

Siehe Diskussionen, Statistiken und Autorenprofile für diese Veröffentlichung unter: <https://www.researchgate.net/publication/369803433>

RT-qPCR-Test, der auf die konservierte 5'-UTR von SARS-CoV-2 abzielt, überwindet wesentliche Mängel des ersten von der WHO empfohlenen RT-qPCR-Tests

Artikel · April 2023

DOI: 10.56098/ijvpr.v3i1.71

ZITATE

0

LIEST

11

6 Autoren, darunter:



Ulrike Kämmerer

Universitätsklinik Würzburg

250 PUBLIKATIONEN 6.500 ZITATE

[SIEHE PROFIL](#)



Rainer J Klement

Leopoldina-Krankenhaus, Schweinfurt

167 VERÖFFENTLICHUNGEN 3.002 ZITATE

[SIEHE PROFIL](#)



Pieter Börger

W+W Forschungsverbund

116 PUBLIKATIONEN 2.466 ZITATE

[SIEHE PROFIL](#)



Klaus Steger

Justus-Liebig-Universität Gießen

257 PUBLIKATIONEN 9.494 ZITATE

[SIEHE PROFIL](#)

Einige der Autoren dieser Veröffentlichung arbeiten auch an diesen verwandten Projekten:



Modellierung und Vorhersage von Ergebnissen nach Strahlentherapie [Projekt anzeigen](#)



Transponierbare und transponierte Elemente (TEs) [Projekt anzeigen](#)

RT-PCR-Test-Targeting von Konservierte 5'-UTR der Erste SARS-CoV-2 überwindet Mängel der Von der WHO empfohlener RT-PCR-Test

Ulrike Kämmerer, PhD¹, Sona Pekova, PhD², Rainer J. Klement, PhD³, Rogier Louwen, PhD⁴, Pieter Borger, PhD⁵, Klaus Steger, PhD⁶

1 Professor, Universitätsklinikum Würzburg, Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie, Forschungslabor, Deutschland; u.kaemmerer@mail.uni-wuerzburg.de; <https://orcid.org/0000-0002-2311-6984> 2

Tilia Laboratories, Labor für Molekulardiagnostik, Pchery, Tschechische Republik; sona.pekova@tilialaboratories.cz; <https://orcid.org/0000-0003-0106-4543> 3

Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt, Abteilung für Radioonkologie, Deutschland; rainer_klement@gmx.de; <https://orcid.org/0000-0003-1401-4270> _

4 Erasmus University Medical Center Rotterdam, Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Infektionskrankheiten, Niederlande; Aktuelle Adresse: CCassured (CRISPR Commons saved), Breda, Niederlande; rrouwen@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2537-4941> _

5 The Independent Research Institute on Information and Origins, Lörrach, Deutschland; pieter.borger@hotmail.com

6 Corresponding Author: Professor Emeritus, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland; Klaus.Steger@chiru.med.uni-giessen.de; <https://orcid.org/0000-0002-2104-0840>

Abstrakt

Zum ersten Mal in der Medizingeschichte wurde ein Labortest (RT-PCR) als alleiniges Kriterium zur Diagnose einer Krankheit (COVID-19) und zur Definition der Infektiosität eines Virus (SARS-CoV-2) ohne Bewertung klinischer Symptome und verwendet Nachweis eines replikationsfähigen Virus, um die Durchführung bevölkerungsweiter, ungetesteter Interventionen zu rechtfertigen. Die Ziele hier sind (1) ein robustes quantitatives RT-PCR (RT-qPCR)-Protokoll zu evaluieren, das große Bedenken überwindet, die in der wissenschaftlichen Gemeinschaft bezüglich des ersten von der WHO empfohlenen RT-qPCR-Protokolls für SARS-CoV-2-Sequenzen geäußert wurden, (2) zur Charakterisierung einzelner SARS-CoV-2-Stämme, die in der Tschechischen Republik von Herbst 2020 bis Frühjahr 2021 zirkulieren, unter Anwendung der Sequenzierung der nächsten Generation und (3) zur Wiederaufnahme des wissenschaftlichen Dialogs und zur Rückkehr zur vernünftigen und evidenzbasierten Medizin. Wir stellen einen RT-qPCR-Test vor, der zum Nachweis aller bisher bekannten SARS-CoV-2-Varianten entwickelt wurde, ohne falsch-positive Ergebnisse zu produzieren. Basierend auf dem genomischen Mutationsprofil zeigen wir, dass die drei einzelnen Wellen (Herbst 2020 bis Frühjahr 2021) in der Tschechischen Republik aufeinanderfolgend waren, aber keine direkte genomische Beziehung zueinander hatten. Dies wurde bei der omicron-Variante deutlich, die keine direkte evolutionäre Verbindung zu einer der vorherigen SARS-CoV-2-Varianten aufwies. Darüber hinaus liefern wir Belege dafür, dass vernachlässigte Prinzipien guter wissenschaftlicher Praxis nicht nur zur Veröffentlichung des von der WHO empfohlenen Charité RT qPCR-Protokolls führten, sondern auch zu gesundheitlichen Problemen. Unnötige Quarantäne gesunder Personen sowie Lockdowns und grausame Kollateralschäden für Gesellschaften und Volkswirtschaften weltweit durch eine hohe Zahl falsch-positiver „PCR-Fälle“.

Anderenfalls würden ansteckende symptomatische Personen durch falsch-negative Testergebnisse in falscher Sicherheit gehalten, was zu COVID-19-Clustern führen könnte. Sowohl unsere Ergebnisse als auch Literaturdaten bestätigen, dass die regelmäßige Validierung jedes PCR-basierten diagnostischen Tests durch Sequenzierung obligatorisch ist. Um künftiges Fehlverhalten zu verhindern, braucht die Wissenschaft einen Realitätscheck und muss den wissenschaftlichen Dialog neu aufnehmen und sich von politischer Einflussnahme und Dogmen befreien.

Schlüsselwörter: Charité-Protokoll, COVID-19, Next Generation Sequencing (NGS), RT-PCR, SARS-CoV-2, wissenschaftliches Fehlverhalten.

EINFÜHRUNG

Seit März 2020 hält COVID-19 (Coronavirus-Krankheit-2019) die Welt in Atem, hauptsächlich aufgrund von Kollateralschäden mit katastrophalen Auswirkungen auf Gesundheit, Gesellschaft und Wirtschaft. Seit Beginn der mutmaßlichen Pandemie und zum ersten Mal in der Medizingeschichte gab es einen globalen politischen Konsens (Hedges & Lasco, 2021) dass der Krankheitsstatus, die Infektion und die Infektiosität ausschließlich durch einen Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)-Labortest ohne unabhängige klinische Bewertung der Symptome von Personen, bei denen eine COVID-19-Krankheit diagnostiziert wurde, diagnostiziert werden könnten (China CDC, 2020 ; Paul-Ehrlich-Institut, 2020). Aufgrund der kritischen Bedeutung der RT-PCR-Ergebnisse konnte man leicht erwarten, dass die höchsten Qualitätsstandards für Genauigkeit und Zuverlässigkeit angenommen würden. In diesem Beitrag stellen wir jedoch das erste von der WHO (Weltgesundheitsorganisation) empfohlene und daher am häufigsten angewandte RT-PCR-Testprotokoll, das zu Beginn der Pandemie verwendet wurde, im Folgenden als Charité-Protokoll bezeichnet (Corman et al., 2020; WHO, 24. Januar 2021). Darüber hinaus stellen wir einen alternativen und robusten RT-PCR-Assay vor, der auf die 5'-UTR (Untranslated Region) von SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome – CoronaVirus 2) abzielt und die Mängel des Charité-Protokolls überwindet. Um den Fokus beizubehalten, berücksichtigt diese Studie keine anderen Tests als RT-PCR. Leser, die an anderen Antigen-Schnelltests als RT-PCR-Assays interessiert sind, werden auf eine aktuelle Übersicht verwiesen (Puhach et al., 2022). Im Folgenden skizzieren wir die Frühphase von COVID-19 und die Teststrategie der WHO zur Bekämpfung der Pandemie.

ZEITLEISTE VON DER SOGEMANNTE COVID-19- PANDEMIE

Am 30. Dezember 2019 berichtete ein Krankenhaus in der chinesischen Stadt Wuhan, dass sieben seiner Patienten an einer schweren Lungenentzündung unbekannter Ursache litten (Reuters, 2019). Die lokalen Gesundheitsbehörden informierten umgehend die WHO und hatten den Erreger bereits mittels Ganzgenomsequenzierung und RT-PCR als Coronavirus identifiziert (Ren et al., 2020; Zhu et al., 2020; Lu et al., 2020). Am 7. Januar 2020 erhielt das identifizierte Virus den Namen 2019-nCoV (2019-novel CoronaVirus) und wurde am 1. Februar 2020 in SARS-CoV-2 (Coronaviridae Study Group, 2020) umbenannt. trotz des Protests der chinesischen Wissenschaftler, die den Namen HCoV-19 bevorzugten (Jiang et al., 2020). Anschließend berichtete das chinesische Zentrum für Seuchenkontrolle (CCDC), dass es einen RT-PCR-Assay zum Nachweis des neuartigen Virus in Patientenproben entwickelt habe (China CDC, 2020). Die Sequenzierungsergebnisse ordneten das identifizierte Virus in die Beta-Coronaviridae der Untergattung Sarbecoviren ein (Ren et al., 2020). Am 9. Januar 2020 teilten die chinesischen Wissenschaftler ihre Ergebnisse mit der WHO (Tan et al., 2020) und die Virussequenz in voller Länge in die Datenbank der Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) mit Hauptsitz in den USA hochgeladen (NC_045512.1).

Die WHO hat am 13. Januar 2020 das erste diagnostische RT-PCR-Testprotokoll für eine RT-qPCR online veröffentlicht (WHO, 13. Januar 2020). Insbesondere basierten die veröffentlichten RT-PCR-Testrichtlinien *nicht* auf den Protokollen, die von chinesischen Wissenschaftlern erstellt und geteilt wurden (China CDC, 2020). waren jedoch ein künstliches Produkt mehrerer kooperierender Labors in Europa (Reusken et al., 2020). Die Autoren verwendeten die vom CCDC in der GISAID-Datenbank hinterlegten Wuhan-Sequenzen für das Primer- und Sondendesign *ohne positive Patientenproben* und *ohne dass das Virus selbst zur Validierung des Tests verfügbar war* (Corman et al., 2020). Das europäische Protokoll, das wir hier als „Charité-Protokoll“ bezeichnen, empfahl drei Ziele (befindet sich im Nukleokapsid (N)-Gen, im Hüllgen (E) und entsprechend der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) aus dem ersten und zweiten Open Reading Frames (ORF1a und ORF1b)-Gen. Letztere sollten die gesamte SARS-Beta-Coronavirus-Untergruppe (Sarbeco) mit nur einer RdRP-Sonde als diskriminierendes Oligonukleotid nachweisen. Dies ermöglichte die Verwendung des SARS-CoV-Stamms Frankfurt- 1 als positive Kontrolle, jedoch wurde der Nachweis der Genauigkeit der amplifizierten Targets durch geeignete Kontrollen und Sequenzierung nicht gezeigt.

Am 17. Januar 2020 wurde auf der WHO-Webseite ein Update veröffentlicht, in dem das frühere Protokoll korrigiert wurde, indem das spezifischste Primerpaar für das N-Gen-Target aufgrund „mangelnder Sensitivität“ weggelassen wurde (WHO, 24. Januar 2021). Sechs Tage später, am 23. Januar 2020, wurde dieses RT-qPCR-Protokoll – das schnell zum Standard für den Nachweis von SARS-CoV-2-RNA in Europa und vielen anderen Regionen der Welt wurde – als Forschungsmanuskript von Eurosurveillance veröffentlicht nach einem angeblich vollständigen Peer-Review-Prozess, der nur einen Tag dauerte (Corman et al., 2020). Primer und Sonden aus dem Charité-Protokoll wurden fast sofort kommerziell verfügbar gemacht, wie ein Labor in Slowenien berichtete (Poljak et al., 2020):

„Nach umfassender Evaluierung hat unser Labor am 17. Januar 2020 LightMix-basierte SARS-CoV-2-Tests implementiert. Die routinemäßigen SARS-CoV-2-Tests begannen am 27. Januar 2020, und die erste positive Probe wurde am 4. März 2020 nach dem Testen von 353 Routineproben nachgewiesen. Bis zum 8. April 2020 wurden in Slowenien insgesamt 30.669 SARS-CoV-2-Tests durchgeführt (15.330 Tests pro Million Einwohner), 1.103 laborbestätigte Fälle von COVID-19 wurden entdeckt und 40 Todesfälle wurden gemeldet.“

Zu diesem Zeitpunkt gab es keinen einzigen COVID-19-Fall in Europa und die „Entscheidung für einen diagnostischen Ansatzwechsel“ wurde knapp eine Woche vor der Veröffentlichung des Charité-Protokolls durch Eurosurveillance getroffen. Doch nur drei Tage nach dem „Diagnosewechsel“, am 30. Januar 2020, hat die Notfallkommission der WHO (WHO, 30. Januar 2020) erklärte einen Public Health Emergency of International Concern (PHEIC) trotz nur 1.651 testpositiver Fälle in China, darunter 38 Todesfälle, und 98 Fälle in 18 Ländern außerhalb Chinas ohne gemeldete Todesfälle (Our World in Data). Am 11. März 2020 war die Zahl der positiven SARS-CoV-2-Testfälle weltweit auf 4.670 gestiegen, darunter 280 Todesfälle, die auf diese neue virusinduzierte Krankheit COVID-19 (Our World in Data) zurückgeführt wurden. und der Generaldirektor der WHO, Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus, erklärten COVID-19 zur „Pandemie“ (WHO, 11. März 2020) — eine weltweite Krise, von der weniger als eine Person pro Million betroffen ist (ungefähr 8 Milliarden dividiert durch 4.670). Dies war möglich, weil die WHO-Definition einer „Pandemie“ im Jahr 2009 umformuliert wurde, sodass sie nicht länger „enorme Zahlen von Todesfällen und Krankheiten“ erforderte (Doshi, 2010).

WHO- STRATEGIE ZUR BEKÄMPFUNG DER AUSGEKLÄRTEN COVID-19 -PANDEMIE

Am 16. März 2020 gab Ghebreyesus die globale Strategie zum Umgang mit COVID-19 bekannt:

„Wir haben eine einfache Botschaft an alle Länder: Testen, testen, testen. Testen Sie jeden Verdachtsfall. Wenn sie positiv getestet werden, isolieren Sie sie und finden Sie heraus, mit wem sie engen Kontakt hatten, bis zu zwei Tage bevor sie Symptome entwickelten, und testen Sie diese Personen auch (WHO, 16. März 2020).“

Parallel dazu hat die WHO die COVID-19-Dashboard-Funktion eingeführt, die eine Echtzeit-Verfolgung von RT-PCR-positiven Testergebnissen in absoluten Zahlen unabhängig von der Anzahl der durchgeführten Tests und ohne weitere Spezifizierung des angewendeten Testsystems ermöglicht. Dies sollte die Planung, Umsetzung und Ressourcenausstattung von Bereitschafts- und Reaktionsaktivitäten der Länder unterstützen – auf der Grundlage weltweiter RT-PCR-Tests wurden angeblich 13.982 positive Fälle identifiziert, darunter 871 COVID-19-zugeschriebene Todesfälle (Our World in Data). Die von der WHO empfohlene Strategie, so viele Menschen wie möglich unabhängig von klinischen Symptomen durch diesen molekularen Test zu testen, erscheint rätselhaft, da die RT-PCR-Technologie allein keine ausreichende Sensitivität und Spezifität aufweist, um einen intakten Infektionserreger wie ein Virus und damit nachzuweisen um eine ansteckende Person zu identifizieren, noch kann es gültig verwendet werden, um eine Krankheit zu diagnostizieren. Es amplifiziert jedes interessierende genetische Material unabhängig von der „Lebensfähigkeit“ der Quelle (**Kasten 1**). Außerdem Seite 9 eines Konsensdokuments zur Epidemiologie des schweren akuten respiratorischen Syndroms (SARS) der WHO (2003), ein hoch verwandtes Virus, lautet wie folgt: „Die Datenverknüpfung ist erforderlich, um festzustellen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen dem klinischen Schweregrad und der Viruslast und -ausscheidung besteht.“ Dies impliziert, dass eine RT-PCR-positiv getestete Person nicht automatisch als symptomatisch oder infektiös angesehen werden kann, ohne die klinischen Symptome zu bestätigen. Daher ist es unverständlich, dass sich die WHO überhaupt auf die RT-PCR-Teststrategie bekennt

nach Veröffentlichung einer systematischen Übersichtsarbeit, die zeigt, dass Patientenmerkmale (dh Schweregrad der Symptome) und Testparameter (dh Zyklusschwelle) die Zuverlässigkeit der RT-PCR-Testergebnisse radikal einschränken (Jefferson et al., 2020). Darüber hinaus hätten sich die WHO-Forscher der mit PCR-Tests verbundenen Fallstricke bewusst sein müssen, da falsch-positive Ergebnisse 2007 eine Pseudo-Pandemie des Keuchhustens im Dartmouth-Hitchcock Medical Center verursachten (New York Times, 2007). Dennoch wurden Massentests durch RT-PCR zur Strategie der Wahl, um COVID-19 zu überwachen, und von diesem Zeitpunkt an wurde die Anzahl positiver Tests verwendet, um massive Einschränkungen der Menschenrechte und landesweite Lockdowns zu rechtfertigen.

