

Mittente \_\_\_\_\_

Indirizzo \_\_\_\_\_

CAP e CITTA' \_\_\_\_\_

MAIL \_\_\_\_\_

RACCOMANDATA A/R o PEC

\_\_\_\_\_, lì \_\_\_\_\_

**AUSL DI** \_\_\_\_\_

Sede Legale

Via \_\_\_\_\_

CAP e Città \_\_\_\_\_

**OGGETTO: RICHIESTA CHIARIMENTI URGENTE – DIFFIDA**

Inoltre la presente al fine di chiedervi di indicare con urgenza la fonte scientifica e soprattutto giuridica a sostegno delle vostre richieste.

Le libertà personali ed i diritti umani sono tutelati e garantiti dalla costituzione italiana e dalla CEDU e per limitarli occorre una legge che rispetti la costituzione italiana o un provvedimento della Autorità Giudiziaria.

Inoltre nel caso di specie non si può applicare la disposizione dell'art. 224bis c.p.p..

Vogliate inoltre indicare la fonte scientifica e giuridica circa la durata della quarantena, dal momento che non è in alcun modo chiaro per quanto questa verrà prolungata, e la sua obbligatorietà, i rimedi giurisdizionali o di altra natura per opporsi e dedurre memorie difensive.

Pertanto in difetto di una Vostra comunicazione scritta in questo senso ritengo di non dover subire alcuna limitazione dei miei diritti né di essere valutata come ammalata o contagiosa.

**OSSERVO INOLTRE:**

Il tampone come accertamento sanitario non può essere imposto ed in caso contrario vogliate indicarmi la fonte giuridica o medico scientifica che prevede il contrario.

Ritengo che come atto sanitario invasivo e pericoloso serva il consenso informato. Il termine “consenso informato” nasce dopo il processo di Norimberga, quando l'omonimo codice evidenziò il **principio dell'inviolabilità della persona umana**: la partecipazione di qualunque individuo ad una ricerca scientifica non sarebbe più avvenuta senza il suo volontario consenso.

Richiamo inoltre la Convenzione di Oviedo sottoscritta anche dallo stato italiano e l'art. 224bis c.p.p.;

## IN LETTERATURA SCIENTIFICA

Il tampone inoltre non è uno strumento diagnostico e viene sviluppato impropriamente.

Il **test del tampone** orofaringeo o nasofaringeo mediante RT-PCR non è un test diagnostico di malattia, la sua positività fornisce il dato sulla presenza del virus ma non ci sono ad oggi dati accurati che permettono di stabilire la sua specificità e sensibilità dal punto di vista clinico, né come già visto se la persona asintomatica può essere contagiosa o potrà sviluppare la malattia.

Quindi ad oggi il suo uso come strumento diagnostico o predittivo di malattia è del tutto inappropriato, mentre può essere utilizzato come test preliminare per orientare l'approfondimento clinico del malato.

E' scorretto inquadrare qualsiasi caso con positività all'RT-PCR come caso COVID-19 perché è lo studio delle manifestazioni cliniche e i risultati dei test diagnostici che permettono di definire la patologia di cui è affetta la persona. Questo approccio durante la pandemia ha portato ad un'inevitabile sovrastima dei casi, la più difficoltosa interpretazione dei dati e, cosa più grave, all'inappropriata gestione di pazienti non COVID-19 ma positivi al test.

Va detto che all'attuale stato delle conoscenze, il campione per l'analisi mediante RT-PCR dovrebbe prevedere più fluidi diversi, in particolare le feci, e che il test di elezione per determinare la presenza del virus e con cui validare il test in RT-PCR è il sequenziamento in NGS per la sua elevata sensibilità e specificità.

Se il sequenziamento fosse stato adottato al posto del test in RT-PCR sarebbero stati evitati problemi legati a falsi negativi per la rapida mutazione del virus anche nelle sequenze conservate della proteina Spike utilizzate per il test in RT-PCR e ai falsi positivi negli asintomatici come conseguenza del recente aumento della sensibilità del test del tampone.

Inoltre, sarebbe stato possibile monitorare le mutazioni del virus nel corso dell'epidemia e la formazione di quasispecie, <sup>1</sup>cioè di popolazioni di mutanti caratteristiche delle infezioni con virus a RNA.

