- **Affermazione a pagina 4 del rapporto:**  
„Wichtige Mitteilung zur Auswertung: Nur 4 der 7 Proben, die in diesem Extra-Ringversuch untersucht wurden, werden für die Erlangung eines Zertifikats über die erfolgreiche Teilnahme berücksichtigt.“  
*(Traduzione: "Importante comunicazione sull'analisi: solo 4 dei 7 campioni esaminati in questo test aggiuntivo saranno considerati per il rilascio di un certificato di partecipazione riuscita").*
- **Nota a piè di pagina a pagina 10:**  
„In der Zwischenauswertung vom 17. April 2020 wurden allen Teilnehmern des Extra INSTANT Ringversuchs (340) Virusgenom-Nachweis von SARS-CoV-2 April 2020 die Probeneigenschaften der Proben 340059, 340060 und 340064 vorzeitig mitgeteilt. Die Ergebnisse dieser 3 Proben bleiben für die Erteilung eines Zertifikats unberücksichtigt [...].“  
*(Traduzione: "Nella valutazione intermedia del 17 aprile 2020, a tutti i partecipanti al test a circuito chiuso aggiuntivo (340) per il rilevamento del genoma virale SARS-CoV-2 di aprile 2020 sono state comunicate in anticipo le proprietà dei campioni 340059, 340060 e 340064. I risultati di questi 3 campioni non saranno presi in considerazione per il rilascio di un certificato").*

Il **motivo di questa esclusione** è spiegato a pagina 4 del rapporto:

„Während der Extra-Ringversuch noch lief, erhielt INSTANT e.V. aus dem In- und Ausland dringliche Anfragen, noch vor Ende der verlängerten Abgabefrist, also vor dem 28. April 2020, die Eigenschaften der zu untersuchenden Proben aufzudecken, damit Laboratorien bei etwaigen Fehlmessungen ihre Testmethode kurzfristig verbessern können.“

*(Traduzione: "Durante il test aggiuntivo, Instand e.V. ha ricevuto richieste urgenti, sia dall'interno che dall'estero, di rivelare le caratteristiche dei campioni da analizzare prima della scadenza prorogata, cioè prima del 28 aprile 2020, affinché i laboratori potessero correggere rapidamente eventuali errori di misurazione nei loro metodi di test").*

**Questo approccio è molto insolito per un test a circuito chiuso autentico e non costituisce più una procedura di verifica indipendente dei laboratori coinvolti.**

Nonostante i campioni fossero già stati svelati e il numero di test fosse stato ridotto, molti laboratori hanno **commesso errori di identificazione** tra i campioni. A pagina 18 del commento si legge:

*„Bei Probe 340064 (SARS-CoV-2 positiv 1:100 000 verdünnt) beruht die reduzierte Erfolgsquote von nur 93,2 % im Wesentlichen auf falschen Ergebniszuordnungen (Verwechslungen) bei Probe 340064 und Probe 340065 (negativ für SARS-CoV-2 und positiv für HCoV 229E). Die Verwechslungen bei den Proben 340064 und 340065 betreffen 24 Labore mit insgesamt 59 Ergebnissen je Probe.“*  
*(Traduzione: "Per il campione 340064 (positivo al SARS-CoV-2 con diluizione 1:100.000), il tasso di successo ridotto, pari solo al 93,2%, è dovuto principalmente a errori di attribuzione dei risultati (scambi) tra il campione 340064 e il campione 340065 (negativo al SARS-CoV-2 e positivo per HCoV 229E). Gli errori di attribuzione riguardano 24 laboratori, con un totale di 59 risultati per campione").*

Molti laboratori, quindi, hanno erroneamente confuso il campione **340064** (SARS-CoV-2 leggermente diluito) con il campione **340065** (negativo al SARS-CoV-2 e positivo al virus correlato HCoV 229E). Sorprendentemente, però, **nessuno degli errori segnalati ha interessato gli altri campioni:**

- Campione 61 (SARS-CoV-2 molto diluito);
- Campione 62 (negativo).

I risultati dettagliati di un secondo test a circuito chiuso di giugno/luglio 2020 (disponibile su [Instand e.V.](#)) non sono ancora pubblicamente disponibili. Una richiesta all'RKI tramite la piattaforma *Frag den Staat* per ottenere l'analisi del test è rimasta **senza risposta**. (Richiesta: "*Herausgabe der Auswertung des Ringversuchs der Gruppe 340 Termin 4 2020 - FragDenStaat*").

### 3.7. Esclusione di contaminazioni dei reagenti e problemi nei processi operativi

### 3.7.1 Contaminazione all'interno del laboratorio dovuta a errori nei processi

Anche il miglior design di una PCR può generare risultati **falsi positivi** se i reagenti o i kit utilizzati sono contaminati da campioni positivi oppure, più comunemente, se si verificano contaminazioni durante le procedure di laboratorio. Poiché la PCR è una metodologia estremamente sensibile (reazione di tipo esponenziale), in grado di rilevare pochi frammenti di DNA, la contaminazione dei laboratori con prodotti finali della PCR rappresenta un problema principale nella diagnostica clinica. Questo fenomeno è già stato descritto, ad esempio, nel 2004 da Aslanuadeh J et al. (<http://www.annclinlabsci.org/content/34/4/389.full.pdf+html>):