Kasten 1: Kein diagnostischer Wert der RT-PCR für den Nachweis eines infektiösen Virus Von größter

Bedeutung und unabhängig vom Protokoll-Design weist die RT-PCR ausschließlich das/die revers transkribierte(n) und amplifizierte(n) RNA-Ziel(e) nach, das/die durch angewendete Primer ausgewählt wurde(n) und daher kann auf keinen Fall nachweisen, dass in einer bestimmten Probe tatsächlich ein replikationsfähiges, infektiöses Virus vorhanden ist. Bemerkenswert ist, dass aufgrund der hohen Sensitivität der RT-PCR restliche, nicht infektiöse virale RNA auch ohne infektiöse Viren nachweisbar bleibt. Bei Verwendung externer Standards mit definierten viralen RNA-Kopienzahlen können RNA-Viruslasten mit Ct-Werten korreliert werden, die durch RT-qPCR erhalten wurden. Allerdings kann weder eine bestimmte RNA-Kopienzahl noch ein bestimmter Ct-Wert als Schwellenwert einen sicheren Rückschluss auch darauf zulassen, ob die Viruslast zu- oder abnimmt.

Bereits am 23. Mai 2020 wurden die vorstehenden grundlegenden Informationen zur RT-PCR in einer Stellungnahme des National Center for Infectious Diseases (2020) veröffentlicht. Anschließend wurde es in einem Podcast vom 26. November 2020 von Marion Koopmans (2020), Co-Autorin des Charité-Protokolls (Corman et al., 2020), bestätigt. In einem Video-Statement vom 30. Dezember 2021 von Anthony Fauci (2021), der leitende medizinische Berater von Präsident Biden in den USA, und erst kürzlich in einer umfassenden Übersicht mit der korrespondierenden Autorin Isabella Eckerle, wie von Puhach et al. (2022) hervorgehoben. Letzteres enthält eine detaillierte Darstellung, warum die Infektiosität durch die Bewertung der viralen Replikation in Zellkultur bestimmt werden muss, die den Goldstandard für replikationsfähige, infektiöse Viren darstellt. Das letztere Papier kommt zu dem Schluss, dass „bis heute keine diagnostischen Tests existieren, die das Vorhandensein eines infektiösen Virus zuverlässig bestimmen“.

Letztendlich kann die RT-PCR zur Bestimmung der RNA-Menge nur als Proxy verwendet werden, da die Zellkultur mit SARS-CoV-2 Biosicherheitslaborbedingungen der Stufe 3 erfordert (Risi et al., 2010). Außerdem muss jede Diagnose von einem oder mehreren Klinikern bestätigt werden, die die Übereinstimmung aller Labortests mit den klinischen Symptomen der RT-PCR-getesteten Person zeigen müssen, wie dies bei jedem anderen Labortest der Fall ist.

Zu beachten ist, dass jeder Laborassay, selbst wenn er sowohl eine hohe Spezifität als auch eine hohe Sensitivität aufweist, falsch-positive Ergebnisse erzeugt, die sogar die Anzahl der richtig-positiven Zahlen übertreffen können, wenn die Prävalenz niedrig ist, dh wenn Massentests an asymptomatischen Personen durchgeführt werden (Skitttrall et al., 2020; Lyon-Weiler, 2021). Positiv getestete, asymptomatische Personen stellen niedrige anfängliche Zielzahlen dar, die mit hohen Ct-Werten verbunden sind. Selbst wenn die Testanzeige korrekt ist, sind diese Personen nicht infektiös, sondern stellen klinische Fehlalarme dar, die entweder genesene Personen umfassen, die noch Virusreste aufweisen, oder immune Personen, die aufgrund einer niedrigen Viruslast nicht ansteckend sind (Cevik et al., 2020; Lyon-Weiler, 2021). Baselet et al. (2020) berichteten von einer falsch-positiven Rate bei RT-PCR-Tests von 11 % (13/122), zu einer Zeit, als die COVID-19-Prävalenz 2 % betrug. Nur für zwei der 13 falsch-positiven Ergebnisse war eine SARS-CoV-2-Serologie verfügbar, beide waren negativ für SARS-CoV-2, während einer positiv für ein Rhinovirus war. Das Problem der Kontamination wurde schon sehr früh von Wernicke et al. (2020), die Ct-Werte von nur 17 für Negativkontrollen berichteten, was auf ein hohes Maß an Kontamination in Reagenzien hinweist, die von Oligonukleotidlieferanten bezogen wurden. Daher muss jede Charge von PCR-Reagenzien vorgetestet werden, bevor sie in der Routinediagnostik verwendet wird.

Der einzige Ansatz, der falsch-positive Ergebnisse auf Null bringen würde, erfordert die Durchführung der Sanger-Sequenzierung (Lee, 2021). Die Verwendung von verschachtelter RT-PCR, gefolgt von Sanger-Sequenzierung, um 50 Proben erneut zu testen, die als positive RT-qPCR-Referenz verkauft wurden, bestätigte 21 (42 %) falsch-positive Ergebnisse (Lee, 2022).

Da eine Vielzahl von Wissenschaftlern, Ärzten und medizinischen Beratern ihre Beschwerden über die Mängel der ersten von der WHO empfohlenen RT-PCR gemeldet haben, haben wir das wegweisende Protokoll zum Nachweis von SARS-CoV-2 weiter in Frage gestellt. Um die RT-PCR-Testung von SARS-CoV-2-RNA als Proxy für die Viruslast zu verbessern, den Problemen des Charité-Protokolls zu entgehen und einen zuverlässigen und überprüfbareren PCR-Ansatz zu implementieren, wurde ein alternatives Testregime etabliert. Im Folgenden bezeichnen wir es als „5'-UTR RT-qPCR-Protokoll“. Basierend auf der interindividuellen genomischen Heterogenität der SARS-CoV-2-Stämme Alpha, Beta, Gamma und Delta (Ong et al., 2022), Wir identifizierten eine einzigartige Konsensusregion in der 5'-UTR als sowohl spezifisches als auch sensitives Ziel für den quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktionsnachweis (RT-qPCR) von SARS-CoV-2-verwandter RNA. Anschließend haben wir die Genomsequenzen einzelner SARS-CoV-2-Stämme charakterisiert, die von Herbst 2020 bis Frühjahr 2021 in Tschechien zirkulierten. Mit dieser Erfahrung gehen wir auf kritische Kommentare innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft nach unserem Antrag auf Widerruf der Charité ein Protokoll (Borger et al., 2020) und wir diskutieren umfassend unsere großen Bedenken mit dem Charité-Protokoll und wie die Politisierung der Wissenschaft die Prinzipien guter wissenschaftlicher Praxis mit schädlichen und tödlichen gesellschaftlichen Auswirkungen weltweit auslöscht.

Methoden

PRIMER-DESIGN FÜR DIE 5'-UTR -REGION

VON SARS-COV-2 FÜR RT-QPCR

Unter Verwendung des Abgleichs genomischer Sequenzen, die im Februar 2020 in Bezug auf Fledermaus/SARS/nCoV-19-Coronaviren verfügbar waren, haben wir eine einzigartige Region ausgewählt, die sich innerhalb der konservierten und spezifischen 5'-UTR von SARS-CoV-2 befindet, um als spezifisches und empfindliches Ziel für die Realität zu dienen -zeit RT-qPCR-Nachweis der viralen RNA, was zu einem 207 Basenpaare (bp) Amplikon führt. Wir haben den Assay intern gemäß den europäischen Richtlinien ISO 13485 für die Herstellung von In-vitro-Diagnostika validiert. Wie unten detailliert beschrieben, wurden 50 positive Fälle, die in authentischen symptomatischen Patientenproben (Nasen-Rachen-Abstriche) identifiziert wurden, durch direkte Sanger-Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte bestätigt. Der Assay erfüllte alle Anforderungen an die Spezifität (keine falsch-spezifischen Produkte wurden beobachtet) und auch an die Sensitivität (sieben Kopien der Ziele in einer PCR-Reaktion). Darüber hinaus wurde unser Assay von der offiziellen britischen NEQAS-Behörde für die Qualitätsbewertung extern validiert und anschließend in der Routinediagnostik von bisher 31.028 getesteten authentischen Proben eingesetzt. Eigenschaften von Primern und Sonden sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

Das PCR-Profil umfasste einen ersten Denaturierungsschritt bei 94 °C für 5 Minuten, gefolgt von 45 Zyklen bei 94 °C für 30 Sekunden, bei 58 °C für 30 Sekunden (Erwerb bei FAM) und bei 72 °C für 30 Sekunden. Die Identität der generierten Amplikons wurde durch Sanger-Sequenzierung bestätigt (**ergänzende Abbildung 1**). In jeder analysierten Probe zeigte der Sanger-Chromatograph eine authentische SARS-CoV-2-Sequenz und bestätigte damit die erforderliche Spezifität des 5'-UTR-RT-qPCR-Assays. Die Kopienzahl des SARS-CoV-2-Genoms in 1 ml des ursprünglichen Probeneluates wurde unter Verwendung einer Kalibrierungskurve berechnet, die aus 4-log-Verdünnungen einer synthetischen genomischen Sequenz erstellt wurde, die die 5'-UTR-Sequenz und ihre unmittelbar flankierende Region abdeckt (kundenspezifisch synthetisiert von Eurofins Genomics, Deutschland) unter Verwendung der folgenden Kalibrierungskurvengleichung: $10^{(-0,279 * Ct + 11,244)}$. **Ergänzende Abbildung 2** zeigt die Log-Verdünnung der synthetischen SARS-CoV-2-Vorlage, beginnend bei 10^{10} Kopien pro PCR-Reaktion bis hinunter zu 10^1 Kopien pro PCR-Reaktion. Die Negativkontrolle ist negativ, dh es waren keine unspezifischen Amplikons vorhanden, die durch unerwünschte inter- und intramolekulare Wechselwirkungen erzeugt wurden.

Anhand der gemessenen Ct-Werte der authentischen Patientenproben wurde anschließend die Anzahl der Kopien des SARS-CoV-2-Genoms in 1 ml Ausgangsprobeneluat berechnet. Angesichts der Tatsache, dass die verwendete Quantifizierungsmethode die sogenannte ABSOLUTE-Methode war (was ein typischer Aufbau in der molekularen Mikrobiologie ist), wurde die Kopienzahl von SARS-CoV-2 in jeder Patientenprobe unter Verwendung der Eichkurvengleichung in konstruierter Form bestimmt seriell verdünntes synthetisches SARS-CoV-2-Genom, das nach dem Stand der Technik die exakteste Methode zur Erstellung einer Eichkurve in der molekularen Mikrobiologie darstellt.

Tabelle 1

Diagnostisches Primer-Set und TaqMan-Hybridisierungssonde für routinemäßige SARS-CoV-2-Echtzeit-qPCR (5'-UTR) sowie Primer für die Sanger-Genotypisierung, lokalisiert im S-Gen SARS-CoV-2, wie bei Tilia durchgeführt Labors von März 2020 bis April 2022. Angesichts der intrinsischen genomischen Stabilität der 5'-UTR-Region von Coronaviren erforderte der Assay trotz der verschiedenen SARS-CoV-2-Stämme, die seit März 2020 auftauchten, keine Neugestaltung. Tm- und GC-Gehaltswerte Oligonukleotide sind wie vom Hersteller berechnet (Eurofins Genomics, Deutschland). Tm: Schmelztemperatur des Primers; GC: Anteil an Guaninen und Cytosinen des Primers.

Oligo-Name	Sequenz 5'-3'	Tm [°C]	GC [%]
5'-UTRvorwärts	CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTC	58.9	43
5'-UTRumkehr	CACCCGGACGAAACCTAGATGTGC	66.1	58
5'-UTR TaqMan-Sonde	FAM-TACTGTCGTTGACAGGACACGAGTAACTCGTCT BHQ1	70.6	48
SARS-CoV-2 nach vorne	CACACGTGGTTTATTACCCTGAC	58.0	36
SARS-CoV-2 Delta-Umkehrung	FAM-TCAAAAGTGCAATTATTCGCACTAG	58.1	36
SARS-CoV-2 UK-Stürmer	GTAATTAGGTGATGAAGTCAGAC	59.7	40
SARS-CoV-2 UK-Rückseite	CCACAACAGTTGCTGGTGCATGTAG	64.8	50

MOLEKULARE VERFOLGUNG VON DIE ZIRKULIERENDEN SARS-COV-2- STÄMME IN DIE TSCHHECHISCHE REPUBLIK

Wir haben 260 authentische SARS-CoV-2-Proben von symptomatischen Personen (keine klinischen Daten verfügbar), die zwischen September 2020 und April 2021 gesammelt wurden, mittels Sanger-Sequenzierung und Fragmentanalyse des SARS-CoV-2-S-Protein-Gens genomisch charakterisiert, was uns eine Unterscheidung ermöglichte drei unterschiedliche genomische Cluster von SARS-CoV-2, die direkt den einzelnen „Wellen“ entsprechen. Die für die Genotypisierung der einzelnen SARS-CoV-2-Stämme verwendeten Primer, die für alle zirkulierenden Stämme gelten, sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

Aus jedem der drei Cluster (September 2020, November 2020, Dezember 2020) wählten wir vier zufällige Vertreter aus und unterzogen sie einer NGS-Gesamtgenomsequenzierung (SRA Bioproject, Zugangsnummer PRJNA742374).

Sequenzierung des gesamten Genoms VON SARS-COV-2- ISOLATE MIT NGS

Vollständige RNA wurde aus authentischen Patientenproben mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Deutschland) gemäß den Empfehlungen des Herstellers isoliert. Die Gesamt-RNA wurde mit dem Verso cDNA-Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) revers transkribiert, und Tailing-Produkte, die das gesamte SARS-CoV-2-Genom abdeckten, wurden mit den ARTIC v3-Primern (IDT, USA) PCR-amplifiziert. Erhaltene PCR-Pools (Fragmente von etwa 400 bp) wurden unter Verwendung des QIAquick Gelextraktionskits (Qiagen, Deutschland) gelgereinigt und einem NGS-Bibliotheksaufbau unter Verwendung des NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent Kits (NEB, USA) unterzogen, gemäß die Herstellerangaben. Die Bibliotheken wurden unter Verwendung des Ion Plus Fragment Library Kits (Thermo Fisher Scientific, USA) quantifiziert, und ein 10 pM Bibliothekspool wurde als Matrize für die Emulsion verwendet

PCR (emPCR) mit Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Nach der Bead-Anreicherung (OT2-Instrument, Thermo Fisher Scientific, USA) wurde ein v316 NGS-Sequenzierungschip geladen, um eine ausreichende Basenabdeckung zu erhalten. Die NGS-Sequenzierung wurde unter Verwendung der Ion Torrent PGM-Plattform (Thermo Fisher Scientific, USA) unter Verwendung des Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit Chemistry (Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt. Die erhaltenen Rohdaten wurden end- und qualitätsgetrimmt und für den direkten Abgleich mit dem SARS-CoV-2-Referenzgenom (MT192773) verwendet, um genomische Mutationen zu identifizieren, die für die Wellen von September, November und Dezember 2020 charakteristisch sind.

Kontrollen

Alle durchgeführten Experimente umfassten internen Standard (Kontrolle), insbesondere das Humanalbumin-Transkript. Angesichts der Tatsache, dass die Quantifizierung ABSOLUT war, wurde der interne Standard nur verwendet, um die Qualität und Integrität der getesteten klinischen Proben zu bewerten. Daher wurde für die absolute Quantifizierung von SARS-CoV-2 in jeder klinischen Probe die oben angegebene Kalibrierungskurvengleichung verwendet, nicht die $\Delta\Delta Ct$ -Methode, die typischerweise für die RELATIVE Quantifizierung verwendet wird.

Ethik-Erklärung

Proben für die molekulare Routinediagnostik wurden nach Aufklärung und gemäß den gesetzlichen Richtlinien der Regierung in Bezug auf die COVID-19-Pandemie-Teststrategie entnommen, die von den überweisenden Kliniken herausgegeben und archiviert wurden. Anonymisierte Proben wurden gemäß der Deklaration von Helsinki verarbeitet.

Literaturische Rezension

Am 27. November 2020 reichte eine internationale Gruppe von 22 Wissenschaftlern (einschließlich UK, PB, RJK und KS dieses Papiers) einen externen Überprüfungsbericht ein (Borger et al., 2020) zusammen mit einem Widerrufs Antrag für das Charité-Protokoll (Corman et al., 2020) an die Redaktion von Eurosurveillance. Da Dokumente parallel sowohl auf einem wissenschaftlichen Preprint-Server als auch auf ResearchGate.net online gestellt wurden, lieferte die wissenschaftliche Gemeinschaft sowohl zusätzliche Referenzen als auch berechtigte Kritik am Fehlen experimenteller Nasslabordaten, die die von uns geäußerten Bedenken stützten. Diese Informationen wurden in einem Addendum zusammengefasst und am 11. Januar 2021 bei Eurosurveillance eingereicht. Alle Dokumente sind online verfügbar (Borger et al., 2020).

In unsere umfassende Diskussion beziehen wir Publikationen aus einer PubMed-Suche mit den Begriffen „PCR“ oder „RT-PCR“ oder „RT-qPCR“ und „SARS-CoV-2“ oder „COVID-19“ ein. Wir beziehen auch zahlreiche WHO-Empfehlungen in Bezug auf die Teststrategie ein, die auf der WHO-Webseite verfügbar sind.

