

Zobacz dyskusje, statystyki i profile autorów tej publikacji na: <https://www.researchgate.net/publication/369803433>

Test RT-qPCR ukierunkowany na konserwowany 5'-UTR SARS-CoV-2 pokonuje główne wady pierwszego zalecanego przez WHO testu RT-qPCR

Artykuł · Kwiecień 2023

DOI: 10.56098/ljvtpr.v3i1.71

CZYTANIE CYTACJI

0

11

6 autorów , w tym:



Ulrike Kämmerer

Szpital Uniwersytecki Würzburg

250 PUBLIKACJE 6500 CYTATY

SEE PROFILE



Pieter Borger

Stowarzyszenie Badawcze W+W

116 PUBLIKACJE 2466 CYTATY

SEE PROFILE



Rainer J Klement

Szpital Leopoldina, Schweinfurt

167 PUBLIKACJE 3002 CYTATY

SEE PROFILE



Klaus Steger

Justus-Liebig-Universität Gießen

257 PUBLIKACJE 9494 CYTATY

SEE PROFILE

Niektórzy z autorów tej publikacji pracują również nad tymi powiązanymi projektami:



Modelowanie i przewidywanie wyników po radioterapii [Zobacz projekt](#)



Elementy transponowane i transponowane (TE) [Zobacz projekt](#)

Test RT-PCR ukierunkowany na konserwowany 5'-UTR SARS-CoV-2 przewycięża wady pierwszego testu RT-PCR zalecanego przez WHO

Ulrike Kämmerer, PhD ¹, Sona Pekova, PhD ², Rainer J. Klement, PhD ³,
Rogier Louwen, PhD ⁴, Pieter Borger, PhD ⁵, Klaus Steger, PhD ⁶

¹ profesor, Szpital Uniwersytecki w Würzburgu, Oddział Położnictwa i Ginekologii, Laboratorium Badawcze, Niemcy; u.kaemmerer@mail.uni-wuerzburg.de; <https://orcid.org/0000-0002-2311-6984>

² Tilia Laboratories, Laboratorium Diagnostyki Molekularnej, Pchery, Czechy; sona.pekova@tilialaboratories.cz; <https://orcid.org/0000-0003-0106-4543>

³ Leopoldina Hospital Schweinfurt, Oddział Radioterapii Onkologicznej, Niemcy; Rainer_klement@gmx.de; <https://orcid.org/0000-0003-1401-4270>

⁴ Centrum Medyczne Uniwersytetu Erasmusa w Rotterdamie, Katedra Mikrobiologii Medycznej i Chorób Zakaźnych, Holandia; Obecny adres: CCassured (zapewnione przez CRISPR Commons), Breda, Holandia; rlouwen@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2537-4941>

⁵ Niezależny Instytut Badawczy Informacji i Pochodzenia, Lörrach, Niemcy; pieter.borger@hotmail.com

⁶ Autor do korespondencji: Emerytowany profesor, Uniwersytet im. Justusa Liebiga w Giessen, Niemcy; Klaus.Steger@chiru.med.uni-giessen.de; <https://orcid.org/0000-0002-2104-0840>

Abstrakcyjny

Po raz pierwszy w historii medycyny test laboratoryjny (RT-PCR) został użyty jako jedyne kryterium rozpoznania choroby (COVID-19) i określenia zakaźności wirusa (SARS-CoV-2) bez oceny objawów klinicznych i dowód na replikację wirusa zdolnego do replikacji, aby uzasadnić wdrożenie niesprawdzonych interwencji obejmujących całą populację. Celem jest (1) ocena solidnego ilościowego protokołu RT-PCR (RT-qPCR), który przewycięża główne obawy zgłaszane w społeczności naukowej w związku z pierwszym zalecanym przez WHO protokołem RT-qPCR dla sekwencji SARS-CoV-2, (2) scharakteryzować poszczególne szczepy SARS-CoV-2 krążące w Czechach od jesieni 2020 r. do wiosny 2021 r. z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji oraz (3) wznowić dialog naukowy i powrócić do rozumu i medycyny opartej na dowodach. Przedstawiamy test RT-qPCR przeznaczony do wykrywania wszystkich dotychczas znanych wariantów SARS-CoV-2 bez generowania wyników fałszywie dodatnich. Na podstawie profilu mutacji genomowych wykazaliśmy, że trzy pojedyncze fale (od jesieni 2020 r. do wiosny 2021 r.) w Czechach następowały po sobie, ale brakowało między nimi bezpośredniego związku genomowego. Stało się to oczywiste w przypadku wariantu omicron, który nie ujawnił bezpośredniego związku ewolucyjnego z żadnym z poprzednich wariantów SARS-CoV-2. Ponadto dostarczamy dowodów na to, że zaniedbanie zasad dobrej praktyki naukowej skutkowało nie tylko publikacją zalecanego przez WHO protokołu Charité RTqPCR, ale także problemami zdrowotnymi. Niepotrzebna kwarantanna zdrowych osób, a także blokady i okropne szkody uboczne w społeczeństwach i gospodarkach na całym świecie z powodu dużej liczby fałszywie dodatnich „przypadków PCR”. W przeciwnym razie osoby z objawami zakaźnymi miałyby fałszywe poczucie bezpieczeństwa dzięki

falszywie ujemnym wynikiem testu, co mogłoby prowadzić do klastrow COVID-19. Zarówno nasze wyniki, jak i dane literaturowe potwierdzają, że regularna walidacja każdego testu diagnostycznego opartego na PCR poprzez sekwencjonowanie jest obowiązkowa. Aby zapobiec przyszłym nadużyciom, nauka potrzebuje sprawdzenia rzeczywistości i musi ponownie zainicjować dialog naukowy oraz uwolnić się od wpływów politycznych i dogmatów.

Słowa kluczowe : *protokół Charité, COVID-19, sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), RT-PCR, SARS-CoV-2, niezręczność naukowa.*

WSTĘP

Od marca 2020 r. COVID-19 (choroba koronawirusowa-2019) utrzymuje świat w napięciu, głównie z powodu szkód ubocznych, które mają katastrofalny wpływ na zdrowie, społeczeństwo i gospodarkę. Od początku domniemanej pandemii i po raz pierwszy w historii medycyny panował globalny konsensus polityczny (Hedges i Lasco, 2021), że status chorobowy, infekcję i zakaźność można zdiagnozować wyłącznie za pomocą odwrotnej transkrypcji – reakcji łańcuchowej polimerazy (RT-PCR) bez jakiegokolwiek niezależnej oceny klinicznej objawów u osób, u których zdiagnozowano chorobę COVID-19 (China CDC, 2020; Paul-EhrlichInstitut, 2020). Ze względu na krytyczne znaczenie wyników RT-PCR można było łatwo przewidzieć, że zostaną przyjęte najwyższe standardy jakości w zakresie dokładności i wiarygodności. Jednak w tym artykule kwestionujemy pierwszą WHO (Światową Organizację Zdrowia) zalecaną, a zatem najczęściej stosowaną metodę testu RT-PCR stosowaną na początku pandemii, zwaną dalej protokołem Charité (Corman i in., 2020; WHO, 24 stycznia 2021 r.). Ponadto przedstawiamy alternatywny i solidny test RT-PCR ukierunkowany na 5'-UTR (region nieulegający translacji) SARS-CoV-2 (zespół ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej — CoronaVirus2), który przewyższa wady protokołu Charité. Aby zachować koncentrację, w tym badaniu nie uwzględniono testów innych niż RT-PCR. Czytelników zainteresowanych szybkimi testami antygenowymi innymi niż testy RT-PCR odsyłamy do niedawnego przeglądu (Puhach i in., 2022). Poniżej przedstawiamy wczesną fazę COVID-19 oraz strategię testową WHO w celu zwalczania pandemii.

CZASU TZW . PANDEMII COVID - 19

30 grudnia 2019 r. szpital w chińskim mieście Wuhan poinformował, że siedmiu jego pacjentów cierpiało na ciężkie zapalenie płuc niewiadomego pochodzenia (Reuters, 2019). Lokalne władze ds. zdrowia natychmiast poinformowały WHO i już zidentyfikowały czynnik sprawczy jako koronawirus, stosując sekwencjonowanie całego genomu i RT-PCR (Ren i in., 2020; Zhu i in., 2020; Lu i in., 2020). W dniu 7 stycznia 2020 roku zidentyfikowany wirus został nazwany 2019-nCoV (2019-novel CoronaVirus), a 1 lutego 2020 roku został przemianowany na SARS-CoV-2 (Coronaviridae Study Group, 2020), *pomimo* protestu chińskiego naukowców, którzy woleli nazwę HCoV-19 (Jiang i in., 2020). Następnie Chińskie Centrum Kontroli Chorób

(CCDC) poinformowało, że opracowało test RT-PCR do wykrywania nowego wirusa w próbkach pacjentów (China CDC, 2020). Wyniki sekwencjonowania umieściły zidentyfikowanego wirusa w beta-Coronaviridae z podrodzaju Sarbecoviruses (Ren i in., 2020). 9 stycznia 2020 r. chińscy naukowcy podzielili się swoimi odkryciami z WHO (Tan i in., 2020) i przesłali pełną sekwencję wirusa do bazy danych Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) z siedzibą w USA (NC_045512.1).

WHO opublikowało pierwszy protokół testu diagnostycznego RT-PCR dla RT-qPCR online 13 stycznia 2020 r. (WHO, 13 stycznia 2020 r.). Warto zauważyć, że opublikowane wytyczne dotyczące testów RT-PCR *nie były* oparte na protokołach ustalonych i udostępnianych przez chińskich naukowców (China CDC, 2020), ale były sztucznym produktem kilku współpracujących laboratoriów w Europie (Reusken i in., 2020).

). Autorzy wykorzystali sekwencje Wuhan zdeponowane w bazie danych GISAID przez CCDC do zaprojektowania starterów i sond *bez żadnych pozytywnych próbek pacjentów i bez dostępności samego wirusa do walidacji testu* (Corman i in., 2020). Protokół europejski, który nazywamy „protokołem Charité”, zalecał trzy cele (zlokalizowane w genie nukleokapsydu (N), genie otoczki (E) i odpowiadające RNA-zależnej polimerazie RNA (RdRp) z pierwszego i drugiego genu Otwartych Ramek Odczytu (ORF1a i ORF1b). Te ostatnie miały na celu wykrycie całej podgrupy SARS beta-koronawirusa (Sarbeco) za pomocą jednej sondy RdRp jako wyłącznie oligonukleotydu różnicującego. Umożliwiło to wykorzystanie szczepu SARS-CoV Frankfurt-1 jako kontrola pozytywna, jednak nie pokazano dowodu dokładności amplifikowanych celów przez odpowiednie kontrole i sekwencjonowanie.