***„Una PCR tipica produce fino a 10<sup>9</sup> copie della sequenza target e, se aerosolizzata, anche la più piccola goccia di aerosol può contenere fino a 10<sup>6</sup> prodotti di amplificazione. Se non controllata, nel giro di breve tempo, la formazione di aerosol con prodotti di amplificazione può contaminare reagenti, strumenti e sistemi di ventilazione del laboratorio [6].“***

*(Testo Originale: „A typical PCR generates as many as 10<sup>9</sup> copies of target sequence and if aerosolized, even the smallest aerosol will contain as many as 10<sup>6</sup> amplification products [6]. If uncontrolled, within a relatively short time the buildup of aerosolized amplification products will contaminate laboratory reagents, equipment, and ventilation systems [6].)*

Questa elevata **rischiosità di contaminazione** richiede che nei laboratori diagnostici che utilizzano la PCR si adotti la **massima precisione** durante le analisi, con personale altamente qualificato, un ambiente privo di contaminazioni e controlli indipendenti costanti.

#### **Problemi in laboratori inglesi e casi in Germania**

Aggiungendo a questo quadro il modo in cui, secondo un reportage della BBC, nei grandi laboratori di test inglesi si lavorava apertamente con personale non qualificato in ambienti altamente suscettibili alla contaminazione (il video non è più disponibile: <https://www.youtube.com/watch?v=Uk1VK1reNtE>), non sorprende che in Germania si trovino occasionali segnalazioni sui media di casi di falsi positivi dovuti a contaminazioni di laboratorio (ad esempio nel caso dell'MVZ Augsburg - link alla fine della sezione).

#### **Problemi segnalati nella letteratura scientifica**

Anche in condizioni di laboratorio controllate, le contaminazioni durante i passaggi della PCR non possono essere completamente escluse. Già nella prima pubblicazione della RT-qPCR (Corman et al., DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045), veniva evidenziata la problematica dei falsi positivi dovuti a procedure di laboratorio:

„In four individual test reactions, weak initial reactivity was seen but they were negative upon retesting with the same assay [...] most probably to handling issues [...]“

*(Traduzione: "In quattro reazioni di test individuali si è osservata una debole reattività iniziale, che tuttavia è risultata negativa al nuovo test con lo stesso metodo [...] molto probabilmente a causa di problemi di gestione [...].")*

### Ritrazione di una pubblicazione della Charité

Un altro esempio di contaminazioni che hanno portato a risultati falsi positivi è emerso in una pubblicazione guidata dalla Charité, con la partecipazione di Drosten e Landt (autori del protocollo Corman et al.). Questi problemi hanno costretto gli autori a ritirare uno studio pubblicato su *Science*:

„Wir fanden eine Mischung aus verschiedenen SARS-CoV-2 Genom Fragmenten die einige der Proben kontaminiert haben.“

*(Traduzione: "Abbiamo trovato una miscela di frammenti di genoma SARS-CoV-2 diversi che ha contaminato alcuni dei campioni").*

Anche i laboratori d'eccellenza della Charité, quindi, hanno ammesso e pubblicato problemi significativi di contaminazione con frammenti genomici di SARS-CoV-2, che possono portare a falsi positivi sia nella diagnostica PCR che nell'analisi genomica delle varianti.

### 3.7.2. Contaminazione dei materiali/reagenti dal produttore

Anche con un flusso operativo di laboratorio ottimale e rigorosamente monitorato per minimizzare le contaminazioni interne, una **fonte inaspettata di falsi positivi** può derivare dalla contaminazione dei materiali o dei reagenti forniti dal produttore. Ad esempio, i materiali utilizzati per il prelievo dei campioni, come i tamponi, possono essere già contaminati in fabbrica. Un caso emblematico è quello del "**Fantasma di Heilbronn**", in cui i bastoncini utilizzati per raccogliere tracce di DNA sulle scene del crimine erano contaminati dal DNA di un'operatrice del reparto confezionamento dell'azienda produttrice, ostacolando per anni le indagini forensi con tracce false (<https://www.faz.net/aktuell/gesellschaft/kriminalitaet/dna-ermittlungspanne-das-phantom-von-heilbronn-ist-widerlegt-1925411.html>).

Nel caso della diagnostica SARS-CoV-2, già a giugno 2020 è stato pubblicato un problema di contaminazione dovuto a **primer per PCR contaminati in fabbrica con controlli positivi** (Wernike et al., DOI: 10.1111/tbed.13684). È stato osservato che anche campioni di acqua pura, analizzati con diverse serie di primer, risultavano **positivi per SARS-CoV-2** nella RT-qPCR. Nel testo originale si legge:

„Es gab jedoch auch Primer/Sonden-Sets, die sehr geringe Verunreinigungen aufwiesen, die erst bei der gründlichen internen Validierung entdeckt wurden.“  
(Traduzione: **"Tuttavia, c'erano anche set di primer/sonde che presentavano contaminazioni a livelli molto bassi, rilevate solo durante una validazione interna approfondita"**).

Anche alcuni **risultati falsi positivi riportati dalla stampa nell'estate del 2020** per la diagnostica SARS-CoV-2 sono stati attribuiti a problemi nei materiali. Ad esempio, il caso di un laboratorio di Augsburg è stato associato a problemi con i reagenti utilizzati (<http://web.archive.org/web/20210111010037/https://www.br.de/nachrichten/bayern/probleme-in-augsburger-labor-bringen-falsche-testergebnisse,SEh5Qq4>).