Ergebnisse

Im Gegensatz zum von der WHO empfohlenen Charité-Protokoll, das 45 Zyklen ohne Definition eines Ct für positive versus negative Unterscheidung empfiehlt, aber zu einer hohen Rate falsch positiver Ergebnisse bei Ct >35 führt, übertraf der vorgeschlagene 5'-UTR-Assay das Charité-Protokoll deutlich hinsichtlich Spezifität (keine unspezifischen PCR-Produkte, auch bei Anwendung von 45 Zyklen) bei gleichzeitiger Beibehaltung der notwendigen Sensitivität. Im Gegensatz zu nachgeschalteten Genen, die anfällig für Mutationen sind, ist die genomische 5'-UTR-Sequenz entscheidend für die Regulierung der viralen Proteinsynthese durch den menschlichen Wirt und bleibt bei Coronaviren von Natur aus stabil (Yang & Leibowitz, 2015; Fields, 2021), da sie tut dies auch bei SARS-CoV-2 (Baldassarre et al., 2020; Miao et al., 2021; Mohammadi Dehcheshmeh et al., 2021). Daher konnten wir den 5'-UTR-Assay während der mutmaßlichen COVID-19-Pandemie unabhängig von der im Laufe der Zeit beobachteten Downstream-Genomheterogenität der einzelnen zirkulierenden Stämme (d. h. Alpha, Beta, Gamma, Delta und auch Omikron). Der 5'-UTR-Assay

zeichnet sich durch keinen falschen Hintergrund aus (dh eine negative Probe ist wirklich PCR-negativ). Insgesamt wurden 31.028 Proben getestet, von denen 2.737 positiv waren (8,8 %).

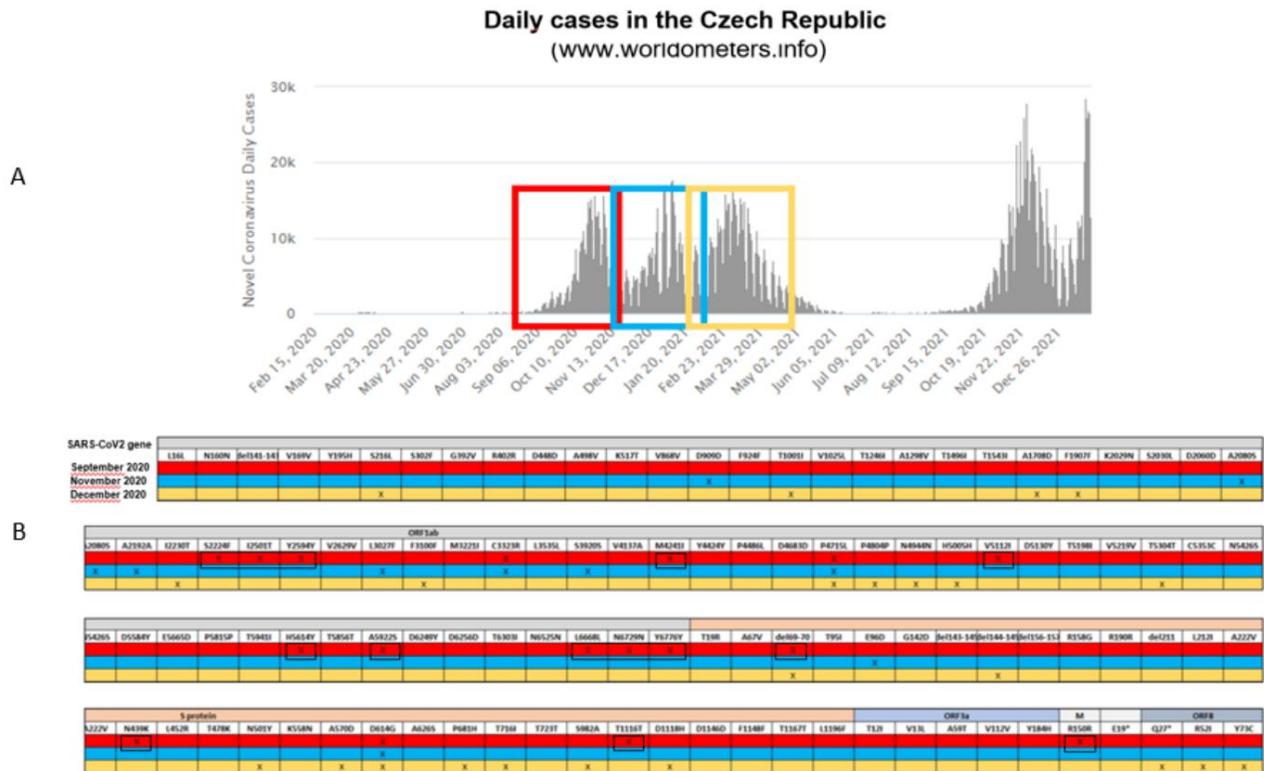


Abbildung 1. SARS-CoV-2-NGS-Gesamtgenomsequenzierungsdaten von drei zufällig ausgewählten repräsentativen Genomen, die zwischen September 2020 und April 2021 in der Tschechischen Republik gesammelt wurden. A. Einzelne SARS-CoV-2-Herbstwellen 2020 sind rot (September 2020), blau (November 2020) und gelb (Dezember 2020) hervorgehoben. Graph wurde von www.worldometers.info Open Source übernommen. B. Die Tabelle zeigt (von 5' bis 3') die wellenspezifischen SARS-CoV-2-Mutationen, die in den jeweiligen Genomen gefunden wurden (Orf1ab, S, Orf3a, M, Orf8). Mutationen werden in Aminosäuren übersetzt und durch ein schwarzes „x“ hervorgehoben. Schwarze Kästchen heben die Mutationen hervor, die im SARS-CoV-2-Stamm vom September 2020 vorhanden waren, aber im direkt folgenden SARS-CoV-2-Stamm vom November 2020 fehlten. Ein ähnliches Muster ist beim SARS-CoV-2-Stamm vom Dezember 2020 (bereits als „britisch“ oder später als „Alpha“ bezeichnet) erkennbar. Angesichts der Tatsache, dass das Territorium der Tschechischen Republik damals genetisch gesehen einem genetisch begrenzten Gebiet entsprach, ist die Beobachtung, dass die einzelnen Stämme nicht direkt genetisch miteinander verwandt waren, ziemlich erstaunlich.

Basierend auf unserer langjährigen Erfahrung auf dem Gebiet der quantitativen molekularen Mikrobiologie haben wir das folgende Routinekriterium zur Bewertung der klinischen Signifikanz der gemessenen SARS-CoV-2-Viruslast übernommen: Ct < 25, hoch positiv (> 10e6 Kopien/ml); Ct 25-30, positiv; Ct 30-35, positive Spuren, aber unwahrscheinlich infektiös; Ct >35, negativ, nicht infektiös (<10e2 Kopien/ml). Beachten Sie, dass die „Kopiennummern“ von Labor zu Labor unterschiedlich sein können, da es Unterschiede zwischen den Kopiennummern in einem PCR-Reaktionsröhrchen und in einer authentischen Patientenprobe gibt. Bei letzterem sind verschiedene Verdünnungsschritte zu beachten: In 1 ml Tupfer enthaltene RNA wird in 50 µl Elutionspuffer überführt, davon 4 µl für die cDNA-Synthese, davon 2 µl für die PCR-Reaktion. Wir haben neu kalibriert, indem wir das anfängliche Probenvolumen neu berechnet haben, um alle unsere PCR-Ergebnisse mit klassischen Standard-Zellkulturmessungen vergleichbar zu machen. Wir haben Ct 25 bewertet, um unserem Standard bei Ct 20 zu entsprechen (siehe **ergänzende Abbildung 2**), der den Probengrenzwert des Patienten für eine plausible Korrelation mit der infektiösen Viruslast darstellt.

Durch genomische Nachverfolgung und NGS-Gesamtgenomsequenzierung von zufälligen Vertretern aus jeder der drei Herbstwellen 2020 konnten wir zeigen, dass jede Welle durch einen anderen SARS-CoV-2-Stamm repräsentiert wurde. Tatsächlich waren Mutationen, die in der Welle vom September 2020 gefunden wurden, in den direkt folgenden Wellen vom November 2020 und Dezember 2020 (auch bekannt als „British“, „B.1.1.7.“ oder später „Alpha“) nicht vorhanden. Am deutlichsten ist der Unterschied zwischen dem SARS-CoV-2-Stamm vom September 2020 und dem November 2020.

Bemerkenswerterweise „verlor“ die Novemberwelle 14 Mutationen, die in der vorhergehenden Septemberwelle vorhanden waren (**Abbildung 1**).

Diskussion

Im Januar 2020 entwickelte eine Gruppe von Wissenschaftlern aus Europa und Hongkong (China) ein RT-PCR-Protokoll, das auf die WHO-Webseite hochgeladen wurde (WHO, 13. Januar 2020). vor der Veröffentlichung in Eurosurveillance (Corman et al., 2020). Dieses sogenannte Charité-Protokoll diente als Blaupause für die meisten nachfolgenden Protokolle zumindest in Europa und zielte darauf ab, „eine robuste diagnostische Methodik zu entwickeln und einzusetzen, die ihren Einsatz in einem Labor im öffentlichen Gesundheitswesen ermöglicht, ohne Virusmaterial zur Verfügung zu haben“.

Bereits zu diesem Zeitpunkt zeigte sich, dass die vorgeschlagene Zielsetzung aus folgendem Grund irreführend war: Spezifisches biologisches Material (hier das interessierende Virus) ist für die Sicherstellung der Spezifität und Sensitivität des Testdesigns unerlässlich, stand aber trotz seiner Notwendigkeit nicht zur Verfügung wurde bereits in der veröffentlichten Arbeit der chinesischen Wissenschaftler anerkannt, die maßgeblich für die Erstellung des Charité-Protokolls verantwortlich sind (Zhu et al., 2019; Ren et al., 2020). Darüber hinaus wurde ein ordnungsgemäßes Testdesign, das internationale Standards respektiert und äußerst spezifische Testmaterialien (Primer und Sonden) umfasst, vom Charité-Protokoll nicht erfüllt. Anstatt auf maximale Spezifität ohne Kreuzreaktivität ausgelegt und geprüft zu werden, erlaubte das Primer-Design des Charité-Protokolls einen gruppenspezifischen Nachweis verschiedener Coronaviren der Untergattung Sarbeco. Dies ist angesichts der Tatsache fraglich, dass chinesische Wissenschaftler bereits am 5. Januar 2020 die gesamte Genomsequenz des Wuhan-Virus mit der WHO geteilt hatten (WHO, 28.02.2020). und hatte die Sequenz des Genoms in voller Länge an die Nucleotide Database (NC_045512.1) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) übermittelt, wodurch die Etablierung hochspezifischer Primer und Sonden ermöglicht wurde. Das Charité-Protokoll und das Primer-Design basierten jedoch auf einem Satz synthetischer Sequenzen und dem SARS-CoV-Stamm Frankfurt-1 als Positivkontrolle, ohne die PCR-Produkte auch nur durch Sequenzierung zu verifizieren. Schlimmer noch, es wurde kein Cut-off-Fenster für den Ct-Wert in Bezug auf eine wohldefinierte, spezifische Viruslastkontrolle für eines der verschiedenen Zielgene bestimmt. Wie Puhach et al., (2022) Angemerkt sei, dass eine Viruslast von $1,00E+06$ RNA-Kopien nun allgemein akzeptiert wird, um mit der minimalen Viruslast infektiöser Personen zu korrelieren. Dies wurde bereits vom CCDC-Protokoll (2020) berichtet. und entsprach einem mittleren Ct-Wert von 25. In Bezug auf das Charité Sarbeco E-Gen entspricht die oben genannte RNA-Kopienzahl einem Ct-Wert von etwa 28,19, wurde aber nicht kommuniziert (Corman et al., 2020) Ct-Werte bis zu 45, die von kommerziellen Labors als positiv gemeldet werden, die Tür öffnen und damit „Wellen“ von unplausiblen (wahrscheinlich falschen) „positiven“ Testergebnissen anheizen.

Zusammenfassend wurde im Charité-Protokoll keine der erwarteten, normalerweise obligatorischen Anforderungen an einen „robusten diagnostischen Test“ in einer Standardarbeitsanweisung (SOP) erfüllt. Tatsächlich war die Notwendigkeit dieses Protokolls von Anfang an fraglich, weil das CCDC (2020; siehe auch Chan et al., 2020) hatte bereits am 3. Januar 2020 ein effizientes RT-PCR-Protokoll etabliert, das spezifische Kontrollproben beinhaltete.

Unverständlicherweise wurde dieses Protokoll auf der WHO-Webseite nach dem Charité-Protokoll hochgeladen und teilweise nur auf Chinesisch (WHO, 24.01.2021). Obwohl die Hinzufügung dieses chinesischen Teils in Englisch angemessen und wünschenswert gewesen wäre, hätte es immer noch nicht ausgereicht, um das Schlüsselproblem zu lösen: RT-PCR kann RNA nur in Fragmenten nachweisen, selbst in Fragmenten, die die intakte Zielregion eines positiven Amplikons enthalten.

Daher ist RT-PCR naturgemäß machtlos, zwischen replikationskompetenten, infektiösen Viren zu unterscheiden

Partikel und nicht infektiöse Reste von Virusgenomfragmenten, die im Grunde biologisches Rauschen im System darstellen (**Kasten 1**).

Angesichts der Tatsache, dass das Charité-Protokoll unter einem hohen unspezifischen Hintergrundrauschen litt, das falsch-positive Ergebnisse über einem Ct-Wert von 35 für alle Zielregionen verursachte, und weil ein solches suboptimales Design in der Routinediagnostik nicht vernünftigerweise verwendet werden kann, lehnten wir ab das Charité-Design und etablierte stattdessen einen neuen Assay. Während das Charité-Protokoll die Amplifikation von drei Zielsequenzen innerhalb des E-Gens, des RdRp-Gens (das per Nomenklatur das ORF1ab-Gen ist, das für das RdRp-Protein kodiert) und des N-Gens empfiehlt, zielt unser 5'-UTR-Assay nur auf Ziele eine zu amplifizierende Region, die jedoch aus der gut konservierten Sequenz innerhalb der 5'-UTR von SARS-CoV-2 besteht. Somit hat sich unser Testdesign als hochspezifisch erwiesen, ohne Empfindlichkeit gegenüber dem lauten Hintergrund relativ bedeutungsloser und nicht infektiöser Fragmente, wie durch Sanger-Sequenzierung der erhaltenen PCR-Amplikons bestätigt wurde.

BEWERTUNG VON DIE INFEKTIONISCHE VIRALLAST DURCH ZELLKULTUR, NICHT DURCH RT-PCR

Früherer Kontakt mit einem bestimmten Virus kann durch immunologische Tests überprüft werden, die nach einer Immunantwort im Wirt suchen, die durch das interessierende Virus ausgelöst wird und sich in spezifischen Antikörpern (z. B. IgM, IgG, IgA) oder T-Zellen manifestiert, die gegen das Antigen reagieren. Obwohl solche spezifischen Tests während der Pandemie sehr früh verfügbar waren (Amanat et al., 2020; Braun et al., 2020; Okba et al., 2020), Politiker weltweit übernahmen sie nicht in ihre Testpolitik, sondern förderten stattdessen molekulare Tests, die behaupteten, virale RNA mit RT-PCR oder später von viralem Protein mit Antigen-Schnelltests nachweisen zu können. Es ist bemerkenswert, dass die PCR eine sehr empfindliche Technik zur DNA-Amplifikation ist, die laut ihrem Erfinder Kary Mullis (1990) dient dazu, bestimmte Sequenzen (dh Gene) aus extrem kleinen Probenmengen innerhalb kurzer Zeit zu vervielfältigen (Mullis, 1990). RT-PCR zum Nachweis von RNA-Zielen erfordert jedoch die reverse Transkription von RNA, um sie in die DNA-Form umzuwandeln, für deren Nachweis PCR entwickelt wurde. Bei der quantitativen PCR (qPCR), wie sie bei der Testung auf SARS-CoV-2 angewendet wird, erfolgt die Genamplifikation im Massentest mit einem dritten Primer, der sogenannten Sonde, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und spezifisch bindet innerhalb der amplifizierten Zielsequenz. Bei Zerstörung der Sonde durch Polymerase während des Elongationsschritts wird ein Lichtsignal erzeugt, das als Ersatzmarker für Amplifikationsrunden verwendet wird (Bustin & Nolan, 2017; Lee, 2021).

Wichtig ist, dass die Probenvorbereitung vor allen PCR-Typen das vollständige Aufbrechen aller biologischen Strukturen erfordert, um Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und Zelltrümmer zu trennen. Extraktionsprotokolle und kommerzielle Kits zur RNA-Extraktion vor RT-PCR basieren hauptsächlich auf der sogenannten „Chomscynski“-Isolierung (Chomscynski & Sacchi, 1987), die Proben mit einer Mischung aus saurem Guanidiniumthiocyanat, Phenol und Chloroform so vollständig behandelt zerstört alle komplexen Organismen. Folglich kann jede PCR, auch wenn sie ordnungsgemäß durchgeführt wird, nur das Vorhandensein des fraglichen genetischen Ziels testen, nicht jedoch die „Lebensfähigkeit“ des zugrunde liegenden pathogenen Organismus. Daher kann die PCR keinesfalls als Maß für die Beurteilung der Infektiosität einer Person dienen.