I tamponi per “il nuovo coronavirus” (Cov-Sars-2) si basano su una tecnica della Reazione a Catena della polimerase (o più semplicemente PCR, dall'acronimo inglese), scoperta da Kary Mullis (insignito per questo del premio Nobel per la chimica nel 1993). Per la precisione si utilizza una tecnica leggermente modificata detta Reazione a Catena della Polimerase in Tempo Reale (RT-PCR).

---

<sup>1</sup>Jary A, Leducq V, Malet I, et al.

Evolution of viral quasispecies during SARS-CoV-2 infection

[published online ahead of print, 2020 Jul 24]. Clin Microbiol Infect. 2020;S1198-743X(20)30440-7. doi:10.1016/j.cmi.2020.07.032

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7378485/>

L'articolo *Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)*(1) spiega chiaramente che: “la PCR è una tecnica molto sensibile che permette una rapida rilevazione e identificazione di sequenze genetiche utilizzando tecniche visuali basate sulla dimensione e sulla carica. Versioni modificate della PCR hanno permesso misure quantitative dell'espressione genetica con tecniche dette PCR in tempo reale.”

È chiaro quindi che questa tecnica non identifica virus necessariamente interi e attivi, ma frammenti di materiale virale, che vengono moltiplicati, come leggiamo sull'articolo *Basic principles of quantitative PCR* (2) , in modo da potere essere identificati.

Un'ennesima conferma dei limiti della PCR (applicata alla ricerca questa volta dei batteri), la troviamo leggendo l'articolo *Advances and Challenges in Viability Detection of Foodborne Pathogens* (3) laddove si precisa che il test della PCR ha un aspetto negativo, ovvero quello di “essere incapace di differenziare il DNA delle cellule morte e di quelle vitali”.

Forse a questo punto si capisce perché lo stesso scopritore di questa, per altro utilissima reazione biochimica, metteva in guardia dall'utilizzo diagnostico del test, e perché diversi studi mostrano la presenza di quantità non indifferenti di falsi positivi; è da notare che anche un 2% di falsi positivi non è da poco, specie se si fanno decine di migliaia di test al giorno.

Va premesso che uno dei fattori che possono causare facilmente un “falso positivo” nel contesto di un laboratorio che esegue diverse analisi in sequenza (mirate alla ricerca del medesimo agente infettivo) sono quelli indicati come “Amplification carryover contamination” ovvero dovuti ad amplificazione di contaminazioni dovute all'esame precedente (4) problemi di cui si discute ancora oggi, come possiamo leggere anche in un articolo recentissimo che tratta della prevenzione di tali errori (5).

Ciò vuol dire che anche il più accurato dei kit per l'identificazione di un frammento virale specifico e unicamente appartenente a un certo agente infettivo, può fallire per via di una contaminazione accidentale e/o di un imperfetto protocollo laboratoriale, anche se va detto che la RT-PCR dovrebbe avere molti meno problemi di contaminazione rispetto alla PCR standard (come possiamo leggere su vari articoli scientifici (6) ).

Veniamo quindi a un articolo *Review of external quality assessments revealed false positive rates of 0-16.7%, with an interquartile range of 0.8-4.0%. Such rates would have large impacts on test data when prevalence is low* (7) che si può leggere in in pre-pubblicazione (8), ma che è corredato di tutte le fonti del caso, e che mostra la presenza di diversi studi sulla precisione di questi test. A scanso di equivoci preciso che si tratta proprio di quei test; all'inizio dell'articolo si legge infatti: “L'uso di test su larga scala per il SARS-CoV-2 realizzati per mezzo della RT-PCR è un elemento chiave della risposta al COVID-19, ma poca attenzione è stata posta alla potenziale frequenza e all'impatto dei falsi positivi”.

Gli autori proseguono citando diversi studi con diverse precisioni che arrivano in taluni casi al 16,7% di falsi positivi; la maggior parte degli studi mostrano livelli di falsi positivi compresi tra 0,8% e 4%.