17 stycznia 2020 r. na stronie internetowej WHO opublikowano aktualizację poprawiającą poprzedni protokół poprzez pominięcie najbardziej specyficznej pary starterów dla celu genu N ze względu na „brak czułości” (WHO, 24 stycznia 2021 r.). Sześć dni później, 23 stycznia 2020 r., ten protokół RT-qPCR — który szybko stał się standardem wykrywania RNA SARS-CoV-2 w Europie i wielu innych regionach świata — został opublikowany jako manuskrypt badawczy przez Eurosurveillance po rzekomym pełnym procesie recenzowania, który trwał tylko jeden dzień (Corman i in., 2020). Jak poinformowało laboratorium w Słowenii, startery i sondy z protokołu Charité zostały udostępnione na rynku niemal natychmiast (Poljak i in., 2020):

„Po szeroko zakrojonej ocenie nasze laboratorium wdrożyło testy SARS-CoV-2 oparte na LightMix 17 stycznia 2020 r. Rutynowe testy SARS-CoV-2 rozpoczęły się 27 stycznia 2020 r., a pierwszą pozytywną próbkę wykryto 4 marca 2020 r. po przetestowaniu 353 rutynowych próbek. Na dzień 8 kwietnia 2020 r. w Słowenii wykonano łącznie 30 669 testów SARS-CoV-2 (15 330 testów na milion mieszkańców), wykryto 1103 potwierdzonych laboratoryjnie przypadków COVID-19 i zgłoszono 40 zgonów”.

W tym czasie w Europie nie było ani jednego przypadku COVID-19, a „decyzja o zmianie podejścia diagnostycznego” została podjęta blisko tydzień przed publikacją protokołu Charité przez Eurosurveillance. Jednak zaledwie trzy dni po „przełączeniu diagnostycznym”, 30 stycznia 2020 r.

Komisja (WHO, 30 stycznia 2020 r.) ogłosiła stan zagrożenia zdrowia publicznego o zasięgu międzynarodowym (PHEIC), pomimo zaledwie 1651 przypadków z pozytywnym wynikiem testu w Chinach, w tym 38 zgonów, i 98 przypadków w 18 krajach poza Chinami bez żadnych zgłoszonych zgonów (Our World w Danych). W dniu 11 marca 2020 r. liczba pozytywnych przypadków testu na SARSCoV-2 wzrosła na całym świecie do 4670, w tym 280 zgonów przypisywanych tej nowej chorobie wywołanej wirusem COVID-19 (Nasz świat w danych) i dyrektor generalny WHO, dr Tedros Adhanom Ghebreyesus ogłosił COVID-19 „pandemią” (WHO, 11 marca 2020 r.) — światowym kryzysem dotyczącym mniej niż jedną osobę na milion (około 8 miliardów podzielonych przez 4670). Było to możliwe, ponieważ definicja WHO dotycząca „pandemii” została przeformułowana w 2009 r., tak że nie wymagała już „ogromnej liczby zgonów i chorób” (Doshi, 2010).

WHO STRATEGIA WALKI Z OGŁOSZONĄ PANDEMIĄ COVID-19

16 marca 2020 r. Ghebreyesus ogłosił globalną strategię radzenia sobie z COVID-19:

„Mamy proste przesłanie do wszystkich krajów: testuj, testuj, testuj. Przetestuj każdy podejrzany przypadek. Jeśli wynik testu będzie pozytywny, izoluj ich i dowiedz się, z kim byli w bliskim kontakcie, do dwóch dni przed wystąpieniem objawów, i przetestuj również te osoby (WHO, 16 marca 2020 r.).

Równolegle WHO uruchomiła funkcję pulpitu nawigacyjnego COVID-19, która umożliwia śledzenie w czasie rzeczywistym pozytywnych wyników testu RT-PCR w liczbach bezwzględnych, niezależnie od liczby przeprowadzonych testów i bez dalszego określania stosowanego systemu testów. Miało to na celu wsparcie planowania, wdrażania i pozyskiwania środków na krajowe działania w zakresie gotowości i reagowania —

na podstawie ogólnowiatowych testów RT-PCR rzekomo zidentyfikowano 13 982 pozytywnych przypadków, w tym 871 zgonów przypisanych COVID-19 (Nasz świat w [danych](#)) . Strategia zalecana przez WHO – przetestowanie jak największej liczby osób niezależnie od objawów klinicznych za pomocą tego testu molekularnego – wydaje się zagadkowa, ponieważ sama technologia RT-PCR ma niewystarczającą czułość i specyficzność, aby zweryfikować nienaruszony patogen zakaźny, taki jak wirus, a tym samym do zidentyfikowania osoby zakaźnej, ani nie może być skutecznie używany do diagnozowania choroby. To, co robi, polega na amplifikacji dowolnego materiału genetycznego będącego przedmiotem zainteresowania, niezależnie od „żywności” źródła (**ramka 1**) . Co więcej, strona 9 konsensusu dokumentu dotyczącego Epidemiologii zespołu ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej (SARS) opracowanego przez WHO ([2003](#)) , wysoce spokrewnionego wirusa, brzmi następująco: „Powiązanie danych jest wymagane w celu ustalenia, czy istnieje bezpośredni związek między nasilenie oraz miano wirusa i wydalanie”. Oznacza to, że osoba z dodatnim wynikiem testu RT-PCR nie może być automatycznie uznana za wykazującą objawy lub zakaźną bez potwierdzenia objawów klinicznych. Dlatego niezrozumiale jest, że WHO zobowiązała się do strategii testu RT-PCR, nawet po opublikowaniu systematycznego przeglądu wykazującego, że cechy pacjenta (tj. nasilenie objawów) i parametry testu (tj. próg cyklu) radykalnie ograniczają wiarygodność RT - Wyniki testu PCR (Jefferson i in., [2020](#)) . Co więcej, badacze WHO powinni byli być świadomi pułapek związanych z testami PCR, ponieważ w 2007 roku fałszywie dodatnie wyniki wywołały pseudopandemię krztuśca w Centrum Medycznym Dartmouth-Hitchcock (New York Times, [2007](#)) . Niemniej jednak masowe testy metodą RT-PCR stały się wybraną strategią monitorowania COVID-19 i od tego czasu liczba pozytywnych testów była wykorzystywana do uzasadnienia masowych ograniczeń praw człowieka i ogólnokrajowych blokad.

Ramka 1: Brak wartości diagnostycznej RT-PCR dla potwierdzenia obecności wirusa zakaźnego

Co najważniejsze i niezależnie od projektu protokołu, RT-PCR wykrywa wyłącznie docelowe RNA poddane odwrotnej transkrypcji i amplifikacji wybrane przez zastosowane startery, a zatem w żaden sposób nie może udowodnić, że kompetentny pod względem replikacji, zakaźny wirus jest rzeczywiście obecny w podana próbka. Warto zauważyć, że ze względu na wysoką czułość RT-PCR, szczątkowe, niezakaźne wirusowe RNA pozostaje wykrywalne nawet przy braku zakaźnych wirusów. Stosując wzorce zewnętrzne ze zdefiniowaną liczbą kopii wirusowego RNA, miano wirusa RNA można skorelować z wartościami Ct uzyskanymi za pomocą RT-qPCR. Jednak ani określona liczba kopii RNA, ani konkretna wartość Ct stosowana jako wartość progowa nie pozwalają na uzyskanie pewnego wniosku, nawet jeśli chodzi o to, czy miano wirusa wzrasta, czy maleje.

Już 23 maja 2020 r. powyższe podstawowe informacje na temat RT-PCR zostały opublikowane w stanowisku Narodowego Centrum Chorób Zakaźnych ([2020](#)) . Następnie zostało to potwierdzone w podcaście z 26 listopada 2020 r. przez Marion Koopmans ([2020](#)) , współautorkę protokołu Charité (Corman i in., [2020](#)) , w oświadczeniu wideo z 30 grudnia 2021 r. Anthony Fauci ([2021](#)) , główny doradca medyczny ds

prezydenta Bidena w USA, a ostatnio w obszernym przeglądzie z korespondentem Isabellą Eckerle, jak wskazali Puhach i in., ([2022](#)) . Ten ostatni zawiera szczegółowy zarys pokazujący, dlaczego zakaźność musi być określona przez ocenę replikacji wirusa w hodowli komórkowej, co stanowi złoty standard dla zakaźnego wirusa zdolnego do replikacji. W tym ostatnim artykule stwierdza się, że „do tej pory nie istnieją żadne testy diagnostyczne, które wiarygodnie określają obecność wirusa zakaźnego”.

W ostatecznej analizie, do określenia ilości RNA, RT-PCR może być użyty jedynie jako wskaźnik zastępczy, ponieważ hodowla komórek z SARS-CoV-2 wymaga warunków laboratoryjnych poziomu bezpieczeństwa biologicznego 3 (Risi i wsp., [2010](#)) . Ponadto każda diagnoza musi zostać potwierdzona przez jednego lub więcej klinicystów, którzy muszą wykazać zgodność dowolnego testu laboratoryjnego z objawami

klinicznymi osoby badanej metodą RT-PCR, tak jak ma to miejsce w przypadku każdego innego testu laboratoryjnego.

Warto zauważyć, że każdy test laboratoryjny, nawet jeśli wykazuje zarówno wysoką specyficzność, jak i wysoką czułość, będzie generował wyniki fałszywie dodatnie, które mogą nawet przewyższać liczbę wyników prawdziwie dodatnich, gdy częstość występowania jest niska, tj. 2020 ; Lyons-Weiler, 2021). Osoby bezobjawowe z pozytywnym wynikiem testu reprezentują niskie początkowe liczby docelowe związane z wysokimi wartościami Ct. Nawet w przypadku, gdy odczyt testu jest prawidłowy, osoby te nie będą zakaźne, ale reprezentują kliniczne wyniki fałszywie dodatnie obejmujące albo osoby wyleczone, które nadal wykazują pozostałości wirusa, albo osoby odporne, które nie będą zakaźne z powodu niskiego miana wirusa (Cevik i in., 2020 ; Lyons-Weiler, 2021). Basile i in. (2020) odnotowali odsetek fałszywie dodatnich wyników testów RT-PCR na poziomie 11% (13/122) w czasie, gdy częstość występowania COVID-19 wynosiła 2%. Tylko dwa z 13 wyników fałszywie dodatnich miały dostępną serologię SARS-CoV-2, oba były negatywne w kierunku SARS-CoV-2, a jeden był pozytywny w kierunku rinowirusa. Problem zanieczyszczenia został poruszony bardzo wcześnie przez Wernicke i in. (2020), którzy zgłosili wartości Ct tak niskie, jak 17 dla kontroli negatywnych, co wskazuje na wysoki poziom zanieczyszczenia w odczynnikach uzyskanych od dostawców oligonukleotydów. Dlatego każda partia odczynników do PCR musi zostać wstępnie przetestowana przed użyciem jej w rutynowej diagnostyce.

Jedynym podejściem, które doprowadziłoby do zera wyników fałszywie dodatnich, wymaga przeprowadzenia sekwencjonowania Sangera (Lee, 2021). Wykorzystanie zagnieżdżonego RT-PCR, a następnie sekwencjonowania Sangera w celu ponownego przetestowania 50 próbek sprzedanych jako pozytywne referencje RT-qPCR potwierdziło 21 (42%) wyników fałszywie dodatnich (Lee, 2022).