Der Goldstandard zur Bestimmung der Infektiosität und der infektiösen Viruslast wird durch die Reproduzierbarkeit des interessierenden Virus in einer geeigneten Zellkultur dargestellt (Berczuk et al., 2020; Case et al., 2020; Puhach et al., 2022; EVAg- Portal; NIH BEI Resources Repository). Eine mögliche Replikationsaktivität eines Virus innerhalb eines getesteten Individuums kann durch einen RT-PCR-Assay bereitgestellt werden, der auf dem Nachweis von subgenomischen RNA (sgRNA)-Transkripten basiert, die nur während der Virusreplikation in infizierten Zellen erzeugt werden (Bruce et al., 2022; Puhach et al., 2022). Da sgRNA bis zu 17 Tage nach dem Nachweis der Infektion verifiziert wurde, weist das Fehlen von sgRNA auf das Fehlen einer viralen Replikation hin, das Vorhandensein von sgRNA weist jedoch nicht unbedingt auf Infektiosität hin (Bruce et al., 2022). Bemerkenswerterweise wurde eine sgRNA-spezifische RT-PCR für SARS CoV-2 in einem Manuskript beschrieben, das am 1. März 2020 von Wölfel et al., (2020) eingereicht wurde, was zusammen war

verfasst von den Erst- und Seniorautoren des Charité-Protokolls. Von diesem Zeitpunkt an hätten alle von der WHO empfohlenen Protokolle grundlegend geändert werden müssen. Sie waren nicht.

Generell kann die PCR jedoch zur Verbesserung der Differenzialdiagnostik beitragen, dh bei der Multiplex-Testung eines breiten Erregerspektrums zur Unterscheidung verschiedener pulmonaler Infektionen, die sich oft in ähnlichen klinischen Symptomen äußern. Wie bei jedem anderen Labortest muss das Ergebnis des PCR-Tests im Zusammenhang mit den Symptomen des Patienten interpretiert werden.

Da die PCR eine hochempfindliche Technik darstellt, konnte tatsächlich ein unterrepräsentierter Erreger innerhalb eines Erregergemisches nachgewiesen werden, das in einer Körperflüssigkeit oder einem Gewebe in einer Patientenprobe gefunden wurde, wie dies tatsächlich für zwei der ersten fünf COVID-19-Patienten in Wuhan berichtet wurde (Ren et al., 2020). Darüber hinaus können Reste in Form von verbleibenden Nukleinsäurefragmenten von SARS-CoV-2 oder einem anderen Coronavirus oder früheren Krankheitserreger, der früher vorhanden war, durch PCR nachgewiesen werden, nachdem das natürliche Immunsystem des Patienten bereits alle Infektionserreger beseitigt hat, und kann somit zu einem eindeutig positiven PCR-Signal führen, das eigentlich falsch ist (Puhach et al., 2022).

RT-PCR KANN MEDIZINISCHE DIFFERENTIALDIAGNOSEN NUR UNTERSTÜTZEN, ABER NICHT ERSETZEN

Zusammenfassend ist es wichtig, die Hauptprobleme im Zusammenhang mit PCR-basierten Labortests im Auge zu behalten:

- Erstens gibt es einen klaren Unterschied in der Schlüsselfrage zwischen klinischer und epidemiologischer Testung. Während klinische Tests auf eine hohe Sensitivität abzielen, um einen Infektionsverdacht bei einer symptomatischen Person zu bestätigen oder abzulehnen, zielen epidemiologische Tests auf den spezifischen Nachweis wirklich infektiöser Personen ab, die in der Lage sind, die Virusinfektion zu verbreiten. Da die PCR nicht in der Lage ist zu erkennen oder vorherzusagen, ob eine positiv getestete Person infektiös sein wird oder nicht (Puhach et al., 2022; **Box 1**), stellt es kein „robustes Diagnosetool“ dar. Dementsprechend sollten PCR-basierte Tests niemals zur Überwachung einer asymptomatischen gesunden Bevölkerung mit dem Ziel verwendet werden, Nukleinsäuresequenzen von SARS-CoV-2 oder einem anderen Virus „nachzuweisen“.
- Zweitens kann das PCR-Testergebnis keinesfalls eine gründliche medizinische Abwägung ersetzen Patientencharakteristika, dh Symptome, Kontaktanamnese, Komorbiditäten, Arzneimittelanamnese, Alter und Ct-Wert. COVID-19 teilt gemeinsame Symptome von Atemwegsinfektionen und konnte daher nicht anhand eines einzelnen eindeutigen Symptoms oder Zeichens genau diagnostiziert werden, wie kürzlich in einem Cochrane-Bericht veröffentlicht wurde (Struyf et al. 2020) .
- Drittens, selbst in dem Fall, in dem ein PCR-Test, wie unserer, sowohl eine hervorragende Spezifität als auch aufweist Empfindlichkeit bleibt das Risiko falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse, die durch technische und klinische Fehler entstehen können. Wie in einem systematischen Review und einer Metaanalyse berichtet wurde (Cevik et al., 2021), Die Infektionsperiode von SARS-CoV-2 scheint etwa zwei Tage nach der Exposition zu beginnen und dauert bis zu 12 Tage nach Auftreten der Symptome an. Im Gegensatz dazu kann die PCR laut CDC (2019a) bis zu 90 Tage lang positiv bleiben. Folglich sind PCR-positive Personen nicht unbedingt Personen, die das Virus übertragen können. Diese Diskrepanz wird in der Gruppe der positiv getesteten, aber asymptomatischen Personen deutlich, die niedrige anfängliche Zielzahlen und hohe Ct-Werte in der Testanzeige darstellen. Hier wird die überwiegende Mehrheit nicht infektiös sein, sondern klinische Fehlalarme darstellen, die sowohl genesene Personen, die noch Virusreste aufweisen, als auch immune Personen umfassen, die aufgrund einer unzureichenden Viruslast nicht ansteckend sind (Cevik et al., 2020 ; Lyon-Weiler, 2021). Eine umfassende Übersicht über das Problem klinischer falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse finden Sie in Abbildung 2 in Verna et al. (Verna et al., 2021). Vielmehr wird der PCR-Test, wie sowohl von der WHO als auch von CDC empfohlen, dem Arzt helfen, einen Anfangsverdacht zu bestätigen oder abzulehnen, ob ein symptomatischer Patient an einer möglichen SARS-CoV-2-Infektion leidet (WHO, 20.01.2021 ; CDCb; CDCc).

CT-WERT KORRELIERT MIT ZIELGENMENGE

Die Zyklusschwelle (Ct), auch Zyklusquantifizierung (Cq) genannt, ist die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz des amplifizierten PCR-Produkts spezifisch über dem Hintergrundsignal detektiert werden kann. Sie stellt ein Maß für die Menge einer bestimmten Nukleinsäuresequenz dar, die in der ursprünglichen Probe vorhanden war. Je niedriger der Ct-Wert, desto mehr Zielmaterial war anfänglich vorhanden.

Da reverse Transkription, Priming-Bedingungen und Sekundärstrukturen an den Primer-Bindungsstellen stochastische Prozesse darstellen, kann der Ct-Wert zwischen verschiedenen RT-PCR-Läufen und verschiedenen Labors variieren. Daher müssen Referenzgene in definierten Mengen eingeschlossen werden, um die relative Quantifizierung zwischen verschiedenen Studiengruppen zu messen. Dies stellt eine Mindestanforderung an ein „robustes Diagnosetool“ dar, wurde aber unerklärlicherweise von den Autoren des Charité-Protokolls nicht durchgeführt. Darüber hinaus erfordert die absolute Quantifizierung einer definierten Viruslast, die in einer bestimmten Probe vorhanden ist, die qPCR-Methodik mit einer Verdünnungsreihe bekannter Mengen an inaktiviertem Virus. Anschließend kann der Ct-Wert einer unbekannt Probe mit den Ct-Werten der Verdünnungsreihe korreliert und die Viruszahl abgeschätzt werden, um die Viruskopien pro ml – die sogenannte „Viruslast“ – zu bestimmen.

Für SARS-CoV-2 wurde es bereits im April 2020 gemeldet (Wölfel et al., 2020; gemeinsam verfasst von Erst- und Seniorautoren des Charité-Protokolls), dass ein Minimum von 106 RNA-Kopien/ml mit einer Viruslast vergleichbar ist, die zur Infektion einer ordentlichen Zellkultur verwendet werden kann und somit als „potentiell infektiös“ definiert wird. Bei der Durchführung von 45 PCR-Zyklen wurde beschrieben, dass das Charité-Protokoll laut Corman et al., (2020) nur vier RNA-Kopien pro Probe (ca. 103 RNA-Kopien/ml) nachweist. Einige kommerzielle Testkits geben eine Nachweisschwelle von 10 RNA-Kopien pro Probe an (Tib Molbiol). Dies ist ungefähr zwischen 103 und 10 empfindlicher als die infektiöse Viruslast, die erforderlich ist, um SARS-CoV-2 in einer geeigneten⁵-falten Zellkulturumgebung zu kultivieren. Unverständlicherweise zählt das Charité-Protokoll jede Probe mit einem eindeutig positiven PCR-Signal bis zu 45 Zyklen, ohne einen Ct-Cut-off-Wert zu definieren, der zwischen einer positiven/negativen Entscheidung unterscheidet, und ohne Korrelation zu Kontrollproben mit definierten RNA-Kopienzahlen. Im Gegensatz dazu korreliert unser 5'-UTR-Assay quantifizierte RNA-Kopienzahlen mit definierten Ct-Werten auf der Grundlage einer Kalibrierungskurve, die aus seriellen logarithmischen Verdünnungen des synthetischen SARS-CoV-2-Genoms mit genau vorgegebenen Konzentrationen der Zielsequenz erstellt wurde. Darüber hinaus wird eine Sequenzierung durchgeführt, um Amplikons zu bestätigen und die Art der Virusvariante zu bestimmen, die sich im Test zeigt. Wichtig ist, dass ein positives PCR-Signal per se keinen Rückschluss auf eine mögliche infektiöse Viruslast zulässt, wenn kein Ct-Wert angegeben ist und das Ergebnis nicht spezifisch auf eine definierte Standardkurve bezogen ist (Kohmer et al., 2021). Diese beiden Anforderungen müssen erfüllt sein. Ct-Werte unter 25 spiegeln mehr als 106 RNA-Kopien pro ml Probe wider, was mit einer potenziell infektiösen Viruslast korreliert werden kann.

In einer systematischen Übersichtsarbeit, die im Dezember 2020 veröffentlicht wurde von Jefferson et al. wurde vorgeschlagen, dass Proben mit Ct>25 nicht genügend genetisches Material enthalten, um mit einem infektiösen Potenzial zu korrelieren. Im Juni 2021 korrelierten Jaafar et al. 3.790 positive RT-PCR-Proben mit anschließenden erfolgreichen Zellkulturen. Diese Autoren zeigten, dass das Virus in 70 %, 20 % und 3 % der Proben kultiviert werden kann, wenn Ct-Werte von 25, 30 bzw. 35 angewendet werden. Im August 2021, Stang et al. berichteten, dass sich die Ct-Werte zwischen symptomatischen und asymptomatischen Probanden typischerweise um mehr als vier Zyklen unterscheiden (25,5 gegenüber 29,6). Sie kamen zu dem Schluss, dass der Ct-Wert zur Definition potenziell infektiöser Personen von 30 auf 25 gesenkt werden sollte.

ZIELGENZAHL UND SPEZIFITÄT

Um ein bestimmtes Virusgenom zuverlässig durch RT-PCR nachzuweisen, ist eine genau definierte, hochspezifische und ideal konservierte Zielregion zwingend erforderlich (wie wir sie in unseren 5'-UTR-Assay aufgenommen haben). Falls eine solche Region nicht identifiziert werden kann, müssen alternativ mehr als ein Gen oder eine spezifische Sequenz dieses Virus von unterschiedlichen Sätzen spezifischer Primer anvisiert werden. Das Charité-Protokoll (Corman et al., 2020) drei Zielgene zum Nachweis von SARS-CoV-2 richtig spezifiziert, nämlich das E-Gen, das RdRp-Gen (das das ORF-1ab-Gen ist, das für das RdRp-Protein kodiert) und das N-Gen. Die für das Ziel des Charité-E-Gens ausgewählten Primer wurden jedoch definiert als

spezifisch für die gesamte Sarbeco-Gruppe von Coronaviren, einschließlich SARS und von Fledermäusen stammende Sarbecoviren. Dieses Ziel erfüllt eindeutig nicht die Anforderungen für einen spezifischen SARS-CoV-2-Nachweis und wurde daher von der Analyse in einem Manuskript ausgeschlossen, in dem alle von der WHO empfohlenen RT-PCR-Protokolle von Tao et al. (2022) getestet wurden. Darüber hinaus wurde die Sonde aus dem RdRP-Target als „Pan-Sarbeco“ definiert, was sie als Test für SARS-CoV-2 noch weniger spezifisch macht.

Tabelle 2

Spezifität der SARS-CoV-2-Zielgene E, RdRp und N, bewertet in einem Ringversuch des Deutschen Instituts Instand (Zeichhardt & Kammel, 2020), die ein hohes Risiko falsch-positiver Ergebnisse, insbesondere durch Kreuzreaktivität, zeigt mit Erkältungs-Coronaviren wie HCoV 229E. *Zu beachten ist, dass HCoV229E zur Gattung alpha-Coronaviridae gehört, während SARS-CoV-2 und andere Sarbecoviren zur Gattung beta-Coronaviridae gehören. Die „Erkältungsviren“ HCoV-HKU1 und OC43 werden in die letztere Gattung eingeordnet, wobei ihre Genomorganisation den Sarbecoviren viel näher kommt (Liu et al., 2021), daher wäre eines dieser beiden Viren eine bessere Kontrolle gewesen.

Zielgen	Anzahl von Prüfungen mit unterschiedlichen Testkits	Spezifitätstest 1 Zellkultur (virenfrei) Korrekt als negativ identifiziert Fälle [%]	Spezifitätstest 2 Zellkultur (mit HCoV229E*) Korrekt identifiziert als SARS-CoV-2-negativ Fälle [%]	Bedeutung Spezifität aus Proben 1 und 2 [%]	Mittlere Fehlerquote (Fehlalarm) (100 – mittlere Spezifität) [%]
SARS CoV-2					
E-Gen	373	371 [99,46]	355 [95,17]	97.31	2.69
RdRP-Gen 182		178 [97,80]	165 [90,66]	94.23	5.77
N-Gen	166	164 [98,20]	146 [87,95]	93.08	6.92

Trotz der Tatsache, dass ihr Design angeblich darauf abzielte, nicht ausschließlich spezifisch für das neue SARS-CoV 2 zu sein, haben die Ziele, die sie zur Verstärkung ausgewählt haben, alle ihre eigene absolute Spezifität und Fehlerrate (Tabelle 2). Die Anzahl der falsch-positiven Ergebnisse kann für jedes einzelne Gen und auch für jede Kombination davon berechnet werden. Kurz gesagt: Das Risiko falsch positiver Ergebnisse bei unspezifischen Primern, wie sie im Charité-Protokoll verwendet werden, hängt von der Anzahl der getesteten Zielgene ab. Je weniger Zielgene getestet werden, desto mehr falsch-positive Ergebnisse werden generiert. Es ist daher völlig unverständlich, warum die WHO im Zuge der Pandemie empfohlen hat, die Zahl der Zielgene zu reduzieren, ohne die Spezifität des Primerdesigns zu verbessern. Im ursprünglichen Charité-Protokoll (veröffentlicht am 13.01.2020) wurde die Testung auf drei Zielgene (E-Gen, RdRp-Gen, N-Gen) von der WHO empfohlen (24.01.2021). Dadurch hätte die Anzahl der Fehlalarme begrenzt werden können. In der ersten Änderung (veröffentlicht am 17. Januar 2020) PCR-Nachweis des N-Gens (das spezifischste und in Verdünnungsreihen am wenigsten sensitiv nach Muenchhoff et al., 2020), und damit das am seltensten vorkommende falsch-positive Target, wurde weggelassen (WHO, 13. Januar 2020). Schlimmer noch, mit der zweiten Änderung (veröffentlicht am 2. März 2020), Die WHO empfahl, dass „in Gebieten, in denen das COVID-19-Virus weit verbreitet ist, ein einfacherer Algorithmus eingeführt werden könnte, in dem beispielsweise das Screening durch RT-PCR eines einzelnen diskriminierenden Ziels (dh des E-Gens) als ausreichend angesehen wird“. (2. März 2020). Diese Modifikationen – insbesondere die abschließende Empfehlung, auf das hochgradig unspezifische E-Gen als einziges Ziel zu testen – würden sicherlich das Risiko falsch positiver Ergebnisse erhöhen und damit die Fallzahlen in die Höhe treiben, und es würde wahrscheinlich auch die Anzahl falscher Ergebnisse erhöhen Negative (Finn & Lucey, 2021; Kanji et al., 2021; Pecoraro et al., 2021).