Un altro articolo in pre-pubblicazione, *Diagnosing COVID-19 infection: the danger of over-reliance on positive test results* (9) (ovvero *Diagnosi dell'infezione da COVID-19: il pericolo della troppa confidenza nei risultati positivi del test*) ci informa che “i dati sui test a base di PCR per virus simili mostrano che i test a base di PCR abbastanza falsi positivi da rendere i risultati positivi altamente inaffidabili su una larga scala di scenari realistici” e che, fino a quando non si troverà un modo di

minimizzare questa problematica “i risultati positivi nelle persone asintomatiche che non siano stati confermati da un secondo test dovrebbero essere considerati sospetti”.

L'articolo Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results (10) ci informa che sono stati sviluppati diversi tipi di kit per i test RT-PCR per il virus SARS-CoV-2, ma con differente qualità, e che ovviamente ci possono essere errori dovuti a imprecisione dei tecnici di laboratorio. Dopo avere affermato la possibilità di falsi positivi e falsi negativi gli autori si concentrano soprattutto su questi ultimi riferendo di molti casi sospetti, con la presentazione clinica del covid-19 risultati però negativi al test scrivendo infine che “un risultato negativo non esclude la possibilità di infezione da COVID-19 e non dovrebbe essere utilizzato come l'unico criterio” per decidere come trattare il paziente.

Del resto anche con altri agenti infettivi si sono incontrate simili problematiche nel passato come leggiamo in articoli. Un controllo su test effettuati con la tecnica PCR un agente infettivo del pino (11) hanno mostrato a seconda dei vari studi (e forse dei diversi kit) falsi positivi tra il 3 e il 17,3%, test sulla clamidia (12) hanno ottenuto, un controllo su test con la PCR per la clamidia invece ha mostrato la presenza dell'11% di falsi positivi.

Adesso credo sia più facile comprendere quanto leggiamo su siti ufficiali australiani (13):

Può verificarsi una reinfezione? Ci sono state segnalazioni di apparente re-infezione in un piccolo numero di casi. Tuttavia, la maggior parte di queste segnalazioni descrive i pazienti risultati positivi entro 7-14 giorni dall'apparente guarigione. Studi immunologici indicano che i pazienti che si stanno riprendendo dal COVID-19 sviluppano una forte risposta anticorpale. È probabile che i test positivi subito dopo il recupero rappresentino l'escrezione persistente di RNA virale del nuovo coronavirus (COVID-19), e va notato che i test PCR non sono in grado di distinguere tra virus "vivo" e RNA non infettivo. Le linee guida australiane attualmente richiedono che i pazienti che hanno avuto il COVID-19 risultino negativi a due test realizzati a distanza di 24 ore prima di essere tolti dall'isolamento 14 .

E adesso veniamo ai 20.000 tamponi in più eseguito il 19 agosto (15) che mostrerebbero “una ripresa dei contagi”. Visto che l'un per cento di 20.000 è 200, visto che talora i falsi positivi sono anche più dell'un per cento, essenzialmente abbiamo un numero di “aumenti dei contagi” del tutto sovrapponibile ai falsi positivi che i test possono generare (16).

Ancora due parole sui test sierologici, le analisi del sangue per verificare la presenza di anticorpi. Sul sito istituzionale sanitario dell'azienda ATS di Milano leggiamo sul documento “Vademecum Coronavirus Strutture Socio-sanitarie - Raccolta organizzata di stralci di disposizioni normative nazionali e regionali, note circolari e indicazioni di ATS” (17): “il risultato qualitativo ottenuto su un singolo campione di siero non è sufficientemente attendibile per una valutazione diagnostica, in quanto la rilevazione della presenza degli anticorpi mediante l'utilizzo di tali test non è, comunque, indicativo di un'infezione acuta in atto e, quindi, della presenza di virus nel paziente e del rischio associato a una sua diffusione nella comunità. Inoltre, per ragioni di possibile cross-reattività con differenti patogeni affini, quali altri coronavirus umani, il rilevamento degli anticorpi potrebbe non essere specifico della infezione da SARS-CoV-2. Infine, l'assenza di rilevamento di anticorpi (non ancora presenti nel sangue di un individuo per il ritardo che fisiologicamente connota una risposta umorale rispetto al momento dell'infezione virale) non esclude la possibilità di un'infezione in atto in fase precoce o asintomatica e il relativo rischio di contagiosità dell'individuo. (...) Un test anticorpale negativo può avere vari significati: una persona non è stata infettata da SARACoV-2, oppure è stata infettata molto recentemente (meno di 8-10 giorni prima) e non ha ancora sviluppato

la risposta anticorpale al virus, oppure è stata infettata ma il titolo di anticorpi che ha sviluppato è, al momento dell'esecuzione del test, al di sotto del livello di rilevazione del test”.