Ponieważ wielu naukowców, lekarzy i doradców medycznych zgłosiło swoje skargi na wady pierwszego zalecanego przez WHO RT-PCR, poddaliśmy dalsze wyzwanie nowatorskiemu protokołowi wykrywania SARS-CoV-2. Aby ulepszyć testowanie RT-PCR RNA SARS-CoV-2 jako wskaźnika miana wirusa, uniknąć problemów związanych z protokołem Charité i wdrożyć niezawodne i weryfikowalne podejście PCR, ustanowiono alternatywny reżim testowy. W dalszej części będziemy go nazywać „protokołem 5'-UTR RT-qPCR”. W oparciu o międzyosobniczą heterogeniczność genomową szczepów SARS-CoV-2 alfa, beta, gamma i delta (Ong i in., 2022), zidentyfikowaliśmy unikalny region konsensusowy zlokalizowany w 5'-UTR jako specyficzny i czuły cel do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (RT-qPCR) w czasie rzeczywistym do wykrywania RNA związanego z SARS-CoV-2. Następnie scharakteryzowaliśmy sekwencje genomu poszczególnych szczepów SARS-CoV-2, które krążyły w Czechach od jesieni 2020 r. do wiosny 2021 r. Dzięki temu doświadczeniu odpowiadamy na krytyczne uwagi społeczności naukowej po naszej prośbie o wycofanie Charité protokołu Charité (Borger i in., 2020) i szczegółowo omawiamy nasze główne obawy związane z protokołem Charité oraz to, w jaki sposób upolitycznienie nauki zaciera zasady dobrej praktyki naukowej ze szkodliwymi i śmiertelnymi skutkami społecznymi na całym świecie.

Metody

PROJEKT P RIMERU CELOWANY NA REGION 5'-UTR SARS-C O V-2 DLA RT -Q PCR

Korzystając z dopasowania sekwencji genomowych dostępnych w lutym 2020 r. W odniesieniu do koronawirusów Bat/SARS/nCOV-19, wybraliśmy unikalny region zlokalizowany w konserwatywnym i specyficznym 5'-UTR SARS-CoV2, aby służył jako specyficzny i czuły cel dla prawdziwych czas RT-qPCR detekcja wirusowego RNA dająca amplikon o długości 207 par zasad (bp). Zwaliłowaliśmy test we własnym zakresie, zgodnie z europejskimi wytycznymi ISO 13485 dotyczącymi produkcji do diagnostyki in vitro. Jak wyszczególniono poniżej, 50 pozytywnych przypadków zidentyfikowanych w autentycznych próbkach pacjentów z objawami (wymazy z nosogardzieli) zostało potwierdzonych przez bezpośrednie

sekwencjonowanie metodą Sangerą uzyskanych produktów PCR. Test spełnił wszystkie wymagania dotyczące specyficzności (zero zaobserwowanych produktów fałszywie specyficznych), a także czułości (siedem kopii celów w reakcji PCR). Ponadto nasz test przeszedł zewnętrzną walidację przez oficjalny organ brytyjski NEQAS w celu oceny jakości, a następnie został wdrożony w rutynowej diagnostyce 31 028 przetestowanych do tej pory autentycznych próbek. Charakterystykę starterów i sondy podsumowano w **Tabeli 1**.

Profil PCR obejmował początkowy etap denaturacji w 94°C przez 5 minut, a następnie 45 cykli w 94°C przez 30 sekund, w 58°C przez 30 sekund (akwizycja w FAM) i w 72°C przez 30 sekund. Tożsamość wygenerowanych amplikonów została potwierdzona przez sekwencjonowanie Sangerą (**rysunek uzupełniający 1**). W każdej analizowanej próbce chromatograf Sangerą ujawnił autentyczną sekwencję SARS-CoV-2, potwierdzając tym samym wymaganą specyficzność testu 5'-UTR RT-qPCR. Liczbę kopii genomu SARS-CoV-2 w 1 ml początkowego eluatu próbki obliczono za pomocą krzywej kalibracyjnej zbudowanej z 4-logarytmicznych rozcieńczeń syntetycznej sekwencji genomowej obejmującej sekwencję 5'-UTR i jej bezpośredni region flankujący (zsyntetyzowany przez Eurofins Genomics, Niemcy) przy użyciu następującego równania krzywej kalibracji: $10^{(-0,279 * Ct + 11,244)}$. **Dodatkowa Figura 2** przedstawia rozcieńczenie logarytmiczne syntetycznej matrycy SARS-CoV-2, począwszy od 10e10 kopii na reakcję PCR do 10e1 kopii na reakcję PCR. Kontrola negatywna jest ujemna, tj. nie było żadnych niespecyficznych amplikonów wytwarzanych przez niepożądane interakcje między- i wewnątrzcząsteczkowe. Następnie wartości Ct zmierzone dla autentycznych próbek pacjentów wykorzystano do obliczenia liczby kopii genomu SARS-CoV-2 w 1 ml początkowego eluatu próbki. Biorąc pod uwagę fakt, że zastosowaną metodą ilościową była tzw. ABSOLUTNA (co jest typowym zestawem w mikrobiologii molekularnej), liczbę kopii SARS-CoV-2 w każdej próbce pacjenta określono za pomocą równania krzywej kalibracyjnej, skonstruowanego tworząc seryjnie rozcieńczony syntetyczny genom SARS-CoV-2, który według stanu techniki jest najdokładniejszą metodą konstruowania krzywej kalibracyjnej w mikrobiologii molekularnej.

Tabela 1

Diagnostyczny zestaw starterów i sonda hybrydazy TaqMan do rutynowego qPCR w czasie rzeczywistym SARS-CoV-2 (5'-UTR), a także startery do genotypowania Sangerą, zlokalizowane w genie S SARS-CoV-2, jak przeprowadzono w Tilia Laboratoria od marca 2020 do kwietnia 2022. Biorąc pod uwagę wewnętrzną stabilność genomową regionu 5'-UTR koronawirusów, test nie wymagał żadnego przeprojektowania pomimo pojawienia się różnych szczepów SARS-CoV-2 od marca 2020. Wartości zawartości Tm i GC oligonukleotydów jest obliczona przez producenta (Eurofins Genomics, Niemcy). Tm: temperatura topnienia podkładu; GC: Udział guaniny i cytozyny w starterze.

Imię Oligo	Sekwencja 5'-3'	Tm [°C]	GC [%]
5'-UTR do przodu	CGATCTCTTGATAGATCTGTTCTC	58,9	43
5'-UTR odwrotny	CACCCGGACGAAACCTAGATGTGC	66,1	58
5' -UTR Sonda TaqMan	FAM- TACTGTTCGTTGACAGGACACGAGTAACTCGTCTBHQ1	70,6	48
SARS-CoV-2 do przodu	CACACGTGGTGTATTATTACCCTGAC	58,0	36

Odwrócona delta SARS-CoV-2	FAM-TCAAAAAGTGCAATTATTTCGCACTAG	58,1	36
SARS-CoV-2 Napastnik Wielkiej Brytanii	GTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGAC	59,7	40
SARS-CoV-2 UK-rewers	CCACAAACAGTTGCTGGTGCATGTAG	64,8	50

M OLEKULARNE KRAŻĄCYCH SZCZEPÓW SARS - C O V-2 W REPUBLICIE CZESKIEJ

Scharakteryzowaliśmy genomowo 260 autentycznych próbek SARS-CoV-2 od osób z objawami (brak danych klinicznych) pobranych między wrześniem 2020 r. a kwietniem 2021 r. przy użyciu sekwencjonowania Sangera i analizy fragmentów genu białka S SARS-CoV-2, co pozwoliło nam rozróżnić trzy odrębne klastry genomowe SARS-CoV-2, które bezpośrednio odpowiadają poszczególnym „falom”. Startery użyte do genotypowania poszczególnych szczepów SARS-CoV-2, mające zastosowanie do wszystkich krążących szczepów, podsumowano w **Tabeli 1**.

Z każdego z trzech klastrów (wrzesień 2020, listopad 2020, grudzień 2020) wybraliśmy czterech losowych przedstawicieli i poddaliśmy ich sekwencjonowaniu całego genomu NGS (SRA Bioproject, nr dostępu PRJNA742374).

CAŁEGO GENOMU IZOLATÓW SARS-C O V-2 Z WYKORZYSTANIEM NGS

Całe RNA zostało wyizolowane z autentycznych próbek pacjentów przy użyciu minizestawu QIAamp Viral RNA (Qiagen,

Niemcy), zgodnie z zaleceniami producenta. Całkowity RNA poddano odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu Verso cDNA (Thermo Fisher Scientific, USA), a produkty ogonowe obejmujące cały genom SARS-CoV-2 amplifikowano metodą PCR przy użyciu starterów ARTIC v3 (IDT, USA). Otrzymane pule PCR (fragmenty około 400 bp) oczyszczono na żelu przy użyciu zestawu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Niemcy) i poddano tworzeniu biblioteki NGS przy użyciu zestawu NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent (NEB, USA), zgodnie z do instrukcji producenta. Biblioteki określono ilościowo stosując Ion Plus Fragment

Zestaw bibliotek (Thermo Fisher Scientific, USA) i pulę bibliotek 10 pM zastosowano jako matrycę do emulsyjnej reakcji PCR (emPCR) przy użyciu zestawu Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Po wzbogaceniu kulek (przyrząd OT2, Thermo Fisher Scientific, USA) załadowano chip sekwencjonujący NGS v316 w celu uzyskania wystarczającego pokrycia zasadą. Sekwencjonowanie NGS przeprowadzono przy użyciu platformy Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, USA) przy użyciu zestawu chemicznego Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Uzyskane surowe dane zostały poddane obróbce końcowej i jakościowej oraz wykorzystane do bezpośredniego dopasowania do genomu referencyjnego SARS-CoV-2 (MT192773) w celu zidentyfikowania mutacji genomowych charakterystycznych dla fal z września, listopada i grudnia 2020 r.

Sterownica

Wszystkie przeprowadzone eksperymenty obejmowały wzorzec wewnętrzny (kontrola), w szczególności transkrypt ludzkiej albuminy. Biorąc pod uwagę fakt, że oznaczenie ilościowe było BEZWZGLĘDNE, standard wewnętrzny zastosowano wyłącznie do oceny jakości i integralności badanych próbek klinicznych. Zatem do bezwzględnego oznaczenia ilościowego SARS-CoV-2 w każdej próbce klinicznej zastosowano

równanie krzywej kalibracji podane powyżej, a nie metodę $\Delta\Delta Ct$, która jest zwykle stosowana do oznaczania ilościowego WZGLĘDNEGO.

Oświadczenie dotyczące etyki

Próbki do rutynowej diagnostyki molekularnej zostały pobrane za świadomą zgodą i zgodnie z rządowymi dyrektywami prawnymi w zakresie strategii testów na pandemię COVID-19 które zostały wydane i zarchiwizowane przez odsyłające Kliniki. Anonimowe próbki zostały przetworzone zgodnie z Deklaracją Helsińską.