STRITTBARES PRIMER-DESIGN

Jeder zuverlässige RT-PCR-Assay hängt entscheidend von der Qualität der Primer ab, die entwickelt wurden, um die Region zu amplifizieren, die als spezifisches Ziel innerhalb einer Sequenz ausgewählt wurde. Für diagnostische Zwecke ist es wichtig, dass Primer zu 100 % spezifisch für die interessierende Sequenz sind, um eine Kreuzreaktivität mit nahezu homologen Sequenzen eng verwandter Gene zu vermeiden, bei denen es sich um Virusvarianten handeln kann (Bustin & Nolan, 2017). Wenn zwei oder mehr Primer-Sets angewendet werden, können die Amplifikationseffizienzen pro Primer-Set dennoch unterschiedlich sein. Dies kann aufgrund von Unterschieden in der Priming-Effizienz im Zusammenhang mit der Sekundärstruktur oder Stabilität zu unterschiedlichen Assay-Empfindlichkeiten führen (Chan et al., 2020). Das Charité-Protokoll beschreibt Primer, die bis zu sechs unspezifizierte Positionen enthalten. Die nicht spezifizierten Positionen führen zum Design mehrerer unterschiedlicher alternativer Primersequenzen (zwei unterschiedliche RdRp_SARSr_F-Primer + 8 unterschiedliche RdRp_SARS_P1-Sonden + 4 unterschiedliche RdRp). Außerdem teilt einer der N-Primer (Sequenz GCAGACGTGGTCCAGAACAAA) 10 Basen mit einer Sequenz des menschlichen Chromosoms-1 (Sequenz GCAGACTCTGAGGGGATGCCA), von denen sechs Basen am 3'-Ende liegen und daher ein hohes Risiko für unspezifisches Priming darstellen (Borger et al., 2020). Der RdRP-Reverse-Primer des Charité-Protokolls ist jedoch noch problematischer, da er zu 100 % identisch mit einer auf dem menschlichen Chromosom 18 vorhandenen Sequenz ist (Borger et al., 2020). Dies kann selbst bei völliger Abwesenheit jeglicher SARS-CoV-2-Sequenzen zu einer unbeabsichtigten PCR-Amplifikation führen. Darüber hinaus wurde berichtet, dass das RdRP-Gen problematisch ist, da es die niedrigste Rate positiver Nachweise und den höchsten Ct-Wert aufweist (Anantharajah et al., 2021; Zimmermann et al., 2022). Ein weiterer wichtiger Aspekt des PCR-Primerdesigns ist die Anlagerungstemperatur (T_m), die entscheidend vom GC-Gehalt der Primersequenz abhängt. Je niedriger die T_m , desto höher das Risiko falsch-positiver Ergebnisse. Außerdem sollte die T_m eines Primerpaars sehr nahe beieinander liegen, vorzugsweise nicht weiter als 2 °C auseinanderliegen, gemäß Bustin et al., (2009). Anzumerken ist, dass die oben erwähnte in-silico T_m -Prognose nur als erster Anhaltspunkt dient. Es kann nicht alle möglichen Sekundärstrukturen im breiteren genomischen Kontext der Matrize oder in der genauen Zusammensetzung von PCR-Mastermixen berücksichtigen, die Chemikalien enthalten, die die T_m von PCR-Hybriden beeinflussen, wodurch eine flexiblere Verwendung von Primern und Sonden ermöglicht wird, während angeblich die notwendige Strenge der Zielerkennung beibehalten wird. Trotz dieser beträchtlichen Flexibilität dank moderner PCR-Zusammensetzungen erfordert jedes PCR-Design am Ende ein Design, das absolut spezifisch und ausreichend sensibel ist – in den ISO13485-Richtlinien festgelegt und durch externe Qualitätsbewertung (in unserem Fall UK NEQAS) streng geprüft. Mehrere Primer des Charité-Protokolls weisen laut Borger et al. (2020) ein hohes Maß an T_m -Flexibilität auf und Corman et al., (2020). In diesem speziellen Fall wurde die T_m -Flexibilität der Primer jedoch von einer bemerkenswert suboptimalen Leistung des PCR-Assays im Hinblick auf die Spezifität begleitet. Für einen „robusten diagnostischen Test“ ist dies nicht akzeptabel. Daher hätte der Charité-Assay vor der weltweiten Implementierung neu konzipiert werden müssen.

VALIDIERUNG VON GENERIERTE AMPLICONS DURCH SEQUENZIERUNG IST OBLIGATORISCH

Die Bestimmung der absoluten Virusmenge in einer Patientenprobe, die notwendig ist, um den Ct-Wert mit der in der Zellkultur geschätzten infektiösen Viruslast zu korrelieren, erfordert eine quantitative PCR, die sich von einer qualitativen PCR unterscheidet. Qualitative PCR erzeugt ein definiertes Amplifikat, das normalerweise durch größenabhängige Analyse in einem Agarosegel nachgewiesen wird und dann als Matrize für die Sequenzanalyse verwendet werden kann. Bei der quantitativen PCR wird ein Ct-Wert generiert, der die Kinetik eines akkumulierten Fluoreszenzsignals darstellt, das mit dem Sondenabbau korreliert. Folglich ist bei diesem Verfahren keine Bestätigung der korrekten Amplifikation des Zielgens möglich. Insbesondere bei neu gestalteten Protokollen folgt auf die Amplifikation in der Regel ein Agarosegel und eine Sequenzanalyse, um die amplifizierte Sequenz zu bestätigen. Obwohl die vollständige oder zumindest teilweise Genomsequenzierung von der WHO empfohlen wird (19.03.2020; 8. Januar 2021; 20. Januar 2021), die Autoren des Charité-Protokolls haben diesen wichtigen Bestätigungsschritt, dh die Sanger-Sequenzierung, nicht aufgenommen.

Daher wurde die Spezifität der in ihrem Protokoll verwendeten Primer und Sonden, die für eine zuverlässige zielspezifische Amplifikation erforderlich wären, nie hergestellt (Corman et al., 2020) .

Bemerkenswerterweise war bereits im April 2020 in der wissenschaftlichen Gemeinschaft bekannt, dass das Charité-Protokoll unter Spezifitätsproblemen „unbekannter Herkunft“ litt (Konrad et al., 2020) . Auch unter standardisierten Laborbedingungen konnten Autoren des Charité-Protokolls (Corman et al., 2020) berichteten selbst, dass vier positive Proben nach einem erneuten Test negativ waren, was das klassische Beispiel für falsch positive Ergebnisse oder zufällige Laborkontaminationen mit PCR-Produkten aufgrund von Handhabungsproblemen darstellt. Die Tatsache, dass die Autoren ihre Fehlalarme tatsächlich als „Handhabungsprobleme“ erklärten, die sogar ganz am Anfang des Charité-Protokolls in einer Laborumgebung mit erfahrenem Personal auftraten, wirft ernsthafte Fragen zu Kontaminationsraten in großen staatlichen Labors sowie in auf neu gegründete kommerzielle Labore, die seit Beginn der sogenannten „Pandemie“ unter Druck gesetzt wurden, viele PCR-Tests durchzuführen.

Um die Zuverlässigkeit verschiedener Labors zu bewerten, die angeblich dasselbe PCR-Protokoll verwenden, wurde daher ein Experiment von Muenchhoff et al., (2020) durchgeführt. Sie reichten sieben teilnehmenden Labors eine Verdünnungsreihe einer SARS-CoV-2-PCR-positiven Probe ein. Alle sieben berichteten, dass alle Proben bei einem Ct \geq 32 negativ waren. Die Autoren berichteten:

„Basierend auf Berechnungen mit Primer Express v3.0 (Applied Biosystems, Dreieich, Deutschland) wurden Annealingtemperaturen von 64 °C für den RdRp-Vorwärtsprimer und 51 °C für den RdRp-Rückwärtsprimer des Charité-Protokolls vorhergesagt. Dieser Temperaturunterschied kann zu einer verringerten PCR-Effizienz führen.“

Trotz dieser Tatsachen kamen die Autoren zu folgendem Schluss:

„Die Mehrheit der untersuchten RT-PCR-Assays für SARS-CoV-2 wies fünf RNA-Kopien pro Reaktion nach, was eine hohe Sensitivität und ihre Eignung für weltweite Screening-Zwecke widerspiegelt.“

Diese Schlussfolgerung ist gültig, wenn die PCR-Empfindlichkeit allein betrachtet wird. Die berichtete bemerkenswerte Empfindlichkeit weist jedoch auf das Risiko hin, selbst kleine Rückstände einer früheren Infektion zu verstärken. Dies ist für ein diagnostisches Werkzeug, das darauf abzielt, auf positive und negative Personen zu testen, nicht geeignet. Die Auswirkungen der daraus resultierenden Fehler können tödlich sein. Daher ist bei RT-PCR-Tests die Spezifität weitaus wichtiger (Klement & Bandyopadhyay, 2021). Hervorragende Spezifität für die Zielgene in Kombination mit empfindlichen Ct-Werten (\leq 25) sind die Merkmale, die für einen robusten und zuverlässigen PCR-Test erforderlich sind.

Eine weitere bekannte diagnostische Herausforderung ist das Auftreten von Mutationen und neuen Virusvarianten. Ihre Existenz erfordert eine regelmäßige Validierung und möglicherweise ein Primer-Redesign, um potenzielle Primer-Proben-Fehlpaarungen zu vermeiden. Dies wurde von Osorio und Mitarbeitern demonstriert, die 1825 SARS-CoV-2-Genomsequenzen, die in der GISAID-Datenbank (März 2020) hinterlegt waren, mit der Wuhan-Hu-1-Referenzsequenz (NC_045512) abgeglichen haben. Anschließend kommentierten sie in den Alignments die Bindungsstellen von 33 Oligonukleotiden, die von der WHO für die Verwendung in der RT-PCR freigegeben wurden, und stellten fest, dass etwa 79 % der analysierten Primer-Bindungssequenzen Mutationen in mindestens einem Zielgen aufwiesen (Osorio et al., 2020).

Darüber hinaus bestätigten unsere eigenen NGS-Daten, die von Oktober 2020 bis Januar 2021 in der Tschechischen Republik generiert wurden, dass die Validierung eines PCR-basierten diagnostischen Tests durch Sequenzierung obligatorisch ist. Nicht nur in der Anfangsphase der Gründung, sondern auch danach regelmäßig. Die Notwendigkeit eines solchen Ansatzes wurde durch unsere NGS-Daten deutlich, die zeigten, dass jede der drei einzelnen Wellen, die im Oktober 2020, November 2020 und Dezember 2020/Januar 2021 in der Tschechischen Republik ihren Höhepunkt erreichten, sich genomisch von der vorangegangenen Welle unterschied. Obwohl SARS-CoV-2 eine hohe Mutationsrate aufweist, konnten wir mit unserem 5'-UTR-Assay alle zirkulierenden Stämme, dh Alpha, Beta, Gamma, Delta und Omicron, zuverlässig identifizieren.

Interessanterweise waren Mutationen, die in der September-2020-Welle gefunden wurden, in den direkt folgenden Wellen von November 2020 und Dezember 2020 nicht vorhanden. Diese Diskrepanz ist bei der Omicron-Variante, der Berichten zufolge keine direkte evolutionäre Verbindung zu einer der vorherigen SARS-CoV-2-Varianten besteht, vollständig offensichtlich geworden (Sun et al., 2022 ; auch Perez et al., 2023 in dieser Zeitschrift). Dies ist mehr als seltsam angesichts der Tatsache, dass die Tschechische Republik alle Beschränkungsmaßnahmen umgesetzt hatte, nämlich Sperrung, massiv eingeschränktes Reisen, soziale Distanzierung und Gesichtsmasken. Auf diese Weise verhielt sich das Territorium der Tschechischen Republik wie eine genetisch begrenzte, isolierte Bevölkerung, die eine solche SARS-CoV-2-Vielfalt nicht unterstützen würde. Nachfolgende Wellen, die in einem begrenzten Bereich entstehen, sollten nämlich alle aufeinanderfolgenden Mutationen ihrer Vorgänger tragen. Es könnte während seiner Evolution weitere Mutationen erwerben, aber logischerweise kann es Mutationen, die in früheren Wellen derselben Virusfolge aufgetreten sind, nicht auf magische Weise löschen. Noch seltsamer war die Tatsache, dass der beobachtete Unterschied zwischen den SARS-CoV-2-Stämmen vom September 2020 und November 2020 am deutlichsten war. Die eigentümliche Entwicklung bestand darin, dass die Novemberwelle 14 Mutationen „verlor“, die in der unmittelbar vorangegangenen Septemberwelle vorhanden waren. Über diese ungewöhnlichen genomischen Eigenschaften der aufeinanderfolgenden SARS-CoV-2-„Wellen“ können wir jedoch nur spekulieren, aufgrund der verfügbaren Literatur zur reversen Genetik von RNA-Viren (Perez, 2017) und insbesondere darüber, wie einfach es ist, infektiöse Coronaviren genetisch zu manipulieren (Cockrell et al., 2017; Muth et al., 2018), künstliche oder menschengemachte Eingriffe können nicht ausgeschlossen werden.

GUTE LABORPRAXIS ERFORDERLICH A STANDARDOPERATIONSVERFAHREN (SOP)

Die hohe Empfindlichkeit der PCR-basierten Technologie geht mit einem schwerwiegenden Engpass in der Leistung einher. Selbst bei einer Testspezifität von 100 %, was einer falsch-positiven Rate von 0 % gleichkommt, bezieht sich das Ergebnis ausschließlich auf eine fehlende Reaktion mit anderen Sequenzen als dem/den ausgewählten Ziel(en). Diese in zertifizierten Labors berechnete analytische Spezifität kann jedoch nicht mit der Spezifität in realen Tests gleichgesetzt werden, bei denen Verunreinigungen, die sich ebenfalls exponentiell verstärken, und Handhabungsfehler durch ungeschultes Personal unvermeidlich zur Generierung falsch positiver Ergebnisse führen. Zum Beispiel Layfield und Kollegen (2021) berichteten falsch-positive Proben in einer Plattenkarte, die sich neben Proben mit hoher Viruslast (Ct < 20) befanden. Wenn sich die Positivitätsrate der Falsch-Positiv-Rate nähert, sinkt außerdem die Zuverlässigkeit eines positiven Testergebnisses gegen Null. Dies ist besonders wichtig, wenn die Prävalenz niedrig ist, da es mehr nicht infizierte als infizierte Personen gibt. In diesem Szenario haben kleine Änderungen der Spezifität einen viel größeren Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit, dass eine positiv getestete Person die Infektion hat, als Schwankungen der Sensitivität (Cohen et al., 2020).

Um Fehler zu vermeiden, die jeder Laboranalyse inhärent sind, müssen Nachweisverfahren immer mit einer zuverlässigen SOP kombiniert werden, die von kompetenten Forschern sorgfältig entwickelt wurden. Der RT-PCR-Test ist nur dann als diagnostisches Hilfsmittel zum Virennachweis geeignet, wenn er auf allen Ebenen standardisiert und kontrolliert ist. Eine SOP ist unerlässlich, wenn fehlerhafte Ergebnisse weitestgehend ausgeschlossen werden sollen. Für den Nachweis von SARS-CoV-2 sollte die SOP ein anonymisiertes Panel von Testproben enthalten, die inaktiviertes Virusmaterial enthalten, das von einem externen Anbieter (d. h. einem Referenzlabor) bereitgestellt wird, eine Negativprobe und Proben mit eng verwandten Viren, um auf Spezifität prüfen (diese Proben müssen negativ bleiben). Idealerweise sollte die SOP auch eine Verdünnungsreihe von inaktivierten Viren enthalten, um die Sensitivität des Tests zu bestimmen (wobei der Ct-Wert der infektiösen Viruslast entspricht). Im Kontext einer weltweiten Pandemie können die erforderlichen Anforderungen nur erfüllt werden, indem ein solches Verfahren experimentell auf seine weltweite Gültigkeit getestet wird. Letztere Gültigkeitsvoraussetzung kann nur in einem sogenannten Ringversuch erfüllt werden (**Kasten 2**).

Box 2: Interne Kontrollen für jeden RT-PCR-Lauf sollten enthalten:

- § ein leerer Tupfer, um eine Kontamination während der Probenentnahme auszuschließen;
 - § eine RNA-Extraktionskontrolle, um eine korrekte RNA-Isolierung sicherzustellen;
 - § Negativkontrolle nur mit den Kitkomponenten zum Schutz vor Kontamination durch Produktion oder klinische Kits;
 - § ein „waterproof“ als interne Negativkontrolle;
 - § ein Referenzgen (z. B. humane RNaseP) als interne positive Kontrolle;
 - § Positivkontrollen von inaktiviertem SARS-CoV-2, isoliert aus Zellkulturüberständen, um den Ct-Wert mit der Kopienzahl der replikationsfähigen infektiösen Viruslast zu korrelieren, zB durch Plaque-Assays (Mendoza et al., 2020) . Dies umfasst (1) eine Konzentration, die der infektiösen Viruslast (107) mit einem Ct < 30 in allen amplifizierten Zielgenen entspricht, und (2) eine Sonde, die einer nicht infektiösen Konzentration (z. B. 5 x 105) entspricht, um Definieren Sie den Ct-Wert, oberhalb dessen die RT-PCR negative Ergebnisse erzielt.
- Diese Positivkontrollen müssen einer Qualitätskontrolle unterzogen werden, da das Virus in die Zelllinie involviert wird und neu auftretende Viren möglicherweise nicht widerspiegelt.
- § Kreuzreaktivitätskontrolle (muss negativ bleiben), z. B. „normale saisonale Grippe“ Coronavirus-Linien, wie z OC43 und 229E, die wie SARS-CoV-2-Positivkontrollen bei einer Viruslast von 107 inaktiviert wurden . Idealerweise sollten dies Sanger-Sequenz-erprobte Target-Negativkontrollen menschlicher Proben sein.

