



## **Gli strumenti diagnostici nella strategia di sorveglianza epidemiologica di COVID-19**

Maurizio Ferri

*Coordinatore scientifico SIMeVeP*

La gestione dei focolai COVID-19 nell'Unione Europea, almeno nella fase iniziale della pandemia, si è caratterizzata per la mancanza di uniformità di strategie e metodi di sorveglianza ed interventi non farmaceutici (es. misure di contenimento, quarantena e distanziamento sociale) diversi tra i paesi membri, con evidenti ripercussioni sulle libertà personali e sui diritti alla libera circolazione dei cittadini comunitari. Hanno sicuramente pesato sulla risposta non coordinata e frammentaria [1] all'emergenza pandemica i diversi contesti epidemiologici, l'assenza di un sistema concordato di flussi per la raccolta, elaborazione e comunicazione dei dati, ma soprattutto la specificità dei sistemi sanitari nazionali su cui l'UE non può fare molto, ed il cui ordinamento lascia agli Stati membri piena libertà nella organizzazione e gestione della sanità pubblica. Per ovviare a questi limiti intrinseci dell'Unione, la Commissione e il Consiglio dell'UE, su richiesta dei membri del Consiglio europeo, si accordano per l'elaborazione del *Joint European Roadmap*, una nuova tabella di marcia europea per l'eliminazione graduale delle misure di contenimento e definizione di una strategia di uscita il più possibile coordinata con gli Stati membri.[2] Inoltre, sul terreno della diagnostica per l'infezione COVID-19, le raccomandazioni della Commissione europea sui criteri di utilizzo dei test,[3] inclusi quelli rapidi, [4] ed i documenti tecnici dell'ECDC sia sull'utilizzo dei test per casi sintomatici e asintomatici in rapporto ai diversi contesti epidemiologici nazionali, [5] che le opzioni per l'uso di test rapidi antigenici per COVID-19, [6] pongono le basi per lo sviluppo di standard uniformi e per un approccio coordinato all'adozione di misure di restrizione della libera circolazione per motivi di salute pubblica.

### **Sorveglianza epidemiologica umana e veterinaria a confronto**

La storia e l'esperienza e hanno dimostrato come l'epidemiologia e la sorveglianza delle malattie infettive si declinano con lo stesso linguaggio sia che si tratti di medicina umana o veterinaria. L'obiettivo comune ad entrambi i sistemi di sorveglianza è la riduzione della circolazione virale e della trasmissione dell'infezione. Permangono tuttavia differenze di approccio. In medicina umana il trattamento del singolo paziente è centrale nel sistema sanitario, mentre le misure