### 3.7.3. Valutazione intermedia

Anche con un design ideale della RT-qPCR e una buona pratica di laboratorio con validazioni adeguate, problemi nei processi quotidiani e contaminazioni esterne, come quelle provenienti da campioni contaminati in fabbrica, possono influire significativamente sulla qualità dei risultati della RT-qPCR e portare a falsi positivi.

### 3.8. Kit PCR commerciali

Fin dall'inizio, i sistemi di test PCR commerciali, noti come "tamponi", sono stati utilizzati nei laboratori diagnostici di routine, **anche se gran parte di essi era dichiarata solo per uso di ricerca** ("research use only", RUO).

Da sottolineare è il primo e probabilmente più rilevante produttore di test, la società berlinese **TIB Molbiol**, il cui proprietario (Olfert Landt) è stato indicato come coautore delle raccomandazioni del protocollo OMS insieme a Christian Drosten. I kit basati sulle raccomandazioni OMS vengono distribuiti tramite Roche e utilizzati nei loro grandi automatismi "Cobas". Questi kit costituiscono, insieme a quelli di altri produttori (vedi lista dei produttori:

<https://www.vdgh.de/covid-19/sars-cov-2-und-die-industrie/hersteller/artikel16741>), la maggior parte dei test utilizzati nella diagnostica di routine in Germania. Curiosamente, molti produttori indicano l'**E-Gen** come obiettivo principale per il rilevamento, seguendo strettamente le raccomandazioni iniziali dell'OMS.

Secondo un servizio televisivo del **10 aprile 2021** (Standort Berlin - Millionen Corona Test kommen aus Berlin - tv.berlin (tvb.de)), in un'intervista con Constanze e Olfert Landt, dirigenti

di TIB Molbiol, è stato dichiarato che il test PCR per il rilevamento del genoma di SARS-CoV-2 è stato sviluppato da Olfert Landt (informazione fornita nei primi cinque minuti). L'origine dei primi test commerciali e del protocollo OMS solleva alcune **domande sul corretto ordine temporale** e sui diritti d'autore, come discusso in un articolo del luglio 2023 (Dank PCR-Test: Drosten macht Immobilien-Millionär noch reicher | NIUS.de):

*"L'azienda di Landt è la prima a produrre kit di test PCR per il virus Sars2. La distribuzione è iniziata già il 10 gennaio 2020, nonostante la sequenza del virus sia stata depositata nella banca dati ufficiale delle sequenze genetiche solo il 13 gennaio"*

*Testo Originale: „Landts Unternehmen ist das erste, das PCR-Testkits für das Sars2-Virus herstellt. Bereits am 10. Januar 2020 startete man mit der Auslieferung. Und das, obwohl die Virus-Sequenz erst am 13. Januar in der offiziellen Genproben-Datenbank landet.“.*

Secondo le dichiarazioni dell'azienda, TIB Molbiol aveva già distribuito **oltre 60 milioni di test a livello globale nel 2020** (<https://www.tib-molbiol.de/de/covid-19>), anche se molti di questi kit erano ancora dichiarati come **"Non testati per uso diagnostico"** (ad esempio, intestazione del documento: [https://www.roche-as.es/lm\\_pdf/MDx\\_53-0777\\_96\\_Wuhan-R-gene\\_V200204\\_09155376001%20%282%29.pdf](https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_53-0777_96_Wuhan-R-gene_V200204_09155376001%20%282%29.pdf)). I foglietti illustrativi e le descrizioni dei kit della TIB Molbiol, originariamente disponibili in formato PDF, risultano essere stati creati il **15 gennaio 2020** (!!!) con un numero SAP Roche, e sono rimasti invariati fino al 6 febbraio 2020, parallelamente ad altri kit che nel frattempo hanno ottenuto l'approvazione per la diagnostica in vitro.

Ad oggi, esiste una vasta gamma di sistemi di rilevamento PCR ([https://www.theglobalfund.org/media/9629/covid19\\_diagnosticproducts\\_list\\_en.pdf](https://www.theglobalfund.org/media/9629/covid19_diagnosticproducts_list_en.pdf)), molti dei quali approvati per la diagnostica in vitro (IVD) di SARS-CoV-2. In un esempio di descrizione di uno di questi kit ([https://www.genesig.com/assets/files/Path\\_COVID\\_19\\_CE\\_STED\\_IFU\\_Issue\\_500.pdf](https://www.genesig.com/assets/files/Path_COVID_19_CE_STED_IFU_Issue_500.pdf)), si legge nella sezione "Intended use" (uso previsto):

*"I risultati positivi indicano la presenza di RNA di SARS-CoV-2. I risultati positivi non escludono una co-infezione con altri batteri o virus. I risultati negativi non escludono un'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per decisioni terapeutiche. I risultati positivi e negativi devono essere combinati con osservazioni cliniche, anamnesi del paziente e informazioni epidemiologiche"*

*Testo Originale: „Positive results are indicative of the presence of SARS-CoV-2 RNA. Positive results do not rule out co-infection with other bacteria or other viruses. Negative results do not preclude SARS-CoV-2 infection and should not be used as the sole basis for patient*

*management decisions. Positive and Negative results must be combined with clinical observations, patient history, and epidemiological information"*

#### **4. Correlazione tra rilevamento positivo di acidi nucleici nella RT-qPCR, malattia e infettività**

Solo le persone effettivamente infette, con virus in grado di replicarsi e di essere rilasciati dalle cellule in quantità "infettive" sufficienti, possono trasmettere il virus, presentare un rischio di malattia e quindi essere rilevanti per la determinazione dell'andamento di un tasso di infezione e di un'onda epidemica.