Die Notwendigkeit einer SOP wurde durch Studien in Deutschland deutlich, die von Instand eV, einer Organisation, die Zertifikate für gute Laborpraxis vergibt, koordiniert wurden. Ihr erster Ringversuch zur Validierung der Charité RT PCR, an dem 488 Labore beteiligt waren, zeigte erhebliche Probleme (Zeichhardt & Kammel, 2020). Bemerkenswerterweise wurden bei einem laufenden Ringversuch drei von sieben Proben aus dem Blindpanel ausgeschlossen, weil „dringende Anfragen aus dem In- und Ausland, die Eigenschaften der zu prüfenden Proben vor Ablauf der verlängerten Einreichungsfrist offenzulegen, d.h. vor dem 28.04.2020, damit Labore bei möglichen Fehlmessungen kurzfristig ihr Prüfverfahren verbessern können.“ Das Eingreifen in ein Ringverfahren ist sehr unüblich und der Bericht kann nicht als unabhängiges externes Validierungsverfahren der beteiligten Labore angesehen werden. Eine weitere Sorge, auch bei diesem kontrollierten Ringversuchsverfahren mit bereits vorbereiteten Proben und reduziertem Testumfang, sind Probenverwechslungen in 24 Laboren, die interessanterweise immer die gleiche SARS-CoV-2-positive Sonde betrafen die Kontrollsonde mit dem Erkältungs-Coronavirus HCoV229E (Zeichhardt & Kammel, 2020). Schließlich wurde festgestellt, dass der Nachweis der Zielgene enorme Unterschiede zwischen den Labors in Bezug auf die Ct-Werte aufwies. Beispielsweise lagen die Ct-Werte für dieselbe verdünnte Probe von SARS-CoV-2 (Probennummer 340061) zwischen 15–40 für das E-Gen, 20–40,7 für das N-Gen und 19,5–42,8 für das RdRp- Gen. Offensichtlich demonstrieren die stark unterschiedlichen Ct-Werte für die verschiedenen Gen-Targets, die auf dem gleichen Target basieren, die unterschiedliche Sensitivität der Targets und werden stark vom initialen Amplifikationserfolg beeinflusst. Da die PCR ein 2-logarithmischer Prozess ist, wird jedes kleine anfängliche Problem ebenfalls logarithmisch zunehmen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer Kontrollstandardkurve, die in jede PCR aufgenommen werden muss, um die Ergebnisse zu bewerten. Zusammen demonstrieren diese Daten eindrucksvoll einen extremen Mangel an Teststandardisierung innerhalb der teilnehmenden, zertifizierten Labore. Da es keine weltweite (oder zumindest EU-weite oder USA-weite) SOP gibt, können wir uns nur die enorme Variation vorstellen, die in Labors entsteht, die „SARS-CoV-2-RNA“ in echten Patientenproben nachweisen.

Abschluss

**DIE VERLETZUNG VON PRINZIPIEN VON GUTER WISSENSCHAFTLICHER PRAXIS ERMÖGLICHTE POLITIK, SICH ZU BEWERBEN
NICHT BEWEISBASIERTE MEDIZIN AN GANZEN BEVÖLKERUNGEN**

Das Charité-Protokoll verstößt gegen alle international anerkannten Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis (**Kasten 3**). Zunächst wurden die für die RT-PCR verwendeten Primer und Sonden an Testunternehmen, dh Labor Berlin und Tib Molbiol, weitergeleitet und als Light Mix Diagnostic Test Kits, dh LightMix® Modular SARS-CoV-2/COVID-19, kommerziell verfügbar gemacht, RdRp; LightMix® Modular SARS-CoV 2/COVID-19, E-Gen; Tib Molbiol, Roché Diagnostics vor der wissenschaftlichen Veröffentlichung und ohne diese Tatsache und den damit verbundenen Interessenkonflikt in der wissenschaftlichen Veröffentlichung zu erwähnen. Zweitens wurde das Testprotokoll als Richtlinie der WHO online veröffentlicht (WHO, 24. Januar 2021) vor Peer-Review und Veröffentlichung in Eurosurveillance (Corman et al., 2020). Erst dann wurde es einem schnellen 24-Stunden-Peer-Review unterzogen, das durch die bevorstehende Pandemie im Nachhinein gerechtfertigt wurde. Trotzdem gab es am 21. Januar 2020, dem Tag der Einreichung des Manuskripts, weltweit nur sechs Todesfälle (Our World in Data). Darüber hinaus war das Tib Molbiol LightMix Kit bereits eine Woche vor Veröffentlichung des Charité-Protokolls in Slowenien erhältlich (Poljak et al., 2020). Damals wurde kein einziger Fall von SARS-CoV-2 in Europa dokumentiert (Our World in Data). Drittens sind zwei der Autoren Mitglieder des Redaktionsausschusses von Eurosurveillance, ein anderer ist Geschäftsführer von Tib Molbiol, während ein weiterer leitender Forscher bei GenExpress und wissenschaftlicher Berater von Tib Molbiol ist – keiner dieser potenziellen Interessenkonflikte wurde damals offengelegt Einreichen des Manuskripts (Borger et al., 2020).

Die Vernachlässigung international anerkannter Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis führte zur Veröffentlichung eines stark fehlerhaften Labortests. Anschließend wurden positive RT-PCR-Ergebnisse auch ohne Krankheitssymptome mit „COVID-19-Fällen“ gleichgesetzt. Ein „Fall“ impliziert jedoch Symptome und Diagnose einer Krankheit, hier COVID-19, nicht das Vorhandensein von (Teilen von) SARS-CoV-2. Auch aus wissenschaftlicher Sicht machten die täglichen Meldungen von sogenannten „neuen Fällen“ oder „Neuinfektionen“ keinen Sinn, da weder festgestellt wurde, ob es sich um „neue Fälle“ noch „ansteckend“ handelte. Die hohe Sensitivität der PCR ermöglicht den Nachweis von Virusfragmenten jeglicher Herkunft, aber PCR kann keine „Fälle“ oder „Infektionen“ diagnostizieren. Tatsächlich ist mehr als die Hälfte der positiven Testergebnisse wahrscheinlich nicht infektiös (Jaafar et al., 2021). Nichtsdestotrotz führten Regierungen Quarantänen für gesunde Menschen ein und installierten Lockdowns mit erheblichen Kollateralschäden für Bevölkerungen und Volkswirtschaften weltweit, basierend auf einem zutiefst fehlerhaften RT-PCR-Labortest.

Als Folge der fehlenden Korrekturleseaktivität der Polymerase wird die Nukleotid-Mutationsrate von SARS-CoV-2 auf $8E-04$ -Substitutionen pro Standort und Jahr geschätzt (The Open Science Prize, 2020). Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass neue genetische Variationen von SARS-CoV-2 sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität etablierter RT-PCR-Assays beeinträchtigen könnten. Dies ist umso wahrscheinlicher, als nachweislich 8,5 % aller Mutationen (neue Nukleotidunterschiede) in SARS-CoV-2-Varianten auf der ganzen Welt auf bekannte PCR-Primer-Orte kartieren (Penarrubia et al., 2020). Daher empfehlen wir eine kontinuierliche Überwachung der genomischen Variationen, um schnell reagieren zu können, falls ein Assay-Redesign erforderlich ist.

Aus Sicht der nationalen öffentlichen Gesundheit sollten die Behörden daher eine ständige Überwachung der Sanger-Sequenzierung von RT-PCR-positiven und -negativen, symptomatischen Personen verlangen, um im Laufe der Zeit Zerfälle in Sanger-positiv und Sanger-negativ zu erkennen, um ein evolutionäres PCR-Escape zu verhindern. Hier sollten die offiziellen Zahlen der Fallschätzungen basierend auf dem Verlust von Sanger-positiv nach unten und basierend auf dem Verlust von Sanger-negativ (beide mit Konfidenzintervallen berichtet) nach unten angepasst werden.

Zusammenfassend umfassen positive Testergebnisse eine Mischung aus echten COVID-19-Fällen (d. h. Kontakt mit SARS-CoV 2 mindestens 9 Tage vor dem Test, wahrscheinlich ansteckend mit Symptomen einer Atemwegserkrankung), unwahren Fällen (d. h. Kontakt mit Virus oder Virusfragmente vor weniger als 9 Tagen, wahrscheinlich nicht infektiös, manchmal mit Symptomen) und falsche Fälle (gesund, sicher nicht infektiös). Die Verteilung dieser drei Kategorien hängt von Laborunterscheidungen, verwendeten Kits, Fähigkeiten der Techniker usw. ab. Wir sprechen uns daher entschieden gegen die Verwendung der RT-PCR-Technologie zur Messung von „Fällen“ oder „Infektionen“ ohne angemessene und unabhängige „altmodische“ ärztliche Diagnose. Wir kommen zu dem Schluss, dass die Anwendung dieser Technologie als bevölkerungswieites Massentestinstrument die COVID-19-Pandemie unnötig übertrieben und verlängert hat und in ähnlichen Zukunftsszenarien unterlassen werden sollte.

Kasten 3: Zu den international anerkannten Grundsätzen guter wissenschaftlicher Praxis gehören:

- formale Aspekte, z. B. gründliche Überprüfung von Forschungsergebnissen durch unabhängige Gutachter vor der Veröffentlichung und Äußerung eines bestehenden Interessenkonflikts aller Art durch alle Co-Autoren, z. B. Projektförderung durch die pharmazeutische Industrie,
- Forschungsaspekte, z. B. die Implementierung eines gültigen Protokolls, einschließlich positiver und negativer Kontrollen, sowie die Bestätigung der Ergebnisse und der Einsatz geeigneter und solider Techniken,
- Qualitätssicherung und Festlegung von Standards. Letztere sind von besonderer Bedeutung bei der Entwicklung neuer Methoden oder diagnostischer Tests, insbesondere wenn ein Testergebnis über die Behandlung eines Patienten entscheiden kann.

MANGELVONTRANSPARENZ WAR UND NOCH

ISTEIN ALLGEGENWÄRTIGER BEGLEITER

VONDAS ENDE DER KRISE

HOCHINDEM SIE MEHR SCHADEN ALS NUTZEN VERURSACHEN

Zwei Leitartikel des BMJ argumentierten, dass Politiker und Regierungen während COVID-19 die Wissenschaft unterdrückten, um die kommerzielle Verfügbarkeit von Diagnostika und Behandlungen zu beschleunigen (Abbasi, 2020; Jureidini & McHenry, 2022). Während angesichts einer drohenden „Killervirus-Pandemie“ die Veröffentlichung und Vermarktung eines suboptimalen RT-PCR-Tests zum Nachweis von SARS-CoV-2 verteidigt werden kann, müssen alle nach der Veröffentlichung entdeckten Fehler und unangemessenen wissenschaftlichen Standards unverzüglich gemeldet und korrigiert werden. Antrag auf Widerruf des Charité-Protokolls (Corman et al., 2020) auf der Grundlage von zehn formalen und technischen Bedenken wurde im November 2020 der Eurosurveillance-Redaktion vorgelegt, scheint aber nie ernsthaft geprüft worden zu sein (Borger et al., 2020). Der Antrag wurde in einer Online-Erklärung auf der Grundlage von fünf nicht offengelegten Expertenbewertungen abgelehnt, obwohl keines der Bedenken angemessen berücksichtigt wurde (Anmerkung der Redaktion Euroüberwachung).

Darüber hinaus wurde ein Nachtrag mit 20 von Experten begutachteten veröffentlichten Artikeln, die diese Bedenken unterstützen, nicht einmal erwähnt. Der anschließende Appell, die Peer-Review-Berichte der fünf Peer-Reviewer offenzulegen, wurde von der Eurosurveillance-Redaktion abgelehnt und verstieß damit gegen zentrale wissenschaftliche Standards, die einen transparenten Peer-Review-Prozess garantieren, um einen ehrlichen wissenschaftlichen Dialog zu ermöglichen. Warum sie sich nicht dafür entschieden haben, die wissenschaftliche Gemeinschaft über mögliche Mängel und Fallstricke des Charité-Protokolls zu informieren, bleibt unklar.

Schließlich mangelt es den Entscheidungsprozessen der WHO an Transparenz, da 12 Jahre nach der Schweinegrippe noch immer unklar ist, warum die WHO die Definition einer Pandemie modifiziert hat. Nach der alten Definition wäre es überhaupt nicht möglich gewesen, COVID-19 zu einer Pandemie zu erklären. Unverständlich ist auch, warum die WHO nicht gleich eine englische Version des vom CCDC entwickelten RT-PCR-Tests veröffentlicht hat, sondern einen anderen europäischen Test. Eine weitere unbeantwortete Frage ist

Warum hat die WHO nicht sofort über die Bedeutung des Ct-Werts und der Interpretation der RT-PCR-Testergebnisse berichtet, als die PCR-Technologie als „Goldstandard“ zum Nachweis von SARS-CoV-2 angenommen wurde? Warum haben sie dies erst ein ganzes Jahr nach Ausbruch der Pandemie getan (WHO, 20. Januar 2021)? Warum machten einflussreiche Wissenschaftler wie Marion Koopmanns und Anthony Fauci nicht auf den Missbrauch der PCR als sogenannten „Goldstandard“ zum Nachweis „infektioser“ Personen aufmerksam, obwohl sie es doch besser wissen müssten, wie sie demonstrierten in Interviews und Podcasts (siehe **Box 1**)? Wenn der Mangel an Transparenz nicht auf wissenschaftlicher Ignoranz beruht, was wir für eine vernünftige Schlussfolgerung halten, scheint es sich um einen unerwünschten Eingriff der Politik in Wissenschaft und medizinische Praxis zu handeln. Wenn ja, wäre dies störend. Zumindest die Wissenschaft selbst muss sich um jeden Preis frei halten von politischen Ideologien, von Dogmen und von finanziellen Interessen.

Danksagungen Wir danken

den zahlreichen Mitgliedern der wissenschaftlichen Gemeinschaft, die wertvolle Informationen zur Verfügung gestellt haben, aber entweder anonym bleiben oder im Text zitiert werden. Vielen Dank an Sin Hang Lee, PhD, und James Lyons-Weiler, PhD, für ihre Hilfe als Reader-Editoren.

Autorenbeiträge

UK, SP, PB, KS: Studiendesign. SP: NGS-Analyse. RJK, RL, KS: Entwurf überprüfen. Alle Autoren waren an der Sichtung der Literatur und der Erstellung des Manuskripts beteiligt.

Funding Statement RL

wurde gefördert durch das Forschungs- und Innovationsprogramm Horizon 2020 der Europäischen Union unter der Finanzhilfvereinbarung Nr. 883441, Projekt STAMINA (Demonstration intelligenter Entscheidungsunterstützung für die Vorhersage und das Management von Pandemiekrissen innerhalb und über europäische Grenzen hinweg). Kein anderer Autor hat für diese Forschung eine spezifische Förderung von einer Fördereinrichtung im öffentlichen, kommerziellen oder gemeinnützigen Sektor erhalten.

Konkurrierende Interessenerklärung

SP ist Eigentümer und Leiter der Tilia Laboratories, die sich auf Diagnostik und Forschung in molekularer Mikrobiologie und Genetik konzentrieren. RL, Erasmus MC und BioCoS haben eine Vereinbarung über gemeinsames Eigentum in Bezug auf SARS-CoV-2-Nachweismethoden unterzeichnet. Alle anderen Autoren erklären, dass sie für die eingereichte Arbeit von keiner Organisation Unterstützung erhalten haben; dass sie in den letzten drei Jahren keine finanziellen Beziehungen zu Organisationen hatten, die ein Interesse an der eingereichten Arbeit gehabt haben könnten; und sie haben keine anderen Beziehungen, noch haben sie sich an Aktivitäten beteiligt, die auch nur den Anschein haben könnten, dass sie die eingereichte Arbeit beeinflusst haben.

Verweise

- Abbasi, K. (2020). COVID-19: Politisierung, „Korruption“ und Unterdrückung der Wissenschaft. *British Medical Journal* 71m4425. <https://doi.org/10.1136/bmj.m4425>.
- Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S. et al. (2020). Ein serologischer Assay zum Nachweis der SARS-CoV-2-Serokonversion in Menschen. *Naturmedizin* 26: 1033–1036. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5>.
- Anantharajah, A., Helaers, R., Defour, JP, Olive, N., Kabera, F., Croonen, L. et al. (2021). Wie man das Richtige wählt Echtzeit-RT-PCR-Primersets für den SARS-CoV-2-Genomnachweis? *Journal of Virological Methods* 295:114197. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114197>.