Przegląd literatury

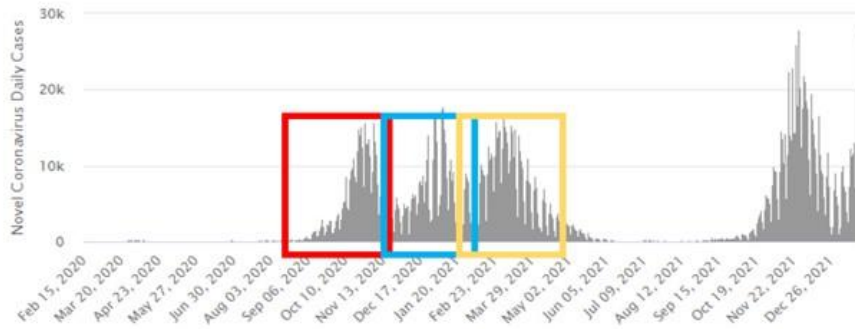
W dniu 27 listopada 2020 r. międzynarodowa grupa 22 naukowców (w tym UK, PB, RJK i KS tego artykułu) przedłożyła zewnętrzny raport z przeglądu (Borger i in., 2020) wraz z prośbą o wycofanie protokołu Charité (Corman i in., 2020) al., 2020) do redakcji Eurosurveillance. Ponieważ dokumenty były równoległe umieszczane online zarówno na naukowym serwerze preprint, jak i na ResearchGate.net, społeczność naukowa przedstawiła zarówno dodatkowe odniesienia, jak i uzasadnioną krytykę dotyczącą braku danych eksperymentalnych z laboratorium mokrego potwierdzających zgłoszone przez nas obawy. Informacje te zostały podsumowane w załączniku i przesłane do Eurosurveillance 11 stycznia 2021 r. Wszystkie dokumenty są dostępne online (Borger i in., 2020). W naszym obszernym omówieniu uwzględniamy publikacje z wyszukiwania PubMed, w których użyto terminów „PCR”, „RT-PCR” lub „RT-qPCR” oraz „SARS-CoV-2” lub „COVID-19”. Zamieszczamy również liczne zalecenia WHO dotyczące strategii testowej, które są dostępne na stronie internetowej WHO.

Wyniki

W przeciwieństwie do protokołu Charité zalecanego przez WHO – zalecającego 45 cykli bez definiowania Ct dla rozróżnienia dodatniego i ujemnego, ale skutkującego wysokim odsetkiem wyników fałszywie dodatnich przy Ct >35, proponowany test 5'-UTR wyraźnie przewyższał protokół Charité pod względem specyficzności (brak niespecyficznych produktów PCR, nawet przy zastosowaniu 45 cykli), przy zachowaniu niezbędnej czułości. W przeciwieństwie do dalszych genów, które są podatne na mutacje, sekwencja genomowa 5'-UTR ma kluczowe znaczenie dla regulacji syntezy białek wirusowych przez ludzkiego gospodarza i z natury pozostaje stabilna w koronawirusach (Yang i Leibowitz, 2015; Fields, 2021), ponieważ występuje również w SARS-CoV-2 (Baldassarre i in., 2020; Miao i in., 2021; Mohammadi Dehcheshmeh i in., 2021). Dlatego byliśmy w stanie z powodzeniem stosować test 5'-UTR podczas całej domniemanej pandemii COVID-19, niezależnie od późniejszej heterogeniczności genomowej poszczególnych krążących szczepów obserwowanych w czasie (tj. alfa, beta, gamma, delta, a także, omikron). Test 5'-UTR wyróżnia się brakiem fałszywego tła (tj. negatywna próbka jest naprawdę negatywna w PCR). W sumie przebadano 31 028 próbek, z czego 2737 dało wynik pozytywny (8,8%).

Daily cases in the Czech Republic
(www.worldometers.info)

A



SARS-CoV2 gene	116L	N146N	S118I-118I	V189V	T195H	S214L	S202Y	G192V	R402R	D480D	A499V	K517T	V602V	D690D	P681F	T1003I	V1075I	T1360I	A1799V	T1809I	T1543I	A1738D	F1907F	K2079N	S203R	D2060D	A2080S	
September 2020																												
November 2020																												
December 2020																												

B

ORF1ab																													
2080S	A2192A	G2230T	S2238F	G2501T	V2594Y	V2629V	L3027F	F3100F	M3223I	C3323R	L3535L	S3620S	V4117A	M4241I	V4429Y	P4480L	D4683D	P4715L	P4804P	N4948N	H5005A	V5123I	D5130V	T5180I	V5219V	T5304F	C5353C	N5420S	
S429S	D5384Y	E5463D	P5815P	T5943I	H5954Y	T5954T	A5922S	D6289Y	D6250D	T6303R	N6175N	L6608L	N6729N	V6776Y	T700I	A674V	G6992D	T95I	E96D	G1420D	R1143L	S1144L	H1156-1156-1156	R158G	R190R	G4213I	L212I	A222V	

S protein																		ORF3a			M		ORF8						
S227V	N439K	L452R	T476K	N501Y	K518N	A570D	D616G	A621S	P681H	F710I	T721F	S802A	T1138I	D1118H	D1140D	F1154M	T1167F	L1196I	T12I	V16I	A167F	V172V	V188H	R190R	E191*	G27*	R52I	V73K	

Rysunek 1. Dane sekwencjonowania całego genomu SARS-CoV-2 NGS trzech losowo wybranych reprezentatywnych genomów zebranych między wrześniem 2020 r. a kwietniem 2021 r. w Czechach. A. Poszczególne fale SARS-CoV-2 z jesieni 2020 r. zaznaczono na czerwono (wrzesień 2020 r.), niebiesko (listopad 2020 r.) i żółto (grudzień 2020 r.). Wykres został przejęty z www.worldometers.info otwarte źródło. B. Tabela pokazuje (od 5' do 3') specyficzne dla fali mutacje SARS-CoV-2 znalezione w odpowiednich genomach (Orf1ab, S, Orf3a, M, Orf8). Mutacje są tłumaczone na aminokwasy i podświetlane czarnym „x”. Czarne pola podkreślają te mutacje, które były obecne w szczepie SARS-CoV-2 z września 2020 r., ale były nieobecne w szczepie SARS-CoV-2 z listopada 2020 r. bezpośrednio po nim. Podobny wzorec można dostrzec w przypadku szczepu SARS-CoV-2 z grudnia 2020 r. (nazwanego już „brytyjskim”, a później „alfa”). Biorąc pod uwagę fakt, że w tamtym czasie terytorium Republiki Czeskiej z genetycznego punktu widzenia odpowiadało obszarowi ograniczonemu genetycznie, obserwacja, że poszczególne szczepy nie były ze sobą bezpośrednio powiązane genetycznie, jest dość zdumiewająca.

W oparciu o nasze wieloletnie doświadczenie w dziedzinie ilościowej mikrobiologii molekularnej przyjęliśmy następujące rutynowe kryterium oceny znaczenia klinicznego zmierzonego wirerii SARS-CoV-2: Ct <25, wysoce dodatni (>10e6 kopii/ml); Ct 25-30, pozytywny; Ct 30-35, pozytywne ślady, ale mało prawdopodobne, aby był zakaźny; Ct >35, ujemny, niezakaźny (<10e2 kopii/ml). Należy zauważyć, że „liczba kopii” może się różnić w zależności od laboratorium, ponieważ istnieje różnica między liczbą kopii obecnych w próbce do reakcji PCR i w autentycznej próbce pacjenta. W tym ostatnim przypadku należy wziąć pod uwagę różne etapy rozcieńczania: RNA zawarte w 1 ml wacika przenosi się do 50 µl buforu do elucji, z którego 4 µl używa się do syntezy cDNA, z czego 2 µl wykorzystuje się do reakcji PCR. Przeprowadziliśmy ponowną kalibrację, przeliczając początkową objętość próbki, aby wszystkie nasze wyniki PCR były porównywalne ze standardowymi klasycznymi pomiarami hodowli komórkowych. Oceniliśmy Ct 25, aby zrównać nasz standard z Ct 20 (patrz **Dodatkowa Figura 2**) reprezentującą punkt odcięcia próbki pacjenta dla wiarygodnej korelacji z zakaźnym ładunkiem wirusowym.

Korzystając z obserwacji genomu i sekwencjonowania całego genomu NGS losowych przedstawicieli z każdej z trzech fal z jesieni 2020 r., byliśmy w stanie wykazać, że każda fala była reprezentowana przez inny

szczep SARSCoV-2. Rzeczywiście, mutacje wykryte w fali z września 2020 r. nie były obecne w kolejnych falach z listopada 2020 r. i grudnia 2020 r. (inaczej „brytyjskich”, „B.1.1.7.” lub później „alfa”). Rozbieżność jest najbardziej widoczna między szczepem SARS-CoV-2 z września 2020 r. a listopadem 2020 r. Warto zauważyć, że fala listopadowa „straciła” 14 mutacji, które były obecne w poprzedniej fali wrześniowej (ryc. 1).

Dyskusja

W styczniu 2020 r. grupa naukowców z Europy i Hongkongu (Chiny) opracowała protokół RT-PCR, który został umieszczony na stronie internetowej WHO (WHO, 13 stycznia 2020 r.) przed publikacją w Eurosurveillance (Corman i in., 2020). Ten tak zwany protokół Charité służył jako plan dla większości późniejszych protokołów, przynajmniej w Europie, i miał na celu „opracowanie i wdrożenie solidnej metodologii diagnostycznej umożliwiającej jej wykorzystanie w warunkach laboratoryjnych zdrowia publicznego bez dostępnego materiału wirusowego”.

Już wtedy było oczywiste, że proponowany cel wprowadza w błąd z następujących powodów: Specyficzny materiał biologiczny (tutaj wirus będący przedmiotem zainteresowania) jest niezbędny do zapewnienia specyficzności i czułości projektu badania, ale nie był dostępny pomimo konieczności została już uznana w opublikowanych pracach chińskich naukowców w dużej mierze odpowiedzialnych za stworzenie protokołu Charité (Zhu i in., 2019; Ren i in., 2020). Co więcej, protokół Charité nie spełniał właściwego projektu testu, zgodnego z normami międzynarodowymi i obejmującego bardzo specyficzne materiały testowe (startery i sondy). Zamiast być projektowany i sprawdzany pod kątem maksymalnej specyficzności bez reaktywności krzyżowej, projekt starterów protokołu Charité umożliwił specyficzne dla grupy wykrywanie różnych koronawirusów z podrodzaju Sarbeco. Jest to wątpliwe, biorąc pod uwagę fakt, że chińscy naukowcy już 5 stycznia 2020 r. udostępnili WHO całą sekwencję genomu wirusa Wuhan (WHO, 28 lutego 2020 r.) National Center for Biotechnology Information (NCBI) Nucleotide Database (NC_045512.1), umożliwiając w ten sposób ustanowienie wysoce specyficznych starterów i sond. Jednak protokół Charité i projekt startera oparto na zestawie syntetycznych sekwencji i szczepie SARS-CoV Frankfurt-1 jako kontroli pozytywnej, nawet bez weryfikacji produktów PCR przez sekwencjonowanie. Co gorsza, nie określono żadnego okna odcięcia dla wartości Ct w odniesieniu do dobrze zdefiniowanej, specyficznej kontroli miana wirusa dla któregośkolwiek z różnych genów docelowych. Jak zauważył Puhach i in., (2022), miano wirusa wynoszące $1,00E+06$ kopii RNA jest obecnie ogólnie akceptowane jako skorelowane z minimalnym wiramią osobników zakaźnych. Zostało to już zgłoszone w protokole CCDC (2020) i odpowiadało średniej wartości Ct wynoszącej 25. W odniesieniu do genu Charité Sarbeco E, wspomniana wyżej liczba kopii RNA odpowiada wartości Ct wynoszącej około 28,19, ale nie został przekazany (Corman i in., 2020), otwierając drzwi dla wartości Ct do 45 zgłoszonych jako pozytywne przez komercyjne laboratoria, a tym samym napędzając „fale” niewiarygodnych (prawdopodobnie fałszywych) „pozytywnych” wyników testów.