##### **4.1. Valutazione del Deutsches Ärzteblatt**

"La rilevazione tramite PCR è il test standard per la diagnosi di infezioni virali come SARS-CoV-2. Il test rileva singoli geni del patogeno, ma non patogeni intatti" Inoltre: **"Esiste la possibilità che il test rimanga positivo oltre la durata dell'infezione, poiché possono essere ancora presenti 'frammenti virali' nel naso o nella gola. Una prova certa dell'infettività è possibile solo con test complessi, in cui si verifica in laboratorio se il materiale degli strisci può uccidere cellule vive"**

Testo Originale: „Der PCR-Nachweis ist die Standarduntersuchung zur Diagnose von Virusinfektionen wie SARS-CoV-2. Der Test weist einzelne Erregergene, jedoch keine intakten Erreger nach.“ „Es besteht die Möglichkeit, dass der Test über die Dauer der Infektion hinaus positiv ausfällt, weil noch ‚Virusstrümmel‘ in Nase oder Rachen vorhanden sind. Ein sicherer Nachweis der Infektiosität ist nur mit aufwendigen Tests möglich, bei denen im Labor untersucht wird, ob das Material aus den Abstrichen lebende Zellen abtöten kann.“

Questa valutazione è stata pubblicata dal **Deutsches Ärzteblatt il 1° febbraio 2021** (<https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/120745>).

##### **4.2. Comunicazione ufficiale del CDC**

Anche il **CDC** segnala, tra gli "svantaggi" dei **NAATs** (test di amplificazione degli acidi nucleici, tra cui la PCR):

„A positive NAAT diagnostic test should not be repeated within 90 days, since people may continue to have detectable RNA after risk of transmission has

passed.“

*(Traduzione: "Un test diagnostico NAAT positivo non dovrebbe essere ripetuto entro 90 giorni, poiché le persone possono continuare ad avere RNA rilevabile dopo che il rischio di trasmissione è passato").*

Questa nota si trova nella tabella riassuntiva in fondo alla pagina:

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#previous>.

#### 4.3. Ufficio Sanitario di Francoforte

*"Il test PCR rileva frammenti genetici di SARS-CoV-2; non fornisce alcuna informazione sul fatto che si tratti di virus infettivi o di residui virali dopo un'infezione passata. Per determinarlo sarebbe necessaria una coltura del patogeno"*

Testo Originale: „Der PCR-Test detektiert Genabschnitte von SARS-CoV-2; er sagt nichts darüber aus, ob es sich um infektiöse Viren oder um Virusreste nach durchgemachter Infektion handelt. Hierzu wäre eine Erregeranzucht erforderlich.“

Questa affermazione è stata riportata in una pubblicazione del responsabile dell'Ufficio Sanitario di Francoforte nell'agosto 2020. ([https://www.laekh.de/fileadmin/user\\_upload/Heftarchiv/Einzelartikel/2020/10\\_2020/Die\\_Covid-19-Pandemie\\_in\\_Frankfurt\\_am\\_Main.pdf](https://www.laekh.de/fileadmin/user_upload/Heftarchiv/Einzelartikel/2020/10_2020/Die_Covid-19-Pandemie_in_Frankfurt_am_Main.pdf))

#### 4.4. Pubblicazione del CDC

In una pubblicazione del **CDC** datata 13 luglio 2020, intitolata „**CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel For Emergency Use Only Instructions for Use**“ (<https://www.fda.gov/media/134922/download>), si trova a pagina 38, sotto il titolo „**Limitations**“ (ancora visibile a pagina 37):

*“Detection of viral RNA may not indicate the presence of infectious virus or that 2019-nCoV is the causative agent for clinical symptoms.”*

*(Traduzione: "Il rilevamento dell'RNA virale potrebbe non indicare la presenza di un virus infettivo o che il 2019-nCoV sia l'agente causale dei sintomi clinici").*

#### 4.5. Informazioni della WHO per i laboratori di analisi

Il fatto che un semplice rilevamento dell'mRNA di SARS-CoV-2 non debba necessariamente correlarsi a una malattia e non possa essere utilizzato come unico criterio per valutare lo stato di salute, ma rappresenti solo uno strumento di supporto per confermare una diagnosi clinica, è chiaramente descritto nella comunicazione della WHO „**Notice for IVD Users 2020/05, Nucleic acid testing (NAT) technologies that use polymerase chain reaction (PCR) for detection of SARS-CoV-2**“ del 13 gennaio 2021 (pubblicata il 20 gennaio 2021, disponibile su [WHO](#)):

„Wenn die Testergebnisse nicht mit dem klinischen Bild übereinstimmen, sollte eine neue Probe entnommen und mit der gleichen oder einer anderen NAT-Technologie erneut getestet werden.“  
(Traduzione: **“Quando i risultati del test non corrispondono al quadro clinico, dovrebbe essere prelevato un nuovo campione e sottoposto nuovamente a test utilizzando la stessa o un'altra tecnologia NAT”**).