Tutto questo significa in parole povere che se fai un esame del sangue per la rilevazione degli anticorpi al Sars-Cov-2 (il virus che causa la malattia denominata Covid-19) potresti:

- Risultare positivo perché contagiato in un passato non troppo recente quel coronavirus o anche un altro;
- Risultare negativo ma avere ugualmente in corso un'infezione asintomatica o un'infezione ai primissimi stadi;
- Risultare negativo al momento, ma ovviamente ci si può contagiare/ammalare anche il giorno dopo.

Quindi il risultato “positivo” significa tutto e niente, il risultato negativo significa tutto e niente; o meglio, chi risulta positivo farà ancora un tampone. Questo vuol dire che ci potrebbero essere molti falsi positivi al sierologico di persone che poi faranno un tampone di conferma (o smentita) con le incertezze che anche questo tampone significa (18).

Qualcuno forse si chiederà: ma se risulterò positivo al virus, cioè ho gli anticorpi, non vuol dire che sono guarito? Che senso ha fare un tampone che potrebbe risultare positivo proprio per questi detriti virali ancora in circolazione dopo il contagio? Che senso ha fare un tampone a una persona che non ha avuto sintomi recenti e mostra un alto livello di anticorpi? Se è stata contagiata e non ha mostrato sintomi, visto che gli anticorpi si producono circa una settimana, visto che il periodo di incubazione è tra 2 e 12 giorni (19), la probabilità che questa persona non sia ancora guarita e possa nei giorni successivi diffondere il contagio c'è, sicuramente, ma è bassa, anche perché il patogeno è in circolazione da circa 8 mesi (alla data della stesura di queste righe). Il verificarsi di una particolare coincidenza (fare il test proprio 8 giorni dopo l'infezione, avere una incubazione piuttosto lenta e per giunta fare il test sierologico proprio nei giorni dell'incubazione); la probabilità è facilmente stimabile intorno al 3% (finestra di circa 8 giorni su un periodo di circa 240 giorni porta già a un 3,3%, ma poi considerando la coincidenza dell'incubazione lenta la probabilità è ancora minore).

Attendo una risposta con urgenza stante il caso con le implicazioni anche di natura economica e lavorativa connesse rispetto le quali si riservano le opportune azioni giudiziarie in punto anche di risarcimento danni.

Distinti Saluti

Note<sup>2</sup>

- 
1. Pubblicato su Journal of Investigative Dermatology 2013 Mar; 133(3): e6., autori Lilit Garibyan, Nidhi Avashia; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>.
  2. Pubblicato su Molecular Biotechnology. 2000 Jun;15(2):115-22, autore L. Raeymaekers; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10949824/>.
  3. Pubblicato su Frontiers in Microbiology. 2016; 7: 1833, autori Dexin Zeng, Zi Chen, et al.; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5118415/>.
  4. Leggiamo sul sito di un laboratorio ( <https://arcticzymes.com/applications/pcr-carry-over-prevention/>) che “L'elevata sensibilità delle PCR, e in particolare delle PCR quantitative, rende il metodo soggetto a contaminazione, fornendo risultati falsi o imprecisi. I contaminanti trasferiti da precedenti PCR sono considerati una delle principali fonti di risultati falsi positivi. I contaminanti possono essere trasferiti da precedenti reazioni di amplificazione a causa di aerosolizzazione, oppure a causa di contaminazione per mezzo di pipette, superfici, guanti e reagenti.”