Podsumowując, żadne z oczekiwanych wymagań, zwykle obowiązkowych, dla „solidnego testu diagnostycznego” w dowolnej Standardowej Procedurze Operacyjnej (SOP) nie zostało spełnione w protokole Charité. Rzeczywiście, potrzeba tego protokołu była początkowo wątpliwa, ponieważ CCDC (2020; patrz także Chan i in., 2020) ustanowiło już skuteczny protokół RT-PCR 3 stycznia 2020 r., który obejmował określone próbki kontrolne.

Co niezrozumiałe, protokół ten został przesłany na stronę internetową WHO po protokole Charité i częściowo tylko w języku chińskim (WHO, 24 stycznia 2021 r.). Chociaż dodanie tej chińskiej części w języku angielskim byłoby odpowiednie i pożądane, nadal nie byłoby wystarczające do rozwiązania kluczowego problemu: RT-PCR może wykryć RNA tylko we fragmentach zawierających nienaruszony region docelowy pozytywnego amplikonu.

Tak więc, z samej swej natury, RT-PCR jest bezsilny w rozróżnieniu między zdolnymi do replikacji, zakaźnymi cząsteczkami wirusa i niezakaźnymi pozostałościami fragmentów genomu wirusa, które są zasadniczo biologicznym szumem w systemie (**Ramka 1**).

Biorąc pod uwagę fakt, że protokół Charité cierpiał z powodu wysokiego niespecyficznego szumu tła, powodującego fałszywie dodatnie wyniki powyżej wartości Ct równej 35 dla wszystkich regionów docelowych oraz ponieważ nie można racjonalnie polegać na takim nieoptymalnym projekcie w rutynowej diagnostyce, odrzuciliśmy projekt Charité i zamiast tego ustanowił nowy test. Podczas gdy protokół Charité zaleca amplifikację trzech sekwencji docelowych zlokalizowanych w obrębie genu E, genu RdRp (który według nomenklatury jest genem ORF1ab kodującym białko RdRp) i genu N, nasz test 5'-UTR celuje tylko jeden region do amplifikacji, ale składa się z dobrze konserwowanej sekwencji w obrębie 5'-UTR SARS-CoV-2. Zatem nasz projekt testu okazał się wysoce specyficzny bez żadnej wrażliwości na hałaśliwe tło stosunkowo bezsensownych i niezakaźnych fragmentów, co potwierdziło sekwencjonowanie Sangera uzyskanych amplikonów PCR.

OCENA MIANA ZAKAŻNEGO WIRUSA PRZEZ KULTURĘ KOMÓRKOWĄ , A NIE METODĄ RT-PCR

Wcześniejszy kontakt z określonym wirusem można sprawdzić za pomocą testów immunologicznych, które badają odpowiedź immunologiczną gospodarza wywołaną przez wirusa będącego przedmiotem zainteresowania i przejawiającą się w swoistych przeciwciałach (tj. IgM, IgG, IgA) lub limfocytach T reagujących przeciwko antygenowi . Pomimo faktu, że takie specyficzne testy były dostępne na bardzo wczesnym etapie pandemii (Amanat i in., 2020 ; Braun i in., 2020 ; Okba i in., 2020) , politycy na całym świecie nie przyjęli ich w swoich politykach testowych, zamiast tego promował testy molekularne, twierdząc, że są w stanie wykryć wirusowe RNA za pomocą RT-PCR lub później z białka wirusowego przy użyciu szybkich testów antygenowych. Warto zauważyć, że PCR jest bardzo czułą techniką amplifikacji DNA, która według jej wynalazcy, Karry'ego Mullisa (1990) , służy do namnażania określonych sekwencji (tj. genów) z bardzo małych ilości próbek w krótkim czasie (Mullis, 1990) . Jednak RT-PCR do wykrywania docelowych RNA wymaga odwrotnej transkrypcji RNA w celu przekształcenia go w formę DNA, do której wykrywania zaprojektowano PCR. W przypadku ilościowego PCR (qPCR), stosowanego w testach na SARS-CoV-2, amplifikacja genu w testach masowych obejmuje trzeci starter, tzw. sondę, która jest znakowana barwnikiem fluorescencyjnym i specyficznie wiąże się amplifikowana sekwencja docelowa. Po zniszczeniu sondy przez polimerazę podczas etapu wydłużania, wytwarzany jest sygnał świetlny, który jest używany jako zastępczy znacznik rund amplifikacji (Bustin i Nolan, 2017 ; Lee, 2021) .

Co ważne, przygotowanie próbki przed wszystkimi typami PCR wymaga całkowitego rozbicia wszelkich struktur biologicznych w celu oddzielenia kwasów nukleinowych, białek, lipidów i resztek komórkowych. Protokoły ekstrakcji i komercyjne zestawy do ekstrakcji RNA przed RT-PCR opierają się głównie na tak zwanej izolacji „Chomscynskiego” (Chomscynski & Sacchi, 1987) , która traktuje próbki mieszaniną kwaśnego tiocyjanianu guanidyniowego, fenolu i chloroformu, które całkowicie niszczy wszelkie złożone organizmy. W związku z tym każdy PCR, nawet jeśli zostanie przeprowadzony prawidłowo, może jedynie sprawdzić obecność danego celu genetycznego, ale nie „żywołność” podstawowego patogenu. Dlatego PCR w żadnym wypadku nie może służyć jako środek do oceny zakaźności osobnika.

Złotym standardem określania zakaźności i miana wirusa zakaźnego jest odtwarzalność wirusa będącego przedmiotem zainteresowania w odpowiedniej hodowli komórkowej (Berczuk i in., 2020; Case i in., 2020 ; Puhach i in., 2022 ; EVAg Portal ; Repozytorium Zasobów PZH IB) . Możliwą aktywność replikacyjną wirusa w obrębie badanego osobnika może zapewnić test RT-PCR oparty na wykrywaniu subgenomowego RNA

(sgRNA), które będą generowane tylko podczas replikacji wirusa w zakażonych komórkach (Bruce i in., 2022 ; Puhach i in., 2022) . Warto zauważyć, że ponieważ sgRNA zostało zweryfikowane do 17 dni po wykryciu infekcji, brak sgRNA wskazuje na brak replikacji wirusa, ale obecność sgRNA niekoniecznie wskazuje na zakaźność (Bruce i in., 2022) . Co ciekawe, specyficzna dla sgRNA RT-PCR dla SARSCoV-2 została opisana w manuskrypcie przesłanym 1 marca 2020 r. przez Wölfel i in., (2020) , którego współautorami byli pierwsi i starsi autorzy protokołu Charité. Od tego momentu wszystkie zalecane przez WHO protokoły powinny zostać zasadniczo zmienione. Oni nie byli.

Ogólnie rzecz biorąc, PCR może jednak przyczynić się do poprawy diagnostyki różnicowej, tj. przy stosowaniu testów multipleksowych dla szerokiego zakresu patogenów w celu rozróżnienia różnych infekcji płuc, które często objawiają się podobnymi objawami klinicznymi. Podobnie jak w przypadku każdego innego testu laboratoryjnego, wynik testu PCR należy interpretować w kontekście objawów występujących u pacjenta. Ponieważ PCR stanowi bardzo czułą technikę, w rzeczywistości możliwe było wykrycie niedostatecznie reprezentowanego patogenu w mieszaninie patogenów znalezionej w płynie ustrojowym lub tkance w próbce pacjenta, jak faktycznie zgłoszono w przypadku dwóch z pierwszych pięciu pacjentów z COVID-19 w Wuhan (Ren i in., 2020) . Co więcej, pozostałości w postaci pozostałych fragmentów kwasu nukleinowego SARS-CoV-2 lub jakiegokolwiek innego koronawirusa lub wcześniejszego patogenu, który mógł być wcześniej obecny, można wykryć metodą PCR po tym, jak naturalny układ odpornościowy pacjenta oczyścił już wszelkie czynniki zakaźne i może zatem skutkować wyraźnym pozytywnym sygnałem PCR, który w rzeczywistości jest fałszywy (Puhach i in., 2022) .

RT-PCR MOŻE TYLKO WSPIERAĆ , ALE NIE ZASTĄPIĆ MEDYCZNEJ DIAGNOZY RÓŻNICOWEJ

Podsumowując, należy pamiętać o kluczowych problemach związanych z testami laboratoryjnymi opartymi na PCR:

- Po pierwsze, istnieje wyraźna różnica w kluczowym pytaniu między testami klinicznymi i epidemiologicznymi. Podczas gdy testy kliniczne mają na celu uzyskanie wysokiej czułości w celu potwierdzenia lub odrzucenia podejrzenia zakażenia u osoby z objawami, testy epidemiologiczne mają na celu specyficzne wykrycie osób prawdziwie zakaźnych, które są w stanie rozprzestrzenić infekcję wirusową. Ponieważ PCR nie jest w stanie wykryć ani przewidzieć, czy osoba z pozytywnym wynikiem testu będzie zakaźna, czy nie (Puhach i in., 2022 ; **Ramka 1**), nie stanowi „solidnego narzędzia diagnostycznego”. W związku z tym testy oparte na PCR nigdy nie powinny być wykorzystywane do obserwacji bezobjawowej zdrowej populacji w celu „wykrycia” sekwencji kwasu nukleinowego SARS-CoV-2 lub jakiegokolwiek innego wirusa.
- Po drugie, wynik testu PCR w żaden sposób nie może zastąpić dokładnej diagnozy medycznej uwzględniającej cechy pacjenta, tj. objawy, historię kontaktów, choroby współistniejące, historię leków, wiek i wartość Ct. COVID-19 ma wspólne objawy infekcji dróg oddechowych i dlatego nie można go dokładnie zdiagnozować na podstawie pojedynczego wyraźnego objawu lub oznaki, jak niedawno opublikowano w raporcie Cochrane (Struyf i in. 2020) .
- Po trzecie, nawet w przypadku, gdy test PCR, taki jak nasz, wykazuje zarówno doskonałą specyficzność, jak i czułość, pozostaje ryzyko wyników fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne, które mogą wynikać z błędów technicznych i klinicznych. Jak doniesiono w przeglądzie systematycznym i metaanalizie (Cevik i in., 2021) , okres zakaźny SARS-CoV-2 wydaje się rozpoczynać około dwóch dni po ekspozycji i trwa do 12 dni od wystąpienia objawów. Natomiast PCR może pozostać dodatni przez okres do 90 dni według CDC (2019 a) . W związku z tym osoby z dodatnim wynikiem PCR niekoniecznie są osobami, które mogą przenosić wirusa. Ta rozbieżność staje się oczywista w grupie osób z pozytywnym wynikiem testu, ale bezobjawowych, reprezentujących niskie początkowe liczby

docelowe i wysokie wartości Ct w odczycie testu. W tym przypadku zdecydowana większość nie będzie zakaźna, ale reprezentuje kliniczne wyniki fałszywie dodatnie, obejmujące zarówno osoby wyleczone, które nadal wykazują pozostałości wirusa, jak i osoby odporne, które nie będą zaraźliwe z powodu niewystarczającego miana wirusa (Cevik i in., 2020 ; Lyons-Weiler, 2021) . Aby zapoznać się z kompleksowym przeglądem problemu klinicznych wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych, patrz Rycina 2 w Verna i in. (Verna i in., 2021) . Raczej, zgodnie z zaleceniami zarówno WHO, jak i CDC, test PCR pomoże lekarzowi w potwierdzeniu lub odrzuceniu wstępnego podejrzenia, czy pacjent z objawami cierpi na możliwą infekcję SARS-CoV-2 (WHO, 20 stycznia 2021 r .; CDCb ; CDCc) .