Inoltre:

„Die meisten PCR-Assays sind als Hilfsmittel für die Diagnose indiziert, daher müssen Gesundheitsdienstleister jedes Ergebnis in Kombination mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme, dem Probentyp, den Assay-Spezifika, klinischen Beobachtungen, der Patientenanamnese, dem bestätigten Status aller Kontakte und epidemiologischen Informationen berücksichtigen.“  
(Traduzione: **“La maggior parte degli esami PCR sono indicati come strumenti di supporto per la diagnosi; pertanto, gli operatori sanitari devono considerare ogni risultato in combinazione con il momento del prelievo del campione, il tipo di campione, le specifiche dell'esame, le osservazioni cliniche, la storia clinica del paziente, lo stato confermato di eventuali contatti e le informazioni epidemiologiche”**).

#### 4.6. Pubblicazione su Lancet

Anche in una [pubblicazione su Lancet](#)

([Link all'articolo](#)) gli autori descrivono il test RT-qPCR come segue:

„Unserer Ansicht nach ist der aktuelle PCR-Test daher nicht der geeignete Goldstandard für die Bewertung eines SARS-CoV-2-Tests für die öffentliche Gesundheit“

*(Traduzione: „A nostro avviso, il test PCR attuale non è quindi il gold standard appropriato per valutare un test per la salute pubblica per SARS-CoV-2”).*

*Secondo gli autori, infatti, la PCR risulta positiva anche quando i testati non sono più contagiosi, poiché l'RNA può persistere nel corpo per settimane o mesi dopo che il sistema immunitario ha combattuto con successo il virus, senza che la persona sia ancora infettiva.*

*„Sobald die Replikation von SARS-CoV-2 durch das Immunsystem unter Kontrolle gebracht wurde, sinken die mittels PCR in den Atemwegssekreten nachweisbaren RNA-Konzentrationen auf sehr niedrige Werte, bei denen es sehr viel unwahrscheinlicher ist, dass die Betroffenen andere infizieren. Die verbleibenden RNA-Kopien können Wochen, gelegentlich auch Monate, benötigen, bis sie verschwunden sind, während dieser Zeit bleibt die PCR positiv.“*  
*(Traduzione: „Una volta che la replicazione di SARS-CoV-2 è stata controllata dal sistema immunitario, i livelli di RNA rilevabili tramite PCR nelle secrezioni respiratorie scendono a valori molto bassi, rendendo molto meno probabile che i soggetti infettino altre persone. **Le copie di RNA rimanenti possono richiedere settimane, o occasionalmente mesi, per essere eliminate, periodo durante il quale la PCR rimane positiva”).***

## 4.7. Dichiarazioni di Christian Drosten

### 4.7.1 Perizia di Drosten per il Tribunale

ella sua perizia di aprile 2021 per un tribunale a Heidelberg (versione anonima disponibile qui: [Link al documento](#)), l'esperto C. Drosten conferma che un test RT-PCR può risultare positivo anche quando **«almeno il tratto da rilevare del genoma del virus è presente nel campione testato»**. Ciò significa che anche frammenti genetici, senza che derivino da un virus intatto e replicabile, possono già produrre risultati positivi nel test PCR, suggerendo erroneamente la presenza del virus in campioni non infettivi.

### 4.7.2. NDR Podcast 94

Nel suo NDR Podcast 94 del 22 giugno 2021 ([Link al documento](#)), a pagina 16, C. Drosten discute il legame tra il valore Ct e l'infettività come segue:

*„...dass ein Fall, nur weil der Patient in diesem Moment einen hohen Ct-Wert hat, also weil er vielleicht nicht infektiös ist jetzt im Moment, also der hat wenig Virus, der hat Virus, aber der hat wenig Virus,...“*  
*(Traduzione: „...che un caso, solo perché il paziente in quel momento ha un*

***valore Ct alto, quindi forse non è infettivo in quel momento, cioè ha poco virus, ha virus, ma ne ha poco,...***").

#### 4.7.3. Pubblicazione su *Science*

In una pubblicazione su *Science* guidata da C. Drosten, datata maggio 2021 ([DOI: 10.1126/science.abc5273](https://doi.org/10.1126/science.abc5273)), in cui viene studiata l'infettività di SARS-CoV-2, gli autori definiscono già nella prima frase dell'abstract i parametri per quantificare e determinare la potenziale trasmissibilità del virus come segue:

„.... sind die Virale Last und ob die Proben ein vermehrungsfähiges Virus Isolat in Zellkultur enthalten“  
(Traduzione: ***„...sono la carica virale e se i campioni contengono un isolato virale replicabile in coltura cellulare”***).

Nell'introduzione, spiegano che la carica virale viene determinata dalla concentrazione di RNA virale e dalla capacità di isolare con successo il virus in colture cellulari. Inoltre, sottolineano che:

„While viral load and cell culture infectivity cannot be translated directly to in vivo infectiousness, and the impact of social context and behavior on transmission is very high, these quantifiable parameters can generally be expected to be those most closely associated with transmission likelihood“.  
(Traduzione: ***„Mentre la carica virale e l'infettività in coltura cellulare non possono essere tradotte direttamente nell'infettività in vivo, e l'influenza del contesto sociale e del comportamento sulla trasmissione è molto elevata, questi parametri quantificabili possono generalmente essere considerati quelli più strettamente associati alla probabilità di trasmissione”***).