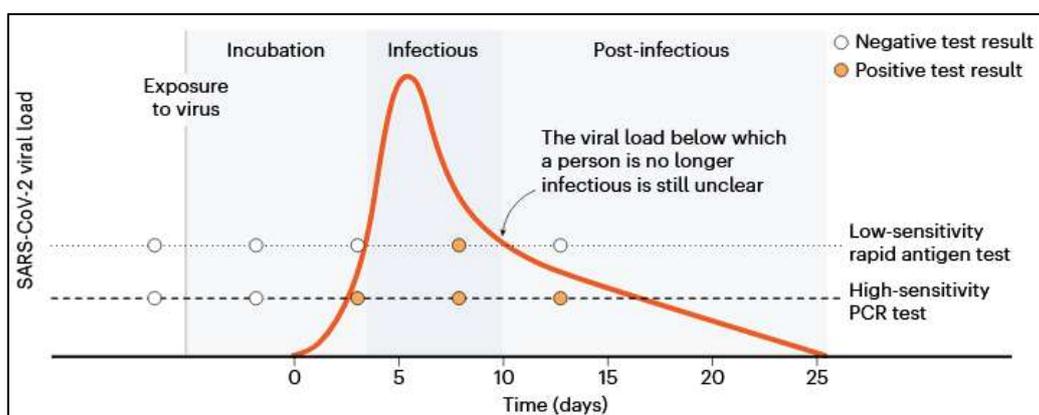
incentrate a livello di popolazione sono più rare. Diversamente in medicina veterinaria, a causa delle serie conseguenze economiche e commerciali dei focolai infettivi, le misure sono rivolte all'intera popolazione animale. Difatti, in caso di focolaio epidemico di infezione contagiosa, per conoscere la natura e la dinamica dell'infezione possono venir svolte sia indagini di tracciamento (es. per capire l'origine degli animali infetti), sia indagini a "random" (es. test sierologici) su campioni (n. di animali) rappresentativi della popolazione, impiegando specifiche modalità di campionamento e includendo anche soggetti asintomatici ai fini della valutazione dell'esposizione a livello di popolazione. L'approccio di sorveglianza scelto, dipende quindi dalla fase dell'epidemia e dall'uso finale delle informazioni raccolte. In genere, a inizio epidemia, l'obiettivo principale è il tracciamento di tutti i casi, per tentare una eradicazione precoce. In una seconda fase invece, se l'agente patogeno si è già diffuso nella popolazione locale in un'ampia percentuale (prevalenza) di soggetti, i target principali sono due: separare le zone infette da quelle indenni ("free", libere) così da limitare i movimenti tra le due popolazioni e stimare la prevalenza (reale o vera) dell'infezione nelle prime. Questi concetti debitamente traslati in medicina umana, hanno portato alla elaborazione di un protocollo veterinario di base per l'impostazione della sorveglianza attiva casuale (a random) nella gestione di SARS-CoV-2 a livello di popolazione umana, partendo proprio dall'esperienza veterinaria nella sorveglianza attiva e passiva e nell'analisi dei rischi delle malattie infettive degli animali. [7] Un contributo che, in linea con un approccio *One Health*, potrebbe integrare le conoscenze e le strategie di sanità pubblica per il controllo delle epidemie infettive umane. Ma centrale nei programmi di sorveglianza sia delle infezioni umane che animali è la scelta della metodica diagnostica con le sue caratteristiche di sensibilità e specificità. Pur considerando la citata differenza sostanziale di approccio per la sorveglianza umana ed animale, si possono comunque fare parallelismi tra i test applicati al singolo individuo con i livelli di sensibilità e specificità, e il sistema di sorveglianza inteso come test applicato a un'intera popolazione animale, come entità unica. Ma vediamo quali sono gli strumenti diagnostici oggi disponibili all'interno dei programmi di sorveglianza per COVID-19 e come la loro scelta dipenda dal contesto epidemiologico ed accuratezza degli stessi.

### **Test rapidi o molecolari?**

I test diagnostici (es. antigenico rapido o molecolare) costituiscono uno degli strumenti chiave per la gestione dei focolai infettivi epidemici anche e soprattutto in chiave preventiva. E' utile qui ricordare che la performance di un test diagnostico si valuta in base a due caratteristiche fondamentali: la *sensibilità* e la *specificità*. La sensibilità rappresenta la probabilità che un soggetto realmente infetto venga correttamente classificato come positivo dal test, mentre la specificità rappresenta la probabilità che un soggetto realmente non infetto venga correttamente

classificato come negativo dal test. In genere, quando si aumenta la sensibilità di un test se ne riduce la specificità. Perciò è difficile (se non impossibile) avere test perfetti con sensibilità e specificità entrambe uguali al 100%. Quindi se un test ha una sensibilità = 95% e una specificità = 98%, vorrebbe dire che se l'individuo campionato è infetto nella realtà, il test ha il 95% di probabilità di classificarlo correttamente come positivo e il rimanente 5% di probabilità di classificarlo erroneamente come negativo (falso negativo). Per contro, qualora l'individuo campionato non fosse infetto nella realtà, allora il test avrebbe il 98% di probabilità di classificarlo correttamente come negativo e il rimanente 2% di probabilità di classificarlo erroneamente come positivo (falso positivo).