C T - WARTOŚĆ KORELACJE Z DOCELOWĄ ILOŚCIĄ GENU

Próg cyklu (Ct), zwany także oznaczaniem ilościowym cyklu (Cq), to numer cyklu, przy którym fluorescencja zamplifikowanego produktu PCR może być specyficznym sygnałem powyżej tła. Stanowi miarę ilości określonej sekwencji kwasu nukleinowego, która była obecna w oryginalnej próbce. Im niższa wartość Ct, tym więcej materiału docelowego było początkowo obecne.

Ponieważ odwrotna transkrypcja, warunki starterów i struktury drugorzędowe w miejscach wiązania starterów reprezentują procesy stochastyczne, wartość Ct może się różnić w zależności od różnych serii RT-PCR i różnych laboratoriów. Dlatego należy uwzględnić geny referencyjne o określonych ilościach, aby zmierzyć względną kwantyfikację między różnymi grupami badawczymi. Stanowi to minimalne wymaganie dla „solidnego narzędzia diagnostycznego”, ale w niewytłumaczalny sposób nie zostało wykonane przez autorów protokołu Charité. Ponadto bezwzględne oznaczenie ilościowe określonego miana wirusa obecnego w określonej próbce wymaga metodologii qPCR z serią rozcieńczeń znanych ilości inaktywowanego wirusa. Następnie wartość Ct nieznanej próbki można skorelować z wartościami Ct serii rozcieńczeń i można oszacować liczbę wirusów w celu określenia liczby kopii wirusów na ml — tak zwanego „obciążenia wirusem”.

W przypadku SARS-CoV-2 zgłoszono już w kwietniu 2020 r. (Wölfel i in., 2020 ; współautorstwo pierwszych i starszych autorów protokołu Charité), że minimum 106 kopii RNA/ml jest porównywalne z miano wirusa, które można wykorzystać do zakażenia właściwej hodowli komórkowej, a zatem jest określane jako „potencjalnie zakaźne”. Wykonywanie 45 cykli PCR, protokół Charité został opisany w celu wykrycia zaledwie czterech kopii RNA na próbkę (około 10³ kopii RNA/ml) według Corman et al., (2020) . Niektóre komercyjne zestawy testowe podają próg wykrywalności 10 kopii RNA na próbkę (Tib Molbiol) . Jest to w przybliżeniu od 10³ do 10⁵ razy bardziej czule niż zakaźne miano wirusa wymagane do hodowli SARS-CoV-2 w odpowiednich warunkach hodowli komórkowej. Co niezrozumiale, protokół Charité zlicza każdą próbkę z sygnałem PCR do 45 cykli jednoznacznie dodatnich bez definiowania jakiegokolwiek wartości odcięcia Ct, która rozróżnia decyzję pozytywną/negatywną i bez jakiegokolwiek korelacji z próbkami kontrolnymi zawierającymi określone liczby kopii RNA. Natomiast nasz test 5'-UTR koreluje określone ilościowo liczby kopii RNA z określonymi wartościami Ct w oparciu o krzywą kalibracyjną zbudowaną z seryjnych logarytmicznych rozcieńczeń syntetycznego genomu SARS-CoV-2 z dokładnie określonymi stężeniami docelowej sekwencji. Ponadto przeprowadza się sekwencjonowanie w celu potwierdzenia amplikonów i określenia typu wariantu wirusa, który pojawia się w teście. Co ważne, sam pozytywny sygnał PCR nie pozwala nam wyciągać wniosków na temat możliwego zakaźnego miana wirusa, jeśli nie podano wartości Ct i jeśli wynik nie jest specyficznym związany z określoną krzywą standardową (Kohmer i in., 2021) . Oba te wymagania muszą być spełnione. Wartości Ct mniejsze niż 25 odzwierciedlają więcej niż 106 kopii RNA na ml próbki, co można skorelować z potencjalnie zakaźnym ładunkiem wirusowym.

W przeglądzie systematycznym opublikowanym w grudniu 2020 r Jefferson i wsp. zasugerowali, że próbki z Ct>25 nie będą zawierały wystarczającej ilości materiału genetycznego, aby korelować z potencjałem zakaźnym. W czerwcu 2021 r. Jaafar i wsp. skorelowali 3790 pozytywnych próbek RT-PCR z kolejnymi udanymi hodowlami komórkowymi. Autorzy ci wykazali, że wirus można hodować w 70%, 20% i 3% próbek przy zastosowaniu wartości Ct odpowiednio 25, 30 i 35. W sierpniu 2021 r. Stang i wsp. poinformowali, że wartości Ct między osobami z objawami i bezobjawowymi zwykle różnią się o więcej niż cztery cykle (odpowiednio 25,5 w porównaniu z 29,6). Doszli do wniosku, że wartość Ct służąca do definiowania osobników potencjalnie zakaźnych powinna zostać obniżona z 30 do 25.

LICZBA I SWOISTOŚĆ DOCELOWEGO GENU

Aby niezawodnie wykryć określony genom wirusa za pomocą RT-PCR, obowiązkowy jest dobrze zdefiniowany, wysoce specyficzny i idealnie konserwowany region docelowy (taki, jaki uwzględniliśmy w naszym teście 5'-UTR). W przypadku, gdy takiego regionu nie można zidentyfikować, alternatywnie, więcej niż jeden gen lub specyficzna sekwencja tego wirusa musi być celem dla różnych zestawów specyficznych starterów. Protokół Charité (Corman i in., 2020) prawidłowo określił trzy geny docelowe do wykrywania SARS-CoV-2, a mianowicie gen E, gen RdRp (który jest genem ORF-1ab kodującym białko RdRp) i gen N. Jednak startery wybrane dla docelowego genu Charité E zostały określone jako specyficzne dla całej grupy koronawirusów Sarbeco, w tym SARS i sarbecowirusów pochodzących od nietoperzy. Ten cel wyraźnie nie spełnia wymagań dotyczących określonego wykrywania SARS-CoV-2 w fazie projektowania i w konsekwencji został wykluczony z analizy w manuskrypcie testującym wszystkie zalecane przez WHO protokoły RT-PCR autorstwa Tao i in., (2022). Ponadto sonda z celu RdRp została zdefiniowana jako „Pan-Sarbeco”, co czyni ją jeszcze mniej specyficzną jako test na SARS-CoV-2.

Tabela 2

Swoistość docelowych genów SARS-CoV-2 E, RdRp i N, oceniona w teście określonym przez Niemiecki Instytut Instand (Zeichhardt & Kammel, 2020), wykazująca wysokie ryzyko wyników fałszywie dodatnich, zwłaszcza poprzez reaktywność krzyżową z koronawirusami powodującymi przeziębienie, takimi jak HCoV 229E. *Warto zauważyć, że HCoV229E należy do rodzaju alpha-Coronaviridae, podczas gdy SARS-CoV-2 i inne Sarbecovirusy należą do rodzaju beta-Coronaviridae. Wirusy „przeziębienia” HCoV-HKU1 i OC43 są klasyfikowane do tego ostatniego rodzaju, a ich organizacja genomu jest znacznie bliższa Sarbecovirusom (Liu i in., 2021), dlatego jeden z tych dwóch wirusów byłby lepszą kontrolą.

Gen docelowy	Liczba testów przeprowadzane przy użyciu różnych zestawów testowych	Test swoistości 1 Hodowla komórkowa (wolna od wirusów) Prawidłowo zidentyfikowane jako ujemne Przypadki [%]	Test swoistości 2 Hodowlę komórkową (z HCoV229E*) Prawidłowo zidentyfikowany jako SARS-CoV-2 negatywny Sprawy [%]	Mieć na myśli specyficzność z próbek 1 i 2 [%]	Średni poziom błędów (fałszywie dodatnie) (100 – średnia specyficzność) [%]
E-gen	373	371 [99,46]	355 [95,17]	97.31	2,69
gen RdRp	182	178 [97,80]	165 [90,66]	94,23	5,77
gen N	166	164 [98,20]	146 [87,95]	93.08	6,92

Pomimo faktu, że ich projekt najwyraźniej miał na celu nie być wyłącznie specyficznym dla nowego SARS-CoV2, wszystkie cele, które wybrali do amplifikacji, mają swoją własną bezwzględną specyficzność i poziom błędów (tabela 2). Liczbę wyników fałszywie dodatnich można obliczyć dla każdego pojedynczego genu, a także dla dowolnej ich kombinacji. Mówiąc krótko, ryzyko wyników fałszywie dodatnich dla niespecyficzných starterów, takich jak te stosowane w protokole Charité, zależy od liczby badanych genów docelowych. Im mniej genów docelowych jest testowanych, tym większa liczba fałszywie dodatnich wyników, które zostaną wygenerowane. Jest więc całkowicie niezrozumiałe, dlaczego WHO w czasie pandemii zaleciła zmniejszenie liczby docelowych genów bez poprawy specyficzności projektu startera. W oryginalnym protokole Charité (opublikowanym 13 stycznia 2020 r.) WHO (24 stycznia 2021 r.) zaleciła testowanie trzech docelowych genów (genu E, genu RdRp, genu N). Mogłoby to ograniczyć liczbę fałszywych trafień. Jednak w pierwszej modyfikacji (opublikowanej 17 stycznia 2020 r.) detekcja PCR genu N (najbardziej specyficzna i najmniej czuła w serii rozcieńczeń według Muenchhoff et al., 2020), a zatem najrzadziej występująca cel fałszywie dodatni został pominięty (WHO, 13 stycznia 2020 r.). Co gorsza, przy drugiej modyfikacji (opublikowanej 2 marca 2020 r.) WHO zaleciła, aby „na obszarach, gdzie wirus COVID-19 jest szeroko rozpowszechniony, można przyjąć prostszy algorytm, w którym na przykład badanie przesiewowe za pomocą RT-PCR pojedynczy cel dyskryminacyjny (tj. gen E) jest uważany za wystarczający” (2 marca 2020 r.). Te modyfikacje — zwłaszcza ostateczna rekomendacja, aby przetestować wysoko niespecyficzny gen E jako jedyny cel — z pewnością zwiększył ryzyko wyników fałszywie dodatnich, zwiększając w ten sposób liczbę przypadków, a także prawdopodobnie zwiększył liczbę wyników fałszywie ujemnych (Finn i Lucey, 2021; Kanji i in., 2021; Pecoraro i in., 2021).