## 5. Dichiarazioni sulla diagnostica PCR dai protocolli del RKI

I protocolli ufficiali delle riunioni del gruppo di crisi "Nuovo Coronavirus (COVID-19)", con riferimento pratico **4.06.02/0024#014** e aggiornati al **30 maggio 2024**, sono stati ufficialmente resi disponibili dal RKI. Questi documenti possono essere consultati e scaricati direttamente dal sito ufficiale del RKI al seguente link:

**RKI - COVID-19-Pandemie - Interne COVID-19-Krisenstabsprotokolle des Robert Koch-Instituts** <https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/C/COVID-19-Pandemie/COVID-19-Krisenstabsprotokolle.html>

Qui si trovano anche alcune dichiarazioni decisive sulla diagnostica PCR, che verranno citate di seguito in ordine cronologico:

| <b>Data</b> | <b>Punto del Protocollo</b> | <b>Citazione diretta dai protocolli rilasciati</b>  | <b>Osservazioni</b>  |
|-------------|-----------------------------|---|--|
| 14/01/2020  | 3                           | "(Omissis) (FG17) ha contattato (omissis) (Charité). Basandosi sulla conversazione, FG17 ha ordinato primer per la diagnostica del nuovo CoV. ZBS1 sta valutando di ordinare anche primer."   | Si presume che il contatto oscurato con Charité si riferisca a Prof. C. Drosten.   |
| 16/01/2020  | 3                           | "Il RKI ha già a disposizione i primer necessari per la diagnostica PCR del nuovo CoV. Si prevede l'arrivo di un campione positivo il 17/01/2020. Il test PCR è stato sviluppato da (omissis)."   | Anche qui il nome oscurato probabilmente corrisponde a C. Drosten, dato che il protocollo PCR è stato inviato alla WHO il 13/01 da V. Corman e C. Drosten. |
| 20/01/2020  | 5                           | "La virologia della Charité/(omissis) è principalmente responsabile per la diagnostica di laboratorio per MERS e ora anche per nCoV. Lo sviluppo del test PCR è più semplice per SARS e 2019-nCoV, poiché i due virus sono molto simili." | Drosten, che aveva sviluppato la diagnostica per MERS, è probabilmente dietro il nome oscurato.  |
| 24/01/2020  | 3                           | "Trasmissione uomo-uomo da portatori asintomatici con alti CT; i laboratori sono stati invitati a condividere; CT tra 20-30; WHO  | Prima discussione documentata sulla problematica dei CT alti e dei risultati positivi in asintomatici.   |

|            |   |  |   |
|------------|---|--|---|
|            |   | fornisce gli assay; l'università di Berna sintetizza il genoma."   |   |
| 27/01/2020 | 5 | "Diagnostica INV; i campioni sospetti dovrebbero essere testati anche per altri patogeni respiratori."   | Valutazione corretta che i sintomi possono essere causati da vari patogeni respiratori. |
| 03/02/2020 | 2 | "Un risultato PCR positivo dopo la guarigione non implica necessariamente infettività."  | Documentato già a inizio febbraio 2020, anche se limitato ai casi post-guarigione.      |
|            | 5 | "La qualità della PCR non può ancora essere sufficientemente valutata. ZBS 1 attende isolati da Monaco e Giappone per ulteriori indagini."   | Discussione corretta sulla qualità e affidabilità della PCR.                            |
| 04/02/2020 | 5 | "Una distinzione tra nCoV e SARS è possibile con la PCR."  |   |
| 05/02/2020 | 5 | "Il rilevamento virale mediante PCR dipende dal materiale utilizzato. Se la PCR è negativa, non sono necessarie ulteriori indagini, ma nCoV può essere rilevato a lungo (fino a 38 giorni)." |   |
| 10/02/2020 | 6 | "Un fornitore belga ha problemi di contaminazione con un controllo positivo, per ora si utilizza il fornitore di Berlino."   | Primo caso documentato di contaminazione dei prodotti PCR, probabilmente dovuto         |

|            |   |  |  |
|------------|---|--|--|
|            |   |  | ai primer contaminati (vedi punto 3.7.2).  |
| 11/02/2020 | 4 | "Analisi indicano la possibilità di una PCR quantificata (invece di due test negativi consecutivi) per dimettere i pazienti a un determinato cut-off (sotto $10^4$ /ml)."  | Prima discussione documentata sulla quantificazione della carica virale.                               |
| 13/02/2020 |   | "...dopo (omissis) presumibilmente non c'è più infettività se in coltura cellulare non si osserva replicazione virale oltre $10^6$ /ml; per sicurezza, si propone $10^5$ /ml come criterio di dimissione sufficiente." | Rilevanza della coltura cellulare per valutare l'infettività, con un cut-off definito per il test PCR. |