Per la scelta dei test per la diagnosi di COVID-19 (tralasciando i test sierologici basati sulla ricerca di anticorpi e dunque spie di eventuale immunità naturale o vaccinale) con le proprie caratteristiche di sensibilità e specificità, è d'obbligo fare riferimento sia alla fase epidemica (popolazione) sia alla cinetica della carica virale nel corso dell'infezione (individuo). Nella cosiddetta traiettoria del processo infettivo, come si vede nel grafico, vi sono quattro stati di transizione (o fasi) generali d'infezione, che vengono considerati sia quando si validano i test diagnostici sia quando si settano e valutano i sistemi di sorveglianza. Questi sono la fase di esposizione al virus, il periodo di incubazione (il lasso di tempo, circa 5-6 giorni per COVID-19 intercorrente tra l'esposizione all'agente patogeno e l'apparizione dei sintomi), la fase infettante/replicativa e la fase immunitaria. All'inizio il virus (curva rossa) comincia a replicare per raggiungere cariche massime al quinto/sesto giorno, per poi scendere nella fase infettiva e immunitaria o post-infettiva fino a circa 20-25 giorni successivi. In queste fasi si incrociano i livelli di sensibilità dei test molecolari ed antigenici.



Fonte: Giorgia Guglielmi, *Rapid coronavirus tests: a guide for the perplexed*, <https://www.nature.com/articles/d41586-021-00332-4>.

## Test molecolari

Il test molecolare RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), attualmente ritenuto il *gold standard* sia a livello nazionale che internazionale per la diagnosi di COVID-19, in termini di sensibilità e specificità, cerca sequenze genetiche specifiche del virus in un campione prelevato da naso, gola o saliva e crea più copie del materiale genetico. Questa metodica diagnostica dunque attraverso il processo di amplificazione permette di rilevare la presenza del genoma virale oltre che in soggetti sintomatici anche in quelli con bassa carica virale, pre-sintomatici o asintomatici.

La quantità di frammenti genici è determinata di routine in modo semi-quantitativo attraverso il valore soglia del ciclo o *threshold cycles* (Ct), che corrisponde al numero di cicli di amplificazione necessari per ottenere risultati positivi. E' un test molto sensibile in quanto può rilevare minime quantità di materiale genetico virale, e dunque può dare una positività anche in un soggetto che non è più contagioso o infettivo. Il valore Ct aumenta con la diminuzione della carica virale, pertanto un valore basso indica una carica virale elevata. Se da un parte il valore Ct può predire la durata, la gravità o il decesso per COVID-19, dall'altra tale utilità clinica è dibattuta poiché il valore Ct può variare a seconda dei diversi protocolli RT-PCR. Ciò in quanto i sistemi molecolari operano con diversa calibrazione e dunque i risultati sono difficilmente confrontabili tra i laboratori. Ad esempio il problema della calibrazione può spiegare i risultati ottenuti in un trial con il test Innova condotto su migliaia di persone a Liverpool, nel Regno Unito, che ha identificato solo due terzi dei casi con livelli di Ct inferiori a 25, lasciando un terzo dei casi con basse cariche virali e probabilmente ancora in grado di infettare.[8] In effetti un valore Ct troppo alto correlato ad una bassissima quantità di materiale genetico SARS-CoV-2 nel campione, potrebbe essere privo di significato clinico. Questo dato è confortato dai risultati di un lavoro di revisione di diversi studi che ha dimostrato come il virus SARS-CoV-2 di solito non sia più coltivabile con un valore Ct > 30-33. [9] Attualmente il Ct non viene fissato dalle autorità sanitarie ma dai produttori dei test con valori che variano da 37 a 40, limiti elevati solitamente associati a pochi frammenti di virus, e che potrebbero produrre una sovrastima dei casi positivi. Si capisce come giocando con i limiti di Ct le percentuali di positività variano sensibilmente: se si sceglie un Ct troppo basso o troppo alto c'è il rischio di avere rispettivamente false negatività (ridotta sensibilità) o false positività (aumentata sensibilità). L'alternativa potrebbe consistere nel ri-testare i soggetti con un valore Ct elevato. E comunque anche in presenza di alte cariche e dunque con Ct uguale o inferiore a 25, non è ancora definito il livello chiave che consenta di discriminare una situazione di contagiosità da non contagiosità. Ci sono poi svantaggi per l'uso di massa legati ai tempi di refertazione (ci vogliono almeno 24 ore prima di avere in mano un referto), disponibilità di personale qualificato e costose apparecchiature di laboratorio. Ulteriori svantaggi più di natura

tecniche che hanno alimentato contestazioni sulla validità scientifica dei test PCR, [10] riguardano i seguenti aspetti:

- il test PCR non rileva l'intero virus infettivo ma frammenti genetici unici. In sostanza il rilevamento di materiale virale mediante PCR non indica che il virus sia completamente intatto ed infettivo, ovvero in grado di causare infezioni. L'infettività può essere confermata solo attraverso l'isolamento del virus da individui positivi su colture cellulari in laboratori con strutture di contenimento specializzate. Uno studio recente ha dimostrato che il virus non è più coltivabile da 8 a 10 giorni dopo l'inizio della malattia nonostante la positività al test molecolare [11]:
- non esiste un test definitivo *gold standard* cui comparare i test RT-PCR.

In termini di strategia per il controllo dei focolai, e per la riduzione di  $R_0$  (ovvero il numero di riproduzione di base che rappresenta il numero medio di infezioni secondarie prodotte da ciascun individuo infetto), il test molecolare, in virtù degli aspetti sopracitati, andrebbe utilizzato nelle fasi iniziali con bassi tassi di infezione e dunque ridotta prevalenza per supportare il rintraccio, test ed isolamento dei contatti. Mano a mano che la prevalenza aumenta a causa della massiva circolazione virale nella fase avanzata del focolai, ritorna utile l'impiego ripetuto su larghe fasce di popolazione (screening di massa) del test rapido, meno sensibile ma anche meno costoso e con evidenti vantaggi per la mitigazione dei focolai, come descritto più avanti.

### **Test rapidi**

I test rapidi sono divenuti centrali per le strategie di controllo dei focolai COVID-19 nel Regno Unito e Stati Uniti e sempre più utilizzati nell'Unione Europea per potenziare la capacità diagnostica complessiva, contrastare la ridotta disponibilità dei test molecolari o ovviare ai tempi eccessivi di refertazione con impatto negativo sulla loro utilità clinica.

A partire dall'11 novembre 2020, sono stati registrati sulla piattaforma online FIND (*Foundation for Innovative New Diagnostic*) una iniziativa del WHO, 56 test antigenici con marchio CE. [12] In dati sono in continuo aggiornamento relativamente ai saggi per SARS-CoV-2 disponibili sin dalle prime fasi di sviluppo fino alla piena approvazione normativa.

Il 18 Febbraio 2021, il Comitato per la sicurezza sanitaria dell'UE (*EU Health Security Committee*) concorda un elenco comune di test antigenici rapidi COVID-19, ai fini del riconoscimento reciproco dei risultati da parte degli Stati membri e standardizzazione dei dati da includere nei certificati di refertazione. [13]

I test rapidi sono definiti anche 'antigenici' in quanto, utilizzando le stesse matrici e modalità di raccolta di quelli molecolari (tamponi oro-faringei e salivari), sono in grado di rilevare solo le proteine specifiche, denominate collettivamente antigeni di superficie del virus. Diversamente

dal test molecolare, non amplificano ciò che è nel campione e rilevano il virus solo se è presente con cariche elevate (es. centinaia di migliaia o milioni di copie virali per millilitro di campione) tipiche delle fasi iniziali pre-sintomatiche e sintomatiche precoci, fino a cinque giorni successivi all'insorgenza dei sintomi. Pertanto hanno una sensibilità inferiore ma possono ritornare utili per identificare i casi più contagiosi, che presentano cariche virali elevate e con un valore Ct <25 al RT-PCR. Sono disponibili diversi tipi di test antigenico, dai saggi immunocromatografici *lateral flow* (prima generazione) ai test a immunofluorescente (seconda generazione) con migliori prestazioni. Recentemente sono stati messi a punto test rapidi a immunofluorescenza con lettura in microfluidica (terza generazione) che sebbene abbiano una sensibilità circa dieci volte inferiore rispetto a quella dei test molecolari, sono almeno cento volte più sensibili dei test antigenici rapidi. Sono in grado di rilevare qualitativamente la proteina nucleo-capside di SARS-CoV-2 e sembrano mostrare risultati sovrapponibili ai saggi di RT-PCR, specie se utilizzati entro la prima settimana di infezione.