KWESTIONA KONSTRUKCJA PODKŁADU

Każdy wiarygodny test RT-PCR zależy w dużym stopniu od jakości starterów zaprojektowanych do amplifikacji regionu wybranego jako specyficzny cel w obrębie sekwencji. Do celów diagnostycznych istotne jest, aby startery były w 100% specyficzne dla sekwencji będącej przedmiotem zainteresowania, aby uniknąć reaktywności krzyżowej z niemal homologicznymi sekwencjami blisko spokrewnionych genów, które mogą być wariantami wirusa (Bustin i Nolan, 2017). Gdy stosuje się dwa lub więcej zestawów starterów, wydajności amplifikacji na zestaw starterów mogą być różne. Może to skutkować różnymi czułościami testu ze względu na różnice w skuteczności primingu związanej z drugorzędową strukturą lub stabilnością (Chan i in., 2020). Protokół Charité opisuje startery zawierające do sześciu nieokreślonych pozycji. Nieokreślone pozycje skutkują zaprojektowaniem kilku różnych alternatywnych sekwencji starterów (dwa różne startery RdRp_SARSr_F + 8 różnych sond RdRp_SARS_P1 + 4 różne RdRp_SARSr_R). Ponadto jeden ze starterów N (sekwencja GCAGACGTGGTCCAGAACAAA) ma 10 wspólnych zasad z sekwencją ludzkiego chromosomu-1 (sekwencja GCAGACTCTGAGGGGATGCCA), z których sześć znajduje się na końcu 3' i dlatego stwarza wysokie ryzyko niespecyficznego primingu (Borger i in., 2020). Jednak odwrotny starter RdRp protokołu Charité jest jeszcze bardziej problematyczny, ponieważ jest w 100% identyczny z sekwencją obecną na ludzkim chromosomie-18 (Borger i in., 2020). Może to spowodować niezamierzoną amplifikację PCR nawet przy całkowitym braku jakichkolwiek sekwencji SARS-CoV-2. Ponadto zgłoszono, że gen RdRp jest problematyczny, ponieważ ma najniższy wskaźnik pozytywnego wykrywania i najwyższą wartość Ct (Anantharajah i in., 2021; Zimmermann i in., 2022). Innym ważnym aspektem projektowania starterów do PCR jest temperatura przyłączania (T_m), która w decydujący sposób zależy od zawartości GC sekwencji starterów. Im niższa T_m , tym większe ryzyko wyników fałszywie dodatnich. Ponadto T_m pary starterów powinna być bardzo bliska, najlepiej nie dalej niż 2°C według Bustina i in., (2009). Należy zauważyć, że wyżej wspomniana prognoza T_m in silico służy jedynie jako pierwsza wskazówka. Nie może uwzględniać wszystkich możliwych struktur drugorzędowych w szerszym kontekście genomycznym matrycy lub w dokładnym składzie mastermiksów PCR, które zawierają substancje chemiczne wpływające na T_m hybryd PCR, co pozwala na bardziej elastyczne stosowanie

starterów i sond , przy jednoczesnym rzekomym zachowaniu niezbędnej surowości wykrywania celu. Pomimo tego znacznego stopnia elastyczności dzięki nowoczesnym kompozycjom PCR, każdy projekt PCR wymaga ostatecznie projektu, który jest absolutnie specyficzny i odpowiednio czuły — określony w wytycznych ISO13485 i rygorystycznie przetestowany w ramach zewnętrznej oceny jakości (w naszym przypadku UK NEQAS). Według Borgera i in., (2020) oraz Cormana i in., (2020) , kilka starterów protokołu Charité ma wysoki stopień elastyczności T_m . Jednak w tym konkretnym przypadku elastyczności T_m starterów towarzyszyła wyraźnie suboptymalna wydajność testu PCR pod względem specyficzności. W przypadku „solidnego testu diagnostycznego” jest to niedopuszczalne. Dlatego test Charité powinien być zostać przeprojektowany przed wdrożeniem na całym świecie.

W ALIDACJA WYGENEROWANYCH AMPLIKONÓW PRZEZ SEKWENCJONOWANIE JEST OBOWIAZKOWA

Ocena bezwzględnej liczby wirusów w próbce pacjenta, która jest niezbędna do skorelowania wartości Ct z miano wirusa zakaźnego oszacowanego w hodowli komórkowej, wymaga ilościowego PCR, który różni się od jakościowego PCR. Jakościowy PCR generuje określony amplikon, który normalnie jest wykrywany przez analizę zależną od wielkości w żelu agarozowym i może być następnie użyty jako matryca do analizy sekwencjonowania. W ilościowym PCR generowana jest wartość Ct, która reprezentuje kinetykę skumulowanego sygnału fluorescencyjnego, który koreluje z degradacją sondy. W konsekwencji w tym procesie nie jest możliwe potwierdzenie prawidłowej amplifikacji genu docelowego. Zwłaszcza w przypadku nowo zaprojektowanych protokołów, po amplifikacji zwykle następuje analiza w żelu agarozowym i sekwencjonowanie w celu potwierdzenia zamplifikowanej sekwencji. Chociaż WHO zaleca sekwencjonowanie całego lub przynajmniej częściowego genomu (19.03.2020 ; 8.01.2021; 20.01.2021) , autorzy protokołu Charité nie uwzględnili tego ważnego kroku potwierdzającego, czyli sekwencjonowania Sangera .

nigdy nie uzyskano specyficzności starterów i sond stosowanych w ich protokole, które byłyby niezbędne do wytworzenia wiarygodnej amplifikacji swoistej dla celu (Corman i in., 2020) .

Co ciekawe, już w kwietniu 2020 r. społeczność naukowa wiedziała, że protokół Charité ma problemy ze specyficznością „nieznanego pochodzenia” (Konrad i in., 2020) . Nawet w znormalizowanych warunkach laboratoryjnych sami autorzy protokołu Charité (Corman i in., 2020) stwierdzili, że cztery pozytywne próbki były ujemne po ponownym przetestowaniu, co stanowi klasyczny przykład wyników fałszywie dodatnich lub przypadkowych zanieczyszczeń laboratoryjnych produktami PCR z powodu problemów z obsługą. Fakt, że autorzy rzeczywiście wyjaśnili swoje fałszywe alarmy jako „problemy z obsługą”, które wystąpiły nawet na samym początku protokołu Charité w warunkach laboratoryjnych z doświadczonym personelem, rodzi poważne pytania dotyczące wskaźników zanieczyszczenia w dużych laboratoriach rządowych, jak również w nowo powstałych komercyjnych laboratoriach, które od początku tzw. „pandemii” były pod presją wykonywania wielu testów PCR.

(2020) przeprowadzili eksperyment . Przesłali serię rozcieńczeń próbki pozytywnej SARS-CoV-2 PCR do siedmiu uczestniczących laboratoriów. Cała siódemka zgłosiła, że wszystkie próbki były ujemne przy $Ct \geq 32$. Autorzy podali:

„Na podstawie obliczeń z użyciem Primer Express v3.0 (Applied Biosystems, Dreieich, Niemcy) przewidywano, że temperatury przyłączania wyniosą 64°C dla przedniego startera RdRp i 51°C dla startera wstecznego RdRp protokołu Charité. Ta różnica temperatur może skutkować zmniejszoną wydajnością PCR”. Pomimo tych faktów autorzy doszli do następującego wniosku:

„Większość testów RT-PCR dla SARS-CoV-2 wykryła pięć kopii RNA na reakcję, co odzwierciedla wysoką czułość i ich przydatność do celów przesiewowych na całym świecie”.

Ten wniosek jest ważny, gdy czułość PCR jest brana pod uwagę sama. Jednak zgłoszona niezwykła czułość wskazuje na ryzyko amplifikacji nawet niewielkich pozostałości po przebytej infekcji. Robienie tego nie jest odpowiednie dla narzędzia diagnostycznego mającego na celu testowanie osób pozytywnych i negatywnych. Konsekwencje wynikających z tego błędów mogą być śmiertelne. Dlatego w przypadku testów RT-PCR specyficzność jest o wiele ważniejsza (Klement i Bandyopadhyay, 2021). Doskonała specyficzność dla docelowych genów w połączeniu z czułymi wartościami Ct (≤ 25) to cechy niezbędne do solidnego i wiarygodnego testu PCR.

Innym dobrze znanym wyzwaniem diagnostycznym jest występowanie mutacji i nowych wariantów wirusów. Ich istnienie wymaga regularnej walidacji i ewentualnie przeprojektowania starterów w celu uniknięcia potencjalnych niezgodności starterów z próbkami. Zostało to wykazane przez Osorio i współpracowników, którzy porównali 1825 sekwencji genomu SARS-CoV-2 zdeponowanych w bazie danych GISAID (marzec 2020) z sekwencją referencyjną Wuhan-Hu-1 (NC_045512). Następnie opisali w dopasowaniach miejsca wiązania 33 oligonukleotydów udostępnione przez WHO do zastosowania w RT-PCR i stwierdzili, że około 79% analizowanych sekwencji wiążących startery wykazywało mutacje w co najmniej jednym docelowym genie (Osorio i in., 2020).

Ponadto nasze własne dane NGS wygenerowane w Czechach od października 2020 r. do stycznia 2021 r. potwierdziły, że walidacja testu diagnostycznego opartego na PCR poprzez sekwencjonowanie jest obowiązkowa. Jest to niezbędne nie tylko w początkowej fazie zakładania, ale także regularnie w późniejszym okresie. Konieczność takiego podejścia wyraźnie pokazały nasze dane NGS, które ujawniły, że każda z trzech pojedynczych fal, których kulminacją była Republika Czeska w październiku 2020 r., listopadzie 2020 r. i grudniu 2020 r. / styczniu 2021 r., była genomowo różna od poprzedniej fali. Chociaż SARS-CoV-2 wykazuje wysoki wskaźnik mutacji, dzięki naszemu testowi 5'-UTR byliśmy w stanie wiarygodnie zidentyfikować wszystkie krążące szczepy, tj. alfa, beta, gamma, delta i omicron.

Co ciekawe, mutacje wykryte w fali z września 2020 r. nie występowały bezpośrednio po falach z listopada 2020 r. i grudnia 2020 r. Ta rozbieżność stała się w pełni oczywista w przypadku wariantu omicron, który podobno nie ma bezpośredniego związku ewolucyjnego z żadnym z poprzednich wariantów SARS-CoV-2 (Sun i in., 2022; także Perez i in., 2023) w tym czasopiśmie). Jest to więcej niż dziwne, biorąc pod uwagę fakt, że Republika Czeska wdrożyła wszystkie środki ograniczające, a mianowicie blokadę, masowe ograniczenia w podróżowaniu, dystans społeczny i maseczki na twarz. W ten sposób terytorium Republiki Czeskiej zachowywało się jak genetycznie ograniczona, odizolowana populacja, która nie wspierałaby takiej różnorodności SARS-CoV-2. Mianowicie, kolejne fale wywodzące się z ograniczonego obszaru powinny posiadać wszystkie kolejne mutacje swoich poprzedników. Mógł uzyskać więcej mutacji podczas swojej ewolucji, ale logicznie nie może magicznie wymazać mutacji, które wystąpiły we wcześniejszych falach tej samej sukcesji wirusowej. Jeszcze dziwniejszy był fakt, że zaobserwowana rozbieżność była najbardziej widoczna między szczepami SARS-CoV-2 z września 2020 r. i listopada 2020 r. Swoistym zjawiskiem było to, że fala listopadowa „straciła” 14 mutacji obecnych w bezpośrednio poprzedzającej fali wrześniowej. Możemy jedynie spekulować na temat tych niezwykłych cech genomowych kolejnych „fal” SARS-CoV-2, jednak ze względu na dostępną literaturę na temat odwrotnej genetyki wirusów RNA (Perez, 2017), a zwłaszcza na temat tego, jak łatwo jest genetycznie manipulować zakaźnymi koronawirusami (Cockrell i in., 2017; Muth i in., 2018) nie można wykluczyć sztucznej lub spowodowanej przez człowieka interwencji.