|            |   |   |  |
|------------|---|---|--|
| 20/02/2020 | 1 | "Incertezza su possibile falso positivo di una passeggera della crociera in Malesia (2 test positivi, donna forse positiva sulla nave); qualità dei test non nota; dubbi sull'esposizione dei passeggeri della Westerdam."                          | Discussione su casi di test falsi positivi già documentati, in netto contrasto con le successive narrative pubbliche.        |
|            | 6 | "PCR-Test: sensibilità? Specificità? Cross-validazione? Ci sono molti tipi diversi di PCR (vedi sito WHO), RKI utilizza assay (omission) e propri assay; ring trial della WHO non ancora pianificato."  | Si documentano interrogativi sulla qualità e validazione incrociata della PCR.   |
| 21/02/2020 | 6 | "I nomi delle aziende con problemi di contaminazione noti non sono pubblici. Le aziende comunicheranno direttamente con i laboratori tedeschi."   | Chiaramente diversi fornitori di kit PCR avevano problemi di contaminazione, ma le informazioni non venivano rese pubbliche. |
| 28/02/2020 | 6 | "Ricevute 40 campioni dall'AGI Sentinel, cattiva esperienza con primer contaminati; riserve di primer buoni per 4 settimane, ordini successivi in corso."   | Continuano le segnalazioni di problemi di contaminazione nei primer PCR.   |
| 02/03/2020 | 6 | "Contaminazione: due aziende interessate. Nuovi lotti sono in ordine. Il RKI è stato informato tramite EVD-LabNet. Rispetto agli assay interni del RKI, i kit commerciali funzionano bene. La maggior parte dei laboratori usa però assay interni." | Conferma che molti laboratori utilizzavano assay sviluppati internamente, riducendo la comparabilità dei risultati.          |

|            |   |  |   |
|------------|---|--|---|
| 03/03/2020 | 6 | "Contaminazione: problemi con fornitori di primer (controlli colpiti), almeno 3 aziende coinvolte. Non è divulgato pubblicamente quali aziende. Le aziende devono informare i clienti. Non è compito del RKI." | Nonostante il RKI fosse consapevole delle contaminazioni, lasciava la responsabilità della comunicazione ai fornitori.      |
| 06/03/2020 | 6 | "Rapporto tra virus replicanti e RNA genomico nelle provette da indagare. Dai dati ARS: su 500 campioni testati in diagnostica di routine, 8 erano positivi."  | Distinzione tra RNA genomico rilevato tramite PCR e virus realmente replicanti.   |
| 11/03/2020 | 6 | "Non ancora chiaro se il problema di contaminazione sia stato risolto, poiché non ci sono state ulteriori forniture."  | La problematica di contaminazione resta irrisolta.  |
| 24/03/2020 | 8 | "Campioni con CT molto alti, RNA presente, ma non più infettivi in coltura cellulare."   | Si riconosce il limite del CT come indicatore di RNA non infettivo.   |
| 09/04/2020 | 7 | "Decisione: la PCR rimane il gold standard e unico criterio per la diagnostica dell'infezione. È necessario pubblicare una dichiarazione sul sito web."  | La PCR viene istituzionalizzata come "gold standard" tramite decisione, non sulla base di evidenze scientifiche definitive. |
| 16/04/2020 | 7 | "Ancora problemi di contaminazione presso un'azienda."   | Continuano i problemi di contaminazione con i materiali per la PCR.   |

|            |   |   |  |
|------------|---|---|--|
| 17/04/2020 | 4 | "I criteri di dimissione indicano che un risultato PCR positivo in una persona guarita non implica necessariamente infettività. In questi casi è sempre necessaria una coltura virale." | Conferma che una PCR positiva non equivale a infettività, se non supportata da coltura cellulare.            |
| 29/04/2020 | 7 | "Elevata percentuale di risultati PCR falsi positivi. Nella valutazione intermedia di INSTAND, si osserva una percentuale relativamente alta di risultati falsi positivi."              | Si conferma l'esistenza di risultati falsi positivi nei test PCR, contribuendo a gonfiare i dati dei "casi". |

|            |   |  |  |
|------------|---|--|--|
| 06/05/2020 | 1 | "RNA frammenti possono essere rilevati fino a 2 mesi dopo, ma con test in coltura non si trovano virus vivi in questi pazienti. La PCR per il monitoraggio dell'andamento non è adatta." | Si evidenzia che la PCR non è adatta per monitorare l'infettività o l'andamento della malattia, distinguendo tra RNA rilevabile e virus infettivi. |
|            | 1 | "I CT dipendono dal test e non possono essere facilmente interpretati come infettivi o meno. CT > 25 non equivale automaticamente a non infettivo."                                      | Si conferma che il valore del CT è test-dipendente e non può essere universalmente associato a infettività o non infettività.                      |
| 05/06/2020 | 1 | "Anche con un doppio test PCR, i risultati non sono sufficientemente affidabili. Non è possibile una dichiarazione certa su risultati falsi positivi o falsi negativi."                  | Riguarda la difficoltà di ottenere risultati affidabili dai test PCR, anche con doppia verifica.   |