Nei casi in cui i saggi antigenici rapidi di ultima generazione o i test molecolari in RT-PCR non siano disponibile, o i tempi di risposta siano eccessivi, precludendone l'utilità clinica e/o di salute pubblica, l'OMS raccomanda i test rapidi che soddisfino i requisiti minimi di prestazione di sensibilità  $\geq 80\%$  e specificità  $\geq 97\%$  (entro 5 gg dall'inizio dei i sintomi o 7 giorni dall'esposizione), mentre l'ECDC suggerisce, soprattutto in situazioni di bassa prevalenza di SARS-CoV-2/COVID-19 di utilizzare test con prestazioni più vicine alla RT-PCR, ovvero sensibilità  $\geq 90\%$  e specificità  $\geq 97\%$ . Solitamente la sensibilità dei test rapidi disponibili in commercio tende ad essere simile in presenza di cariche virali elevate, e molto diversa con cariche elevate.[14] Purtroppo al momento le specifiche tecniche fissate da ciascuna azienda produttrice non sono oggetto di valutazione indipendente, e dunque la mancanza di protocolli standard di misurazione delle prestazioni e validazione non rende possibile la loro comparazione. Un altro svantaggio è legato al fatto che i dati di sensibilità del test rapido si ricavano principalmente da prove di laboratorio che utilizzano soggetti sintomatici che sappiamo avere alte cariche virali. Se le valutazioni vengono effettuate al di fuori dei laboratori su soggetti con cariche virale inferiori è molto probabile la presenza di performance differenti. E comunque mano a mano che i livelli virali si abbassano, ovvero con l'aumento dei valori Ct del test molecolare, i test rapidi iniziano a non rilevare le infezioni. Per assicurare un livello minimo di performance, la Commissione europea ha invitato gli Stati membri ad elaborare un sistema di convalida dei test rapidi prima della loro implementazione.

I risultati del test antigenico rapido vanno interpretati in base alla situazione epidemiologica della popolazione studiata. Pur non riuscendo ad intercettare soggetti infetti e con basse cariche virali, e dunque con prestazione inferiori rispetto a RT-PCR (es. bassa sensibilità), se utilizzati in un

contesto ad alta prevalenza tipica delle fasi epidemiche avanzate caratterizzate da elevata circolazione, ed in maniera ripetuta (es. due volte a settimana), consentono di identificare rapidamente e con elevata probabilità i soggetti più contagiosi e asintomatici e dunque si rilevano funzionali all'obiettivo di prevenire il più possibile la diffusione del virus, isolare i casi positivi, tracciare i contatti, gestire i trattamenti salvavita in modo più tempestivo e contribuire a frenare la pandemia. [15] In queste condizioni dunque i test antigenici rapidi avranno un valore predittivo positivo (PPV) elevato. Pertanto, è probabile che la positività di un test antigenico rapido sia indicativa di una vera infezione, non richiedendo conferma con test RT-PCR. D'altronde le evidenze accumulate dall'inizio della pandemia dimostrano proprio come la crescita epidemica di COVID-19 sia legata alla trasmissione virale sostenuta da soggetti asintomatici e pre-sintomatici. In sostanza l'uso di test antigenici rapidi può essere raccomandato per testare le persone, indipendentemente dai sintomi, quando si attende una percentuale di positività elevata per esempio che approssimi o superi il 10%. L'obiettivo dunque non è di individuare ogni singola persona infetta, piuttosto di mitigare i focolai. Viceversa, in un contesto di bassa prevalenza, i test antigenici rapidi avranno un valore predittivo negativo (NPV) elevato, ma un PPV basso. Pertanto, se utilizzati correttamente, in un contesto a bassa prevalenza dovrebbero essere in grado di rilevare un caso altamente contagioso. In questo caso, un risultato positivo richiederà una conferma immediata. Questi test sembrano dunque mostrare risultati sovrapponibili ai saggi di RT-PCR, specie se utilizzati il più presto possibile e in ogni caso entro cinque giorni dall'insorgenza dei sintomi.