- 
5. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory, Pubblicato su *Annals of Clinical Laboratory Science*. Autumn 2004;34(4):389-96, autore Jaber Aslanzadeh; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15648778/>.
  6. Vedi per esempio Real-time PCR detection chemistry Pubblicato su *Clinical Chimica Acta*. 2015 Jan 15;439:231-50, autori E Navarro, G Serrano-Heras, M J Castaño, J Solera; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25451956/>.
  7. Autori Andrew N. Cohen, Bruce Kessel; <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.26.20080911v1.full.pdf>.
  8. L'articolo non è quindi ancora stato sottoposto a revisione paritaria, la cui pre-pubblicazione che avviene però su un sito (<https://www.medrxiv.org/>) di tutto rispetto nella cui home page vediamo il logo del prestigioso *British Medical Journal* (una delle riviste mediche più autorevoli al mondo) e dell'Università di Yale.
  9. Autori Andrew N. Cohen, Bruce Kessel, Michael G. Milgrom; <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.26.20080911v3>
  10. Pubblicato su *Expert Review of Molecular Diagnosis*. 2020 : 1–2. autori Alireza Tahamtana Abdollah Ardebilib; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7189409/>.
  11. Transferability of PCR-based diagnostic protocols: An international collaborative case study assessing protocols targeting the quarantine pine pathogen *Fusarium circinatum*, pubblicato su *Scientific Reports* (2019), volume 9, Article number: 8195 autori Renaud Ios, Francesco Aloï, et al.; <https://www.nature.com/articles/s41598-019-44672-8>.
  12. The superiority of polymerase chain reaction over an amplified enzyme immunoassay for the detection of genital chlamydial infections, pubblicato su *Sexual Transmitted Infections*. 2006 Feb; 82(1): 37–40, autori H Jalal, H Stephen, A Al-Suwaine, C Sonnex, and C Carne; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2563809/>.
  13. <http://anmf.org.au/news/entry/covid-19-frequently-asked-questions> a sua volta preso dal sito <https://www.health.gov.au/sites/default/files/documents/2020/03/coronavirus-covid-19-information-for-clinicians.pdf?fbclid=IwAR0sTIOk3KO32Bb8n6T97MSEi6omt0ZimWyb-rl0TJB2Pgqus6eB5jfsH5U> (link non più attivo).
  14. In lingua originale: “Can reinfection occur? There have been reports of apparent re-infection in a small number of cases. (...) It is likely that positive tests soon after recovery represent persisting excretion of viral, Novel coronavirus (COVID-19) 2 RNA, and it should be noted that PCR tests cannot distinguish between “live” virus and non-infective RNA .
  15. Vedi per esempio l'articolo Coronavirus, il bollettino di oggi 19 agosto: 642 nuovi positivi, 7 morti e 364 guariti pubblicato su *Repubblica* il 19 agosto 2020 a cura di Elena Stabile; [https://www.repubblica.it/cronaca/2020/08/19/news/coronavirus\\_il\\_bollettino\\_di\\_oggi\\_19\\_agosto\\_-264978553/](https://www.repubblica.it/cronaca/2020/08/19/news/coronavirus_il_bollettino_di_oggi_19_agosto_-264978553/).
  16. La situazione è un po' più complessa; da una parte il teorema di Bayes mostra che ci potrebbero essere anche più falsi positivi, dall'altra se davvero ci si limitasse ai contatti più prossimi ce ne potrebbero essere di meno, visto che il campione scelto non è casuale. Tutto sommato una stima dell'1% di falsi positivi, potrebbe essere realistica o anche una sottostima.
  17. [https://www.ats-milano.it/Portale/Portals/0/AtsMilano\\_Documenti/Vademecum%20COVID19\\_UdO\\_sociosan\\_260620\\_3daea6d3-daf1-4869-9dc6-6d5cfc908ab3.pdf](https://www.ats-milano.it/Portale/Portals/0/AtsMilano_Documenti/Vademecum%20COVID19_UdO_sociosan_260620_3daea6d3-daf1-4869-9dc6-6d5cfc908ab3.pdf)
  18. 18 Questo è quello che viene ufficialmente previsto da disposizioni ministeriali, vedi per esempio qui: <https://www.orizzontescuola.it/wp-content/uploads/2020/08/circolare-ministero-salute.pdf>.