|            |    |   |   |
|------------|----|---|---|
| 15/06/2020 | 9  | "I campioni sono stati analizzati con PCR e coltura cellulare. Si è osservato che (tranne per un caso isolato sotto immunosoppressione) dopo >7 giorni dall'inizio dei sintomi, in coltura non cresceva più nulla. Un cut-off è stato fissato a CT 30." | Conferma empirica che CT > 30 corrisponde a non infettività in coltura cellulare; un caso con CT 29 era un'eccezione.                                       |
| 17/06/2020 | 4  | "Un articolo nell'attuale Ärzteblatt discute l'interpretazione dei risultati PCR su SARS-CoV-2, enfatizzando l'importanza della probabilità pre-test."  | L'importanza della probabilità pre-test per evitare interpretazioni errate dei risultati viene enfatizzata, come discusso in precedenza nei punti 3.4.      |
|            | 13 | "Sono disponibili quasi 2 milioni di risultati PCR. Non è possibile correlare con i dati clinici."  | Conferma che molti test PCR vengono eseguiti senza riferimento al quadro clinico, sollevando interrogativi sulla loro utilità per la gestione dei pazienti. |
| 19/06/2020 | 8  | "È necessario utilizzare il valore CT e, se possibile, i risultati della coltura (assenza di sintomi?) per supportare le decisioni."  | Si ribadisce che il CT e i risultati delle colture cellulari sono fondamentali per decisioni informate su infettività e gestione dei pazienti.              |
|            | 8  | "La PCR per SARS-CoV-2 è meno affidabile rispetto ad altri agenti patogeni; la specificità nei ring trials è stata in alcuni casi del 92%, non superiore al 98%."   | Valutazione critica della PCR, ritenuta meno affidabile rispetto ad altri metodi diagnostici per patogeni diversi da SARS-CoV-2.                            |

|            |   |   |   |
|------------|---|---|---|
| 14/08/2020 | 2 | "Nota dal Lagezentrum BMG: il riferimento all'ISO è stato consapevolmente rimosso, qualsiasi test PCR nella lista del RKI deve essere accettato." | La rimozione del riferimento all'ISO implica una diminuzione degli standard di certificazione per i test PCR accettati. |
|------------|---|---|---|

I verbali delle riunioni del primo semestre del Comitato di Crisi del RKI dimostrano che, già all'inizio, i seguenti punti evidenziati nel presente parere erano noti e discussi correttamente a livello tecnico:

- **Punti 2.1 e 4:** La PCR non dimostra l'infettività, ma rileva solo frammenti genomici dell'RNA virale senza alcuna correlazione clinica.
- **Punto 3.7:** I materiali per PCR presentano problemi di contaminazione, che possono portare a risultati falsi positivi, oltre a problemi nei processi operativi dei laboratori, con conseguenti falsi positivi.

Questi aspetti erano conosciuti e trattati nei comitati tecnici, ma senza che ne venissero tratte le dovute conseguenze per informare adeguatamente il pubblico o per opporsi ai test di massa, in particolare su soggetti "asintomatici". Ciò nonostante, in diverse dichiarazioni era stato sottolineato che il test su persone sane non era ritenuto sensato:

- *"Procedura standard in Germania: il test su persone asintomatiche non è sensato e spreca risorse."* (Verbale dell'11.02.2020)
- *"Proposta per un messaggio chiaro per la conferenza stampa di domani: nessun test su persone asintomatiche."* (Verbale del 10.03.2020).

Inoltre, è stato documentato che, almeno nel primo semestre del 2020, i test erano in gran parte non validati e non sottoposti a controlli adeguati.

## 6. Conclusione e Sintesi

### Sulla validità dei test PCR (PCR, RT-PCR o RT-qPCR) per rilevare l'infettività del coronavirus SARS-CoV-2

1. Alla luce dei problemi e delle limitazioni tecniche presentate in questo documento, la PCR in tutte le sue varianti (PCR, RT-PCR o RT-qPCR) è idonea esclusivamente per rilevare frammenti genomici e non rappresenta uno strumento diagnostico affidabile (o autorizzato) per identificare virus SARS-CoV-2 integri, infettivi (e quindi replicabili).
2. Questa tecnica molecolare non può in alcun modo essere utilizzata come prova dell'infettività di una persona, poiché ciò richiederebbe che siano presenti e rilasciati agenti patogeni integri (infettivi) in quantità sufficiente.
3. Inoltre, il risultato di un test PCR rappresenta un semplice dato di laboratorio che, considerati gli aspetti discussi, può essere utilizzato per valutare una possibile infezione virale solo se integrato con una diagnosi clinica dei sintomi (eseguita da operatori sanitari, in Germania da medici).

### Sintesi

La PCR può essere uno strumento diagnostico utile per confermare una diagnosi sospetta o differenziale, **MA**:

**L'utilizzo della PCR (in qualsiasi forma: RT-PCR, RT-qPCR) per testare persone asintomatiche o anche sintomatiche attraverso tamponi naso-faringei, come avviene in modo massivo, non critico e prevalentemente eseguito da personale non medico senza (aspetto cruciale: in violazione delle raccomandazioni dell'OMS) un'adeguata raccolta anamnestica e valutazione dei sintomi, non è idoneo a identificare un'infezione, né tantomeno un'infettività da SARS-CoV-2 o da altri virus/patogeni.**

## 7. Allegati

**ALLEGATO 1:** Definizione di "infezione" e "paziente"

**ALLEGATO 2:** Descrizione della PCR dell'Ufficio svizzero per la protezione della popolazione (Laboratorio Spiez)

**ALLEGATO 3:** Rappresentazione grafica dei valori CT in rapporto al numero di genomi di partenza, utilizzando come esempio il kit di test Viasure

**ALLEGATO 4:** Revisione autorevole sui vari metodi diagnostici di Isabella Eckerle, pubblicata su *Nature Reviews Microbiology* il 02/12/2022, con evidenziazioni in giallo

**ALLEGATO 5:** Lettera di ritrattazione pubblicata su *Science*

**ALLEGATO 6:** Ministero della Salute australiano