Tra i benefici per lo screening di massa con i test rapidi, ci sono la facilità d'uso, economicità e rapidità di risposta (i risultati disponibili entro mezz'ora). Per queste ragioni presentano un buon rapporto costo-benefici e si sono rilevati estremamente efficaci come screening nelle scuole, università, prigioni o in aree geografiche con alta circolazione virale, [16] piuttosto che in *setting* con personale a rischio elevato quali ospedali o residenze per anziani, dove è prioritario il test molecolare dotato di elevata sensibilità per evitare di fare una diagnosi sbagliata. Si comprende come l'utilizzo e l'interpretazione dei risultati sono legati non solo all'accuratezza del test ma anche al contesto epidemiologico. Ad esempio un eventuale risultato negativo di un soggetto con sintomi tipici dell'infezione e proveniente da un'area con alti livelli di prevalenza COVID-19, va probabilmente interpretato come falso negativo che necessita di un doppio controllo con il test molecolare. Un ulteriore svantaggio del test rapido è che i campioni, diversamente dal test molecolare, non vengono inviati ai laboratori di sanità pubblica, per l'eventuale sequenziamento genomico dell'isolato clinico.

In conclusione, i test rapidi presentano i seguenti vantaggi:

- *rapida gestione* clinica dei casi con sintomi compatibili con COVID-19;



- *controllo della trasmissione*: rilevamento precoce dei casi, tracciamento dei contatti, test a livello di popolazione;
- *mitigazione dell'impatto* del COVID-19 in ambito sanitario e socio-assistenziale: triage all'ammissione, diagnosi precoce e isolamento;
- *identificazione dei clusters* o focolai in contesti specifici: rilevamento precoce e isolamento.

### **Effetto delle varianti sui test diagnostici e vaccinazioni**

La circolazione delle varianti di SARS-CoV-2 (inglese, sudafricana e brasiliana) con probabile capacità immuno-evasiva e maggiore trasmissibilità (es. inglese B.1.1.7 e sudafricana 501Y.V2) ha sollevato non poche preoccupazioni circa l'accuratezza dei test diagnostici antigenici e molecolari utilizzati per identificare l'infezione. Si presume che se la variante possiede una sequenza genetica diversa da quella del virus originario, il test non sia in grado di diagnosticare l'infezione con il risultato di avere un risultato falso negativo. Non dimentichiamo inoltre che la variante inglese B.1.1.7 era stata identificata anche a causa di un problema del test diagnostico, chiamato 'fallimento del bersaglio del gene S'. [17] Per questo stesso problema la FDA aveva già emesso avvisi di potenziali fallimenti dei target per alcuni test. [18] Tuttavia, la stessa FDA sulla base dei dati disponibili e del monitoraggio di più di 200 strumenti diagnostici molecolari soggetti ad autorizzazione emergenziale, ha calcolato che l'85% di questi test sono diretti non solo verso il gene che codifica la proteina Spike (che muta più frequentemente), ma anche verso altri geni e dunque in questo modo si riduce la possibilità di false negatività nel caso di infezioni sostenute dalle varianti. [19] Stesso discorso vale per i test antigenici. In sostanza, sono stati finora aboliti tutti i test molecolari che erano stati disegnati sulla regione Spike del virus, mentre la maggior parte della diagnostica prende di mira più geni diversi dal gene Spike. La recente circolare del Ministero della Salute, alla luce dell'emergenza di mutazioni del gene che codifica per la proteina S, sconsiglia l'utilizzo di test basati esclusivamente sul gene S per il rilevamento dell'infezione da SARS-CoV-2 mediante RT-PCR.[20]