DOBRA PRAKTYKA LABORATORYJNA WYMAGA STANDARDOWEJ PROCEDURY OPERACYJNEJ (SOP)

Wysoka czułość technologii opartej na PCR idzie w parze z poważnym wąskim gardłem w wydajności. Nawet w przypadku 100% specyficzności testu, co jest równoznaczne z odsetkiem wyników fałszywie

dodatnich równym 0%, wynik odnosi się wyłącznie do braku reakcji z sekwencjami innymi niż wybrany(e) cel(e). Jednak ta specyficzność analityczna obliczona w certyfikowanych laboratoriach nie może być utożsamiana ze specyficznością w rzeczywistych testach, w których zanieczyszczenia, które również są wzmacniane wykładniczo, oraz błędy obsługi przez nieprzeszkolony personel nieuchronnie doprowadzą do generowania wyników fałszywie dodatnich. Na przykład Layfield i współpracownicy (2021) zgłosili fałszywie dodatnie próbki na mapie płytki, które znajdowały się w sąsiedztwie próbek o wysokim mianie wirusa ($Ct < 20$). Co więcej, gdy wskaźnik pozytywności zbliża się do wskaźnika wyników fałszywie dodatnich, wiarygodność pozytywnego wyniku testu spada do zera. Jest to szczególnie ważne, gdy częstość występowania jest niska, ponieważ jest więcej osób niezakażonych niż zakażonych. W tym scenariuszu niewielkie zmiany swoistości będą miały znacznie większy wpływ na prawdopodobieństwo, że dana osoba z pozytywnym wynikiem testu będzie miała infekcję niż zmiany wrażliwości (Cohen i in., 2020).

Aby uniknąć błędów nieodłącznie związanych z każdą analizą laboratoryjną, procedury wykrywania zawsze muszą być połączone, starannie zaprojektowane przez kompetentnych badaczy, z wiarygodną SOP. Test RT-PCR nadaje się jako narzędzie diagnostyczne do wykrywania wirusów tylko wtedy, gdy jest wystandaryzowany i kontrolowany na wszystkich poziomach. SPO jest niezbędna, jeśli błędne wyniki mają zostać wykluczone w rozsądnym zakresie. W celu wykrycia SARS-CoV-2 SOP powinien zawierać anonimowy panel próbek testowych zawierających inaktywowany materiał wirusowy udostępniony przez dostawcę zewnętrznego (tj. laboratorium referencyjne), próbkę ujemną oraz próbki z blisko spokrewnionym wirusem w celu sprawdzić specyficzność (próbki te muszą pozostać ujemne). Idealnie, SOP powinna również zawierać serię rozcieńczeń inaktywowanego wirusa w celu określenia czułości testu (z wartością Ct odpowiadającą zakażnemu ładunkowi wirusowemu). W kontekście ogólnoświatowej pandemii wymagane wymagania można spełnić jedynie poprzez eksperymentalne przetestowanie takiej procedury pod kątem jej ogólnoświatowej ważności. Ten ostatni wymóg ważności można spełnić jedynie w tak zwanym teście okrężnym (ramka 2).

Ramka 2: Kontrole wewnętrzne dla każdej serii RT-PCR powinny obejmować:

- ślepa wymazówka w celu wykluczenia kontaminacji podczas pobierania próbki;
- kontrolę ekstrakcji RNA w celu zapewnienia prawidłowej izolacji RNA;
- kontrola negatywna ze składnikami zestawu tylko w celu ochrony przed zanieczyszczeniem zestawu produkcyjnego lub klinicznego; ▪ „wodoodporny” jako wewnętrzna kontrola negatywna;
- gen odniesienia (np. ludzka RNazaP) jako wewnętrzna kontrola pozytywna;
- pozytywne kontrole inaktywowanego SARS-CoV-2 wyizolowanego z supernatantów hodowli komórkowej w celu skorelowania wartości Ct z liczbą kopii zakaźnego miana wirusa zdolnego do replikacji, np. za pomocą testów lysinkowych (Mendoza i in., 2020). Obejmuje to (1) stężenie odpowiadające zakażnemu obciążeniu wirusowemu (10^7) z $Ct < 30$ we wszystkich zamplifikowanych genach docelowych oraz (2) sondę odpowiadającą niezakażnemu stężeniu (np. 5×10^5) w celu określenia wartości Ct , powyżej której RT-PCR uzyskuje wyniki ujemne. Te pozytywne kontrole muszą zostać sprawdzone pod kątem kontroli jakości, ponieważ wirus będzie obecny w linii komórkowej i może nie odzwierciedlać pojawiających się wirusów.

- kontrola reaktywności krzyżowej (musi pozostać ujemna), np. linie koronawirusa „normalnej grypy sezonowej”, takie jak OC43 i 229E, które podobnie jak kontrole pozytywne SARS-CoV-2 zostały inaktywowane przy mianie wirusa ¹⁰⁷.
W idealnej sytuacji powinny to być docelowe kontrole negatywne próbek ludzkich z potwierdzoną sekwencją Sangera.

Potrzeba SOP została oczywista dzięki badaniom w Niemczech koordynowanym przez Instand eV, organizację, która przyznaje certyfikaty dobrej praktyki laboratoryjnej. Ich pierwszy test okrężny mający na celu walidację Charité RTPCR, obejmujący 488 laboratoriów, ujawnił poważne problemy (Zeichhardt i Kammel, 2020). Warto zauważyć, że podczas trwającego testu okrężnego trzy z siedmiu próbek zostały wykluczone z ślepego panelu z powodu „pilnych próśb z Niemiec i zagranicy o ujawnienie właściwości próbek do przetestowania przed końcem przedłużonego okresu składania wniosków, tj. przed 28 kwietnia 2020 r., aby laboratoria mogły w krótkim czasie poprawić swoją metodę badawczą w przypadku ewentualnych błędnych pomiarów”. Interwencja w procedurę okrężną jest bardzo nietypowa, a raportu nie można traktować jako reprezentującego niezależną zewnętrzną procedurę walidacji uczestniczących laboratoriów. Dodatkowym problemem, nawet w tej kontrolowanej procedurze testu okrężnego, z już przygotowanymi próbkami i ograniczonym zakresem testu, są pomyłki próbek, które miały miejsce w 24 laboratoriach, co co ciekawe, zawsze wpływało na tę samą SARS-CoV-2 dodatnią sondę z sonda kontrolna zawierająca wirusa przeziębienia HCoV229E (Zeichhardt & Kammel, 2020). Wreszcie zauważono, że wykrywanie docelowych genów wykazało ogromne różnice między laboratoriami pod względem wartości Ct. Na przykład wartości Ct dla tej samej rozcieńczonej próbki SARS-CoV-2 (numer próbki 340061) wahały się między 15-40 dla genu E, 20-40,7 dla genu N i 19,5-42,8 dla genu RdRp- gen. Oczywiście, w dużej mierze różne wartości Ct dla różnych docelowych genów opartych na tym samym celu wykazują różną czułość celów iw dużej mierze zależy od początkowego sukcesu amplifikacji. Ponieważ PCR jest procesem 2-logarytmicznym, każdy mały początkowy problem również wzrośnie logarytmicznie. Podkreśla to potrzebę uwzględnienia kontrolnej krzywej standardowej w każdym PCR w celu oceny wyników. Wszystkie te dane w imponujący sposób pokazują skrajny brak standaryzacji testów w uczestniczących, certyfikowanych laboratoriach. Ponieważ nie ma światowych (a przynajmniej ogólnounijnnych lub amerykańskich) SOP, możemy sobie jedynie wyobrazić ogromną zmienność generowaną w laboratoriach wykrywających „RNA SARS-CoV-2” w próbkach rzeczywistych pacjentów.

Wniosek

NARUSZENIE ZASAD DOBREJ PRAKTYKI NAUKOWEJ UMOŻLIWIŁO POLITYKOM STOSOWANIE MEDYCYNY BEZ DOWODÓW NA CAŁE POPULACJE

Protokół Charité stanowi naruszenie wszystkich uznanych na szczeblu międzynarodowym zasad dobrej praktyki naukowej (**ramka 3**). Najpierw startery i sondy użyte do RT-PCR zostały przesłane do firm testujących, tj. Labor Berlin i Tib Molbiol, i udostępnione na rynku jako Light Mix Diagnostic Zestawy testowe, tj. LightMix® Modular SARS-CoV-2/COVID-19, RdRp; LightMix® Modułowy SARS-CoV2/COVID-19, E-gen; Tib Molbiol, Roche Diagnostics przed publikacją naukową i bez wzmianki o tym fakcie i związanym z nim konflikcie interesów w publikacji naukowej. Po drugie, protokół testu został opublikowany online jako wytyczne WHO (WHO, 24 stycznia 2021 r.) przed recenzją i publikacją w Eurosurveillance (Corman i in., 2020) . Dopiero wtedy został poddany szybkiej 24-godzinnej recenzji, co było retrospektywnie uzasadnione zbliżającą się pandemią. Niemniej jednak w dniu 21 stycznia 2020 r., czyli w dniu przesłania manuskryptu, na całym świecie odnotowano tylko sześć zgonów (Nasz świat w [danych](#)) . Ponadto zestaw Tib Molbiol LightMix był już dostępny w Słowenii na tydzień przed publikacją protokołu Charité (Poljak i in., 2020) . W tym czasie w Europie nie udokumentowano ani jednego przypadku SARS-CoV-2 (Nasz świat w [danych](#)) . Po trzecie, dwóch autorów jest członkami Rady Redakcyjnej Eurosurveillance, jeden jest dyrektorem zarządzającym Tib Molbiol, a jeszcze inny jest starszym pracownikiem naukowym w GenExpress i doradcą naukowym Tib Molbiol — żaden z tych potencjalnych konfliktów interesów nie został ujawniony, gdy przesłanie manuskryptu (Borger i in., 2020) .

Zaniedbanie uznanych na całym świecie zasad dobrej praktyki naukowej skłoniło do opublikowania bardzo wadliwego testu laboratoryjnego. Następnie pozytywne wyniki RT-PCR zrównano z „przypadkami COVID-19”, nawet przy braku jakichkolwiek objawów choroby. Jednak „przypadek” oznacza objawy i diagnozę choroby, tutaj COVID-19, a nie obecność (części) SARS-CoV-2. Również z naukowego punktu widzenia codzienne doniesienia o tzw. „nowych przypadkach” czy „nowych infekcjach” nie miały żadnego sensu, ponieważ nie ustalono, czy są one „nowe”, ani czy są „zakaźne”. Wysoka czułość PCR umożliwia wykrycie fragmentów wirusa dowolnego pochodzenia, ale PCR nie może zdiagnozować „przypadków” ani „infekcji”. Rzeczywiście, ponad połowa pozytywnych wyników testów prawdopodobnie nie jest zakaźna (Jaafar i in., 2021) . Niemniej jednak rządy wprowadziły kwarantanny zdrowych ludzi i wprowadziły blokady ze znacznymi dodatkowymi szkodami dla populacji i gospodarek na całym świecie w oparciu o głęboko wadliwy test laboratoryjny RT-PCR.

W wyniku braku aktywności korygującej polimerazy, wskaźnik mutacji nukleotydów SARS-CoV-2 szacuje się na $8E-04$ substytucji na miejsce rocznie (The Open Science Prize, 2020) . Istnieje duże prawdopodobieństwo, że nowe odmiany genetyczne SARS-CoV-2 mogą zagrozić zarówno czułości, jak i specyficzności ustalonych testów RT-PCR. Jest to tym bardziej prawdopodobne, biorąc pod uwagę, że wykazano, że 8,5% wszystkich mutacji