- Baldassarre, A., Paolini, A., Bruno, SP, Felli, C., Tozzi, AE & Masotti, A. (2020). Potenzielle Nutzung von nichtkodierenden RNAs und innovative therapeutische Strategien, um auf die 5'-UTR von SARS-CoV-2 abzielen. *Epigenomics* 12:1349–1361. <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0162>.
- Basile K., Maddocks, S., Kok, J. & Dwyer, DE (2020.) Accuracy amidst ambiguity: false positive SARS-CoV-2 Nucleic Säuretests, wenn die COVID-19-Prävalenz niedrig ist. *Pathologie* 52:809-811. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2020.09.009>.
- Berczuk, AC, Salvatore, SP, Seshan, SV, Patel, SS, Bussel, JB, Mostyka, M. et al. (2020). COVID-19-Lungenpathologie: eine multiinstitutionelle Autopsie-Kohorte aus Italien und New York City. *Moderne Pathologie* 33:2156-2168. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-00661-1>.
- Borger, P., Malhotra, BR, Yeadon, M. et al. (2020). Externe Begutachtung des RTPCR-Tests zum Nachweis von SARS-CoV-2 enthüllt 10 große wissenschaftliche Mängel auf molekularer und methodischer Ebene: Konsequenzen für falsch positive Ergebnisse. <https://web.archive.org/web/20220122062141/https://cormandrostenreview.com/report/>. [Originallink <https://cormandrostenreview.com/report> nicht länger verfügbar].
- Braun, J., Loyal, L., Frentsch, M. et al. (2020). SARS-CoV-2-reaktive T-Zellen bei gesunden Spendern und Patienten mit COVID-19. *Natur* 587: 270–274. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>.
- Bruce, EA, Mills, MG, Sampoleo, R., Perchetti, GA, Huang, ML, Despres, HW et al. (2022). Vorhersagen Infektiosität: Vergleich von vier PCR-basierten Assays zum Nachweis von kultivierbarem SARS-CoV-2 in klinischen Proben. *EMBO Molekulare Medizin* 14:e15290. <https://doi.org/10.15252/emmm.202115290>.
- Bustin, SA, Benes, V., Garson, JA, Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M. et al. (2009). Die MIQE-Richtlinien: Mindestinformationen für die Veröffentlichung von quantitativen Real-Time-PCR-Experimenten. *Klinische Chemie* 55:611-22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Bustin, S. & Nolan, T. (2017). Talking the talk, but not walking the walk: RTqPCR als Paradigma für den Mangel an Reproduzierbarkeit in der molekularen Forschung. *Europäische Zeitschrift für klinische Untersuchung* 47:756-774. <https://doi.org/10.1111/eci.12801>.
- Fall, JB, Bailey, AL, Kim, AS, Chen, RE & Diamond, MS (2020). Wachstum, Nachweis, Quantifizierung und Inaktivierung von SARS-CoV-2. *Virologie* 548: 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.05.015>.
- CDC (2019a). Vorläufiger Leitfaden für SARS-CoV-2-Tests an Arbeitsplätzen außerhalb des Gesundheitswesens. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/community/organizations/testing-non-healthcare-workplaces.html> .
- CDC (2019b). Vorläufige Leitlinien für Antigentests auf SARS-CoV-2. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#previous>.
- CDC (2021c). 2019-neues Coronavirus (2019-nCoV) Echtzeit-RT-PCR-Diagnosepanel. Nur für den Notfall. Gebrauchsanweisung. <https://www.fda.gov/media/134922/download>.
- Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J. & Peiris, M. (2020). Virologie, Übertragung und Pathogenese von SARS-CoV-2. *British Medical Journal* 371:m3862. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3862>.
- Cevik, M., Tate, M., Lloyd, O., Maraolo, AE, Schafers, J. & Ho, A. (2021). SARS-CoV-2-, SARS-CoV- und MERS-CoV-Viruslastdynamik, Dauer der Virausscheidung und Infektiosität: eine systematische Überprüfung und Metaanalyse. *Lanzettenmikrobe* 2:e13-e22. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30172-5).
- Chan, JFW, Yip, CCY, To, KKW, Tang, THC, Wong, SCY, Leung, KH et al. (2020). Verbesserte molekulare Diagnose von COVID-19 durch den neuartigen, hochempfindlichen und spezifischen COVID-19-RdRp/He1-Echtzeit-Reverse-Transkriptions-PCR-Assay, validiert in vitro und mit klinischen Proben. *Journal of Clinical Microbiology* 58:e00310-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>.
- China-CDC. (2020). Labortests für COVID-19. [<http://wjw.wuhan.gov.cn/front/web/showDetail/2019123108989> soll jetzt verfügbar sein unter

https://en.chinacdc.cn/special/COVID19_Response/discoveries_guidelines/202205/t20220516_259215.html was aber der Link zum PowerPoint scheint nirgendwohin zu führen; später geändert in <http://www.chinacdc.cn/en/COVID19/202003/P020200323390321297894.pdf>, aber zum Zeitpunkt des Schreibens dieses Artikels funktioniert keiner dieser Links. Daher haben wir die pdf-Datei als separates Dokument unter <https://doi.org/10.56098/ijvtr.v3i1.74> bereitgestellt .

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Einstufiges Verfahren zur RNA-Isolierung durch saure Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>.

Cockrell, AS, Beall, A., Yount, B. & Baric, R. (2017) Reverse Genetics of RNA Viruses: Efficient Reverse Genetic Systems for Rapid Genetic Manipulation of Emergent and Preemergent Infectious Coronaviruses. *Methods in Molecular Biology* 1602, S. 59-81, Humana Press.

Cohen, AN, Kessel, B. & Milgrom, MG (2020). Diagnose einer SARS-CoV-2-Infektion: Die Gefahr, sich zu sehr darauf zu verlassen positive Testergebnisse. medRxiv Vorabdruck. <https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20080911>.

Corman, VM, Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, DKW, Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, ML, Mulders, DGJC, Haagmans, BL, van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, JL, Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, MPG4 & Drosten, C. (2020). Nachweis des neuartigen Coronavirus 2019 (2019-nCoV) durch Echtzeit-RT-PCR. *Eurosurveillance* 25:2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.

Coronaviridae-Studiengruppe des Internationalen Komitees für die Taxonomie von Viren. (2020). Das mit dem schweren akuten respiratorischen Syndrom in Verbindung stehende Coronavirus der Art: Klassifizierung von 2019-nCoV und Benennung von SARS-CoV-2. *Naturmikrobiologie* 5: 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>. Vorabdruck vom 11. Februar 2020: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.07.937862v1>.

Doshi, P. (2010). Weitere wechselnde Webseiten bei der WHO. Schnelle Reaktionen auf: Die WHO wird wegen der Schweinegrippe-Pandemie des „weinenden Wolfs“ beschuldigt. *British Medical Journal* 340:c1904. <https://doi.org/10.1136/bmj.c1904>.

Redaktionelle Anmerkung Eurosurveillance. (3. Dezember 2020). <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.48.2012031>.

EVAg-Portal. https://www.european-virus-archive.com/evag-portal?portal_search=SARS-CoV20272&advanced_ictv_tax_search.

Fauci, A. (30.12.2021). <https://www.youtube.com/watch?v=bAICMQ1D5F8>.

Fields, BN, Knipe, DM, Howley, PM & Griffin, DE (2001). *Fields Virology*, 4. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia.

Finn, K. & Lucey, B. (2021). Fehldiagnose von SARS-CoV-2: eine kritische Überprüfung des Einflusses von Probenahme und klinischen Nachweismethoden. *Medizinische Wissenschaften* 9:36. <https://doi.org/10.3390/medsci9020036>.

Hedges, K. & Lasco, G. (2021). Medizinischer Populismus und COVID-19-Tests. *Offene Anthropologieforschung* 1:73-86. <https://doi.org/10.1515/opan-2020-0109>.

Jaafar, R., Aherfi, S., Wurtz, N., Grimaldier, C., Hoang, TV, Colson, P. et al. (2021). Korrelation zwischen 3790 quantitative Polymerase-Kettenreaktion-positive Proben und positive Zellkulturen, einschließlich 1941 schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus 2-Isolate. *Klinische Infektionskrankheiten* 72:e921. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491>.

Jefferson, T., Spencer, EA, Brassey, J. & Heneghan, C. (2020) Viruskulturen für das Infektionspotenzial von COVID-19 Bewertung - eine systematische Überprüfung. *Klinische Infektionskrankheiten* 3:ciaa1764. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1764>.

Jiang, S., Shi, Z., Shu, Y., Song, J., Gao, GF, Tan, W. & Guo, D. (2020). Für das Neue braucht es einen eindeutigen Namen Coronavirus. *Die Lancette* 395:949. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30419-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30419-0).

Jureidini, J. & McHenry, LB (2022). Die Illusion einer evidenzbasierten Medizin. *British Medical Journal* 376:o702. <https://doi.org/10.1136/bmj.o702>.

- Kanji, JN, Zelyas, N., MacDonald, C., Pabbaraju, K., Khan, MN, Prasad, A. et al. (2021). Falsch-Negativ-Rate von COVID-19-PCR-Tests: eine diskordante Testanalyse. *Virologie Journal* 18:13. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01489-0>.
- Klement, RJ & Bandyopadhyay, PS (2021). Die Epistemologie eines positiven SARS-CoV-2-Tests. *Acta Biotheoretica* 69:359-375. <https://doi.org/10.1007/s10441-020-09393-w>.
- Kohmer, N., Rabenau, HF, Hoehl, S., Kortenbusch, M., Ciesek, S. & Berger, A. (2021). Vergleichende Analyse von Point-of-Care-, Hochdurchsatz- und laborentwickelte SARS-CoV-2-Nukleinsäure-Amplifikationstests (NATs). *Journal of Virological Methods* 291:114102. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114102>.
- Koopmans, M. (26.11.2020). <https://www.youtube.com/watch?v=fIsF7trvq2c>.
- Konrad, R., Eberle, U., Dangel, A., Treis, B., Berger, A., Bengs, K. et al. (2020). Schnelle Etablierung der Labordiagnostik für das neuartige Coronavirus SARS-CoV-2 in Bayern, Deutschland, Februar 2020. *Eurosurveillance* 25:pil=2000173. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000173>.
- Layfield, LJ, Camp, S., Bowers, K. & Miller, DC (2021). SARS-CoV-2-Nachweis durch Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionstest: Analyse falsch positiver Ergebnisse und Empfehlungen für Maßnahmen zur Qualitätskontrolle. *Pathology Research Practice* 225:153579. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153579>.
- Lee, SH (2021). qPCR ist nicht PCR, genauso wie eine Zwangsjacke keine Jacke ist – die Wahrheit, die durch falsch positive SARS-CoV-2-Testergebnisse enthüllt wird. *Forschungsinfortext* 02:230–278. <https://researchinfotext.com/article-details/qPCR-is-not-PCR-Just-as-a-Straightjacket-is-not-a-Jacket-the-Truth-Revealed-by-SARS-CoV-2-False-Positive-Test-Ergebnisse>.
- Lee, SH (2022). Evidenzbasierte Bewertung der PCR-Diagnostik für SARS-CoV-2 und die Omicron-Varianten durch Gold Standard-Sanger-Sequenzierung. *Wissenschaftliche Gesundheitspolitik und das Gesetz* 4:144-189. <https://www.publichealthpolicyjournal.com/about-7>.
- Liu, DX, Liang, JQ & Fung, TS (2021). Menschliches Coronavirus-229E, -OC43, -NL63 und -HKU1 (Coronaviridae). *Enzyklopädie Virologie*, S. 428–440. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X>.
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H. et al. (2020). Genomische Charakterisierung und Epidemiologie des neuartigen Coronavirus 2019: Implikationen für Virusursprung und Rezeptorbindung. *Lancet* 395: 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).
- Lyons-Weiler, J. (2021). Die Risikobilanz bei COVID-19 zeigt die extremen Kosten von Fehlalarmen. *Internationale Zeitschrift of Vaccine Theory Practice and Research* 1:209–222. <https://doi.org/10.56098/ijvtr.v1i2.15>.
- Mendoza, EJ, Manguiat, K., Wood, H. & Drebot, M. (2020). Zwei detaillierte Plaque-Assay-Protokolle zur Quantifizierung von infektiösem SARS-CoV-2. *Aktuelle Protokolle in der Mikrobiologie* 57:ecpmc105. <https://doi.org/10.1002/cpmc.105>.
- Miao, Z., Tidu, A., Eriani, G. & Martin, F. (2021). Sekundärstruktur der SARS-CoV-2 5'-UTR. *RNA-Biologie* 18:447-456. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1814556.P6>.
- Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Moghbeli, SM, Rahimirad, S., Alanazi, IO, Shehri, ZSA & Ebrahimie, EA (2021). Die transkriptionsregulatorische Sequenz in der 5'-untranslatierten Region von SARS-CoV-2 ist für die Virusreplikation mit einem veränderten Evolutionsmuster gegenüber humanen hemmenden Mikro-RNAs von entscheidender Bedeutung. *Zellen* 10:319. <https://doi.org/10.3390/cells10020319.P4>.
- Münchhoff, M., Mairhofer, H., Nitschko, H., Grzimek-Koschewa, N., Hoffmann, D., Berger, A. et al. (2020). Multizentrischer Vergleich quantitativer PCR-basierter Assays zum Nachweis von SARS-CoV-2, Deutschland, März 2020. *Eurosurveillance* 5:pil=2001057. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.24.2001057>.
- Mullis, KB (1990). Zielamplifikation für die DNA-Analyse durch die Polymerase-Kettenreaktion. *Annalen der Biologie Clinique* 48:579-582. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2288446/>.

- Muth, D., Corman, VM, Roth, H. et al. (2018). Abschwächung der Replikation durch eine Deletion von 29 Nukleotiden beim SARS-Coronavirus, das in den frühen Stadien der Übertragung von Mensch zu Mensch erworben wurde. *Wissenschaftliche Berichte* 8:15177. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33487-8>.
- Nationales Zentrum für Infektionskrankheiten und das Kapitel der Ärzte für Infektionskrankheiten, Akademie für Medizin, Singapur. (23. Mai 2020). Online verfügbar: <https://www.ncid.sg/Documents/Period%20of%20Infectivity%20Position%20Statementv2.pdf>.
- New York Times. (22. Januar 2007). <https://www.nytimes.com/2007/01/22/health/22whoop.html>.
- NIH. BEI-Ressourcen-Repository. <https://www.niaid.nih.gov/research/bei-resources-repository>.
- Okba, NMA, Müller, MA, Li, W., Wang, C., Geurtsvan-Kessel, C, H, Corman, VM et al. (2020) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-spezifische Antikörperreaktionen bei Patienten mit Coronavirus-Krankheit. *Neu auftretende Infektionskrankheiten* 26: 1478-1488. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841>.
- Ong, SWX, Chia, T. & Young, BE (2022). SARS-CoV-2-Varianten besorgniserregend und Impfstoffflucht, von Alpha bis Omikron und darüber hinaus. *Expertenbericht zur Beatmungsmedizin* 16. <https://doi.org/10.1080/17476348.2022.2057299>.
- Osorio, NS & Correia-Neves, M. (2020). Auswirkungen der Entwicklung von SARS-CoV-2 auf die Sensitivität diagnostischer RT-qPCR-Assays. *Lancet Infectious Diseases* 28:166-167. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30435-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30435-7).
- Unsere Welt in Daten. <https://ourworldindata.org/explorers/coronavirus-data-explorer>.
- Paul-Ehrlich-Institut. (2020). <https://www.pei.de/DE/newsroom/hp-news/2020/200323-COVID-19-nat-tests.html>.
- Pecoraro, V., Negro, A., Pirotti, T. & Trenti, T. (2021). Schätzen Sie falsch-negative RT-PCR-Raten für SARS-CoV-2. Eine systematische Übersichtsarbeit und Metaanalyse. *Europäische Zeitschrift für klinische Untersuchung* 52:e13706. <https://doi.org/10.1111/eci.13706>.
- Penarrubia, L., Ruiz, M., Porco, R., Rao, SN, Juanola-Falgarona, M., Manissero, D., López-Fontanals, M & Pareja, J. (2020). Mehrere Assays in einem Echtzeit-RT-PCR-SARS-CoV-2-Panel können das Risiko eines Sensitivitätsverlusts durch neue Genomvarianten während des COVID-19-Ausbruchs mindern. *Internationale Zeitschrift für Infektionskrankheiten* 97:225-229. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.027>.
- Perez, DR (2017). *Reverse Genetik von RNA-Viren: Methoden und Protokolle. Methoden in der Molekularbiologie* 1602. Humana-Presse. ISBN: 978-1-4939-6964-7.
- Perez, JC, Moret-Chalmin, C., & Montagnier, L. (2023). Auftreten einer neuen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit: 26 Fälle der menschlichen Version des Rinderwahns, wenige Tage nach einer COVID-19-Injektion. *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*, 3(1), 727–770. <https://doi.org/10.56098/ijvtp.v3i1.66>
- Poljak, M., Korva, M., Knap-Gašper, N., Komloš, KF, Sagadin, M., Uršij, T., et al. (2020). Klinische Bewertung des Cobas SARS-CoV-2-Tests und Wechsel der diagnostischen Plattform während 48 Stunden inmitten der COVID-19-Pandemie. *Zeitschrift für klinische Mikrobiologie* 58: e00599-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00599-20>.
- Puhach, O., Meyer, B. & Eckerle, I. (2022). SARS-CoV-2-Viruslast und Shedding-Kinetik. *Nature Reviews Microbiology* 21:147–161. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>.
- Ren, LL, Wang, YM, Wu, ZQ, Xiang, ZC, Guo, L., Xu, T. et al. (2020). Identifizierung eines neuartigen Coronavirus, das beim Menschen eine schwere Lungenentzündung verursacht: eine beschreibende Studie. *Chinesisches Medizinjournal* 133: 1015–1024. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000722>.
- Reusken, C., Broberg, EK, Haagmans, B., Meijer, A., Corman, VM, Papa, A. et al. (2020). Laborbereitschaft und Reaktion auf das neuartige Coronavirus (2019-nCoV) in Fachlabors in 30 EU-/EWR-Ländern, Januar 2020. *Eurosurveillance* 25:2000082. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000082>.
- Reuters. (31. Dezember 2019). <https://www.reuters.com/article/us-china-health-pneumonia-idUSKBN1YZ0GP>.

- Risi, GF, Bloom, ME, Hoe, NP, Arminio, T., Carlson, P., Powers, T., Feldmann, H., & Wilson, D. (2010). Vorbereitung eines Gemeinschaftskrankenhauses auf die arbeitsbedingte Exposition gegenüber Infektionserregern in Laboratorien der Biosicherheitsstufe 3 und 4. *Neu auftretende Infektionskrankheiten*, 16(3), 373–378. <https://doi.org/10.3201/eid1603.091485>
- Skittrall, JP, Wilson, M., Smielewska, AA, Parmar, S., Fortune, MD, Sparkes, D., Curran, MD, Zhang, H. & Jalal, H. (2020). Spezifität und positiver Vorhersagewert von SARS-CoV-2-Nukleinsäure-Amplifikationstests in einem Umfeld mit niedriger Prävalenz. *Klinische Mikrobiologie & Infektion* 14:S1198-743X(20)30614-5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.10.003>.
- Stang, A., Robers, J., Schonert, B., Jöckel, KH, Spelsberg, A., Keil, U. & Cullen, P. (2021). Die Leistungsfähigkeit des SARS-CoV-2 RT-PCR-Tests als Instrument zum Nachweis einer SARS-CoV-2-Infektion in der Bevölkerung. *Journal of Infection* 83:237-279. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.05.022>.
- Struyf, T., Deeks, JJ, Dinnes, J., Takwoingi, Y., Davenport, C., Leeftang, MM et al. (2020). Anzeichen und Symptome zu festzustellen, ob ein Patient, der sich in der Primärversorgung oder in ambulanten Einrichtungen eines Krankenhauses vorstellt, an einer COVID-19-Krankheit leidet. *Cochrane Database Systematic Reviews* 7:CD013665. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013665>.
- Sun, Y., Lin, W., Dong, W. & Xu, J. (2022). Ursprungs- und Evolutionsanalyse der SARS-CoV-2-Omicron-Variante. *Zeitschrift für Biosicherheit und Biosicherheit* 4: 3337. <https://doi.org/10.1016/j.jobbb.2021.12.001>.
- Tan, W., Zhao, X., Ma, X., Wang, W., Niu, P., Xu, W. et al. (2020). Notizen aus der Praxis: Ein neuartiges Coronavirus-Genom, das in einer Gruppe von Lungenentzündungsfällen identifiziert wurde – Wuhan, China 2019–2020. *China CDC Weekly* 2:61-62. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.017>.
- Tao, Y., Yue, Y., Qiu, G., Ji, Z., Spillman, M., Gai, Z. et al. (2022). Vergleich der analytischen Sensitivität und Effizienz für SARS-CoV-2-Primer-Sets durch TaqMan-basierte und SYBR Green-basierte RT-qPCR. *Angewandte Mikrobiologie und Biotechnologie* 106:2207-2218. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11822-4>.
- Tib Molbiol. Gebrauchsanweisung. LightMix® Modular Wuhan CoV RdRP-Gen. Katze nein. 53-0777-96. https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_53-0777_96_Wuhan-R-gene_V200204_09155376001%20%282%29.pdf.
- The Open Science Prize, Nextstrain: Real-time tracking of pathogen evolution. *Genomische Epidemiologie des neuartigen Coronavirus*. 2020. <https://nextstrain.org/ncov>.
- Verna, R., Alallon, W., Murakami, M., Hayward, CPM, Harrath, AH, Alwasel, SH et al. (2021). Analytisch Leistung von COVID-19-Nachweismethoden (RT-PCR): wissenschaftliche und gesellschaftliche Bedenken. *Leben* 11:660-676. <https://doi.org/10.3390/life11070660>.
- Wernike, K., Keller, M., Conraths, FJ, Mettenleiter, TC, Groschup, MH & Beer, M. (2020). Fallstricke bei SARS-CoV-2 PCR-Diagnostik. *Grenzüberschreitende und neu auftretende Krankheiten* 14:10.1111/tbed.13684. <https://doi.org/10.1111/tbed.13684>.
- WER. (2003) Konsensdokument zur Epidemiologie des schweren akuten respiratorischen Syndroms (SARS). [Originallink <https://www.who.int/csr/sars/en/WHOconsensus.pdf> wurde nach https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70863/WHO_CDS_CSR_GAR_2003.11_eng.pdf übertragen].
- WER. (13. Januar 2020). https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay/v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf?sfvrsn=d381fc88_2.
- WER. (30. Januar 2020). <https://www.paho.org/en/news/30-1-2020-who-declares-public-health-emergency-novel-Coronavirus>.
- WER. (28. Februar 2020). [https://www.who.int/publications/i/item/report-of-the-who-china-joint-mission-on-Coronavirus-Krankheit-2019-\(COVID-19\)](https://www.who.int/publications/i/item/report-of-the-who-china-joint-mission-on-Coronavirus-Krankheit-2019-(COVID-19)).
- WER. (2. März 2020). Labortests für die Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19) in Verdachtsfällen beim Menschen. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331329/WHO-COVID-19-laboratory-2020.4-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- WER. (11. März 2020). <https://www.paho.org/en/news/11-3-2020-who-characterizes-COVID-19-pandemic>.

- WER. (16. März 2020). [https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-Bemerkungen-beim-Medienbriefing-zu-COVID-19---16. März 2020](https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-Bemerkungen-beim-Medienbriefing-zu-COVID-19---16.-März-2020).
- WER. (19. März 2020). Labortests auf Coronavirus-Krankheit (COVID-19) bei Verdachtsfällen beim Menschen. <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501>.
- WER. (8. Januar 2021). Genomische Sequenzierung von SARS-CoV-2: ein Leitfaden zur Implementierung für maximale Wirkung auf die Öffentlichkeit Gesundheit. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018440>.
- WER. (20. Januar 2021). Informationshinweis für Benutzer 2020/05: Technologien für Nukleinsäuretests (NAT), die verwenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von SARS-CoV-2. <https://www.who.int/news/item/20-01-2021-who-information-notice-for-ivd-users-2020-05>.
- WER. (24. Januar 2021) <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf>. [Originallink <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf> wurde entfernt, da die WHO am 24.01.2021 einzelne Protokolle in einer pdf-Datei mit dem Original zusammengefasst hat Protokoll der Charité vom 17.01.2020 auf den Seiten 60-72].
- Wölfel, R., Corman, VM, Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, MA et al. (2020). Virologische Bewertung von Krankenhauspatienten mit Covid-2019. *Natur* 581: 465–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>.
- Yang, D. & Leibowitz, JL (2015). Die Struktur und Funktionen der genomischen 3´- und 5´-Enden des Coronavirus. *Virusforschung* 206:120-133. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.025>.
- Zeichhardt, M. & Kammel, M. (2020). Kommentar zum Extra Ringversuch Gruppe 340 Virusgenom-Nachweis SARS-CoV-2. <https://corona-ausschuss.de/wp-content/uploads/2020/07/Instand-Ringversuch-Virus-Nachweisgenom-SARS-CoV-2.pdf>.
- Zimmermann, F., Urban, M., Krüger, C., Walter, M., Wölfel, R. & Zwirgmaier, K. (2022). In-vitro-Bewertung der Wirkung von Mutationen in Primer-Bindungsstellen auf den Nachweis von SARS-CoV-2 durch RT-qPCR. *Journal of Virological Methods* 299:114352. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114352>.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J. et al. (2020). Ein neuartiges Coronavirus von Patienten mit Lungenentzündung in China. *New England Journal of Medicine* 382:727-733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.

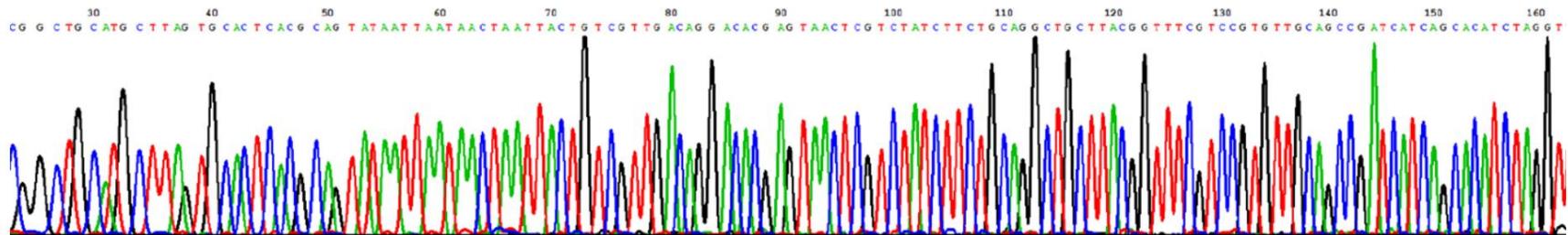
Haftungsausschluss

Die Informationen auf der Website und im **IJVTPR** sind nicht als Diagnose, empfohlene Behandlung, Vorbeugung oder Heilung für menschliche Leiden oder medizinische Verfahren gedacht, auf die in irgendeiner Weise Bezug genommen wird. Benutzer und Leser, bei denen es sich um Eltern, Erziehungsberechtigte, Betreuer, Kliniker oder Verwandte von Personen handeln kann, die von den genannten krankhaften Zuständen, Verfahren oder Protokollen betroffen sind, müssen ihr eigenes Urteil über bestimmte Anwendungen fällen. Die beitragenden Autoren, Herausgeber und Personen, die in irgendeiner Funktion mit der Website und/oder der Zeitschrift in Verbindung stehen, lehnen jegliche Haftung oder Verantwortung gegenüber natürlichen oder juristischen Personen für Schäden, finanzielle Verluste, Körperverletzungen oder andere Strafen ab, die sich aus einer Nutzung ergeben können oder Anwendung in jeglichem Kontext von Informationen, Schlussfolgerungen, Forschungsergebnissen, Meinungen, Fehlern oder Aussagen, die auf der Website oder im **IJVTPR zu finden sind**. Das präsentierte Material wird allen Benutzern, die daran interessiert sein könnten, es zu untersuchen, kostenlos angeboten, aber wie sie einen Teil davon anwenden, liegt in der alleinigen Verantwortung des Betrachters/Benutzers. Wenn Material zitiert oder nachgedruckt wird, werden die Benutzer gebeten, die Quelle/den Autor anzugeben und die nichtkommerziellen, keine Ableitungen, Anforderungen der [Creative Commons License 4.0 NC ND](#) einzuhalten oder einer anderen Lizenz, die Vorrang vor ihr hat.

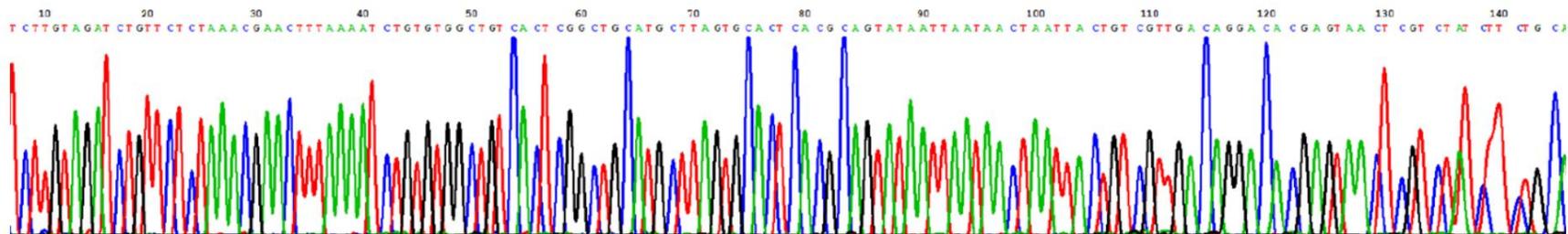
Ergänzende Abbildung 1A. Die Chromatogramme der Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung nach Sanger der 5'-UTR-Sequenz des Indexpatienten BD103, diagnostiziert mit einer Belastung von 5×10^7 Viruskopien/ml Probeneluat (Nasen-Rachen-Abstrich).

A

BD103 5' UTR forward:



BD103 5' UTR reverse:



Ergänzende Abbildung 1B. BLAST-Alignment der BD103-5'-UTR-Sequenz zu den 5'-UTR-Sequenzen der nächsten Nachbarn. Beachten Sie die 100%ige Homologie mit dem SARS-CoV-2 5'-UTR und die auffallende Heterologie im Vergleich mit Fledermaus-Coronavirus bzw. Fledermaus-SARS-Coronavirus. Abfrage: Die vom BD103-Indexpatienten erhaltene authentische Sequenz; Betreff: Referenzsequenz des jeweiligen Coronavirus, hinterlegt in der NCBI-Ref-Seq-Bibliothek (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/nCoV-19-025/human/2020/VNM
Sequence ID: [MT192773.1](#) Length: 29890 Number of Matches: 1

Range 1: 43 to 249 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
383 bits(207)	2e-102	207/207(100%)	0/207(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAAATCTGTGGCTGTCACTCGGC	60		
Sbjct 43	CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAAATCTGTGGCTGTCACTCGGC	102		
Query 61	TGCATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAATTAAGTTCGTTGACAGGACA	120		
Sbjct 103	TGCATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAATTAAGTTCGTTGACAGGACA	162		
Query 121	CGAGTAACTCGTCTATCTTTCGAGGCTGCTTACGGTTTCGTCGGTTCGAGCCGATCA	180		
Sbjct 163	CGAGTAACTCGTCTATCTTTCGAGGCTGCTTACGGTTTCGTCGGTTCGAGCCGATCA	222		
Query 181	TCAGCACATCTAGGTTTCGTCGGGTG	207		
Sbjct 223	TCAGCACATCTAGGTTTCGTCGGGTG	249		

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Bat coronavirus (BtCoV/279/2005), complete genome
Sequence ID: [DQ648857.1](#) Length: 29741 Number of Matches: 1

Range 1: 41 to 248 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
283 bits(153)	2e-72	191/209(91%)	3/209(1%)	Plus/Plus
Query 1	CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAAATCTGTGGCTGTCACTCGGC	60		
Sbjct 41	CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAAATCTGTGTAGCTGCCTCGGC	100		
Query 61	TGCATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAA--TTACTGTCGTTGACAGGA	118		
Sbjct 101	TGCATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAA--TTACTGTCGTTGACAGGA	159		
Query 119	CACGAGTAACTCGTCTATCTTTCGAGGCTGCTTACGGTTTCGTCGGTTCGAGCCGAT	178		
Sbjct 160	TACGAGTAACTCGTCTATCTTTCGAGGCTGCTTACGGTTTCGTCGGTTCGAGCCGAT	219		
Query 179	CATCAGCACATCTAGGTTTCGTCGGGTG	207		
Sbjct 220	CATCAGCACATCTAGGTTTCGTCGGGTG	248		

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Bat SARS coronavirus HKU3-12, complete genome
Sequence ID: [GQ153547.1](#) Length: 29704 Number of Matches: 1

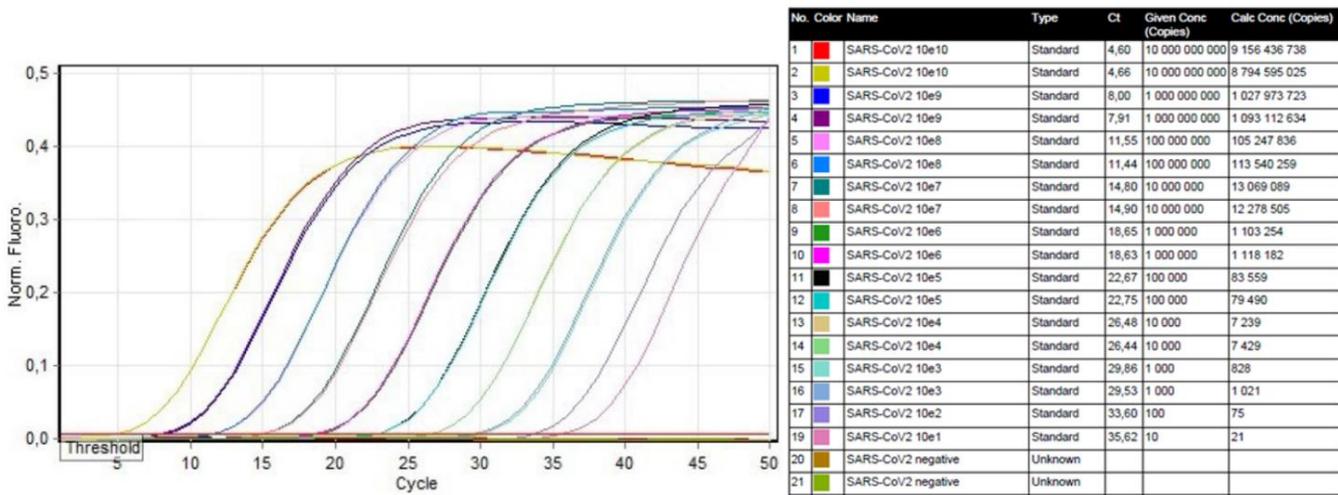
Range 1: 40 to 246 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
281 bits(152)	7e-72	190/208(91%)	3/208(1%)	Plus/Plus
Query 2	GATCTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAAATCTGTGGCTGTCACTCGGC	61		
Sbjct 40	GATCTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAAATCTGTGGCTGTCACTCGGC	99		
Query 62	GATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAA--TTACTGTCGTTGACAGGAC	119		
Sbjct 100	GATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAA--TTACTGTCGTTGACAGGAC	158		
Query 120	ACGAGTAACTCGTCTATCTTTCGAGGCTGCTTACGGTTTCGTCGGTTCGAGCCGATC	179		
Sbjct 159	ACGAGTAACTCGTCTATCTTTCGAGGCTGCTTACGGTTTCGTCGGTTCGAGCCGATC	218		
Query 180	ATCAGCACATCTAGGTTTCGTCGGGTG	207		
Sbjct 219	ATCAGCACATCTAGGTTTCGTCGGGTG	246		

Ergänzende Abbildung 2A. SARS-CoV-2-Quantifizierungsbericht.

Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0,279 \cdot \text{CT} + 11,244)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3,587 \cdot \log(\text{conc}) + 40,327$
Reaction efficiency (*)	$(* = 10^{(-1/m)} - 1) 0,90024$
M	-3,58668
B	40,3274
R Value	0,99919
R^2 Value	0,99839

Ergänzende Abbildung 2B. Dargestellt sind die Standardkurve und die logarithmische Verdünnung der synthetischen SARS-CoV-2-Vorlage von 10e10 Kopien/PCR auf 10e1 Kopien/PCR. Quantifizierungszyklus. Ein grüner.



Ergänzende Abbildung 2C. Standardkurve.