Poiché le mutazioni in circolazione inducono modifiche della proteina Spike sulla quale è basato il riconoscimento con gli anticorpi specifici disegnati per riconoscere la proteina S del virus SARS-Cov2 *wild type*, un altro aspetto da indagare è l'impatto delle stesse sull'accuratezza dei test diagnostici e sierologici post-vaccinazione ed il potenziale effetto delle varianti sull'efficacia delle vaccinazioni. Ciò in quanto i test sierologici rilevano gli anticorpi che hanno come target diverse parti del virus, mentre quelli che si formano a seguito della vaccinazione, come ad esempio con i vaccini Pfizer e Moderna sono diretti solo verso la proteina Spike. Nell'eventualità che i test risultassero negativi anche dopo la vaccinazione, si ritiene tuttavia che ciò non pregiudichi

l'efficacia della stessa. Si potrebbe ovviare a ciò utilizzando un test specifico progettato per gli anticorpi di interesse. E' chiaro che per garantire in futuro l'accuratezza dei test diagnostici (molecolare ed antigenico) è di fondamentale importanza portare avanti i programmi di vaccinazione il più rapidamente possibile, catalogare gli obiettivi genomici della diagnostica SARS-CoV-2 e sequenziare in maniera regolare e diffuso i campioni clinici.

### *Riferimenti*

- [1] <https://voxeurop.eu/it/2020/l-ue-la-crisi-del-covid-19-5124545>
- [2] [https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/communication\\_-\\_a\\_european\\_roadmap\\_to\\_lifting\\_coronavirus\\_containment\\_measures\\_0.pdf](https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/communication_-_a_european_roadmap_to_lifting_coronavirus_containment_measures_0.pdf)
- [3] Commission Recommendation of 28.10.2020 on COVID-19 testing strategies, including the use of rapid antigen tests. EN European Commission Brussels, 28.10.2020 C(2020) 7502 final.
- [4] Brussels, 18.11.2020 C(2020) 8037 final Commission Recommendation of 18.11.2020 on the use of rapid antigen tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection.
- [5] [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/TestingStrategy\\_Objective-Sept-2020.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/TestingStrategy_Objective-Sept-2020.pdf).
- [6] <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/options-use-rapid-antigen-tests-covid-19-eueea-and-uk>.
- [7] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771420300483?via%3Dihub>.
- [8] <https://www.gov.uk/government/publications/liverpool-covid-19-community-testing-pilot-interim-evaluation-report-summary>.
- [9] [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(20\)32504-2/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(20)32504-2/fulltext).
- [10] Off Guardian, Jun 27, 2020. COVID19 PCR Tests are Scientifically Meaningless Though the whole world relies on RT-PCR to "diagnose" Sars-Cov-2 infection, the science is clear: they are not fit for purpose, Torsten Engelbrecht and Konstantin Demeter.
- [11] [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(20\)32504-2/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(20)32504-2/fulltext).
- [12] <https://www.finddx.org/diagnostic/covid-10-igg-elisa-detection-kit/>.
- [13] [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/MEX\\_21\\_682](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/MEX_21_682).
- [14] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33564189/>.
- [15] <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp2025631>.
- [16] <https://covid19.arizona.edu/covid19-testing>.
- [17] <https://www.gov.uk/government/publications/investigation-of-novel-sars-cov-2-variant-variant-of-concern-20201201>.
- [18] <https://www.fda.gov/medical-devices/letters-health-care-providers/genetic-variants-sars-cov-2-may-lead-false-negative-results-molecular-tests-detection-sars-cov-2>.



**S.I.Me.Ve.P.**  
Società Italiana di  
Medicina Veterinaria Preventiva

[19] <https://www.jhsph.edu/covid-19/articles/variants-vaccines-and-what-they-mean-for-covid19-testing.html>.

[20] <http://www.quotidianosanita.it/allegati/allegato4716712.pdf>.

Marzo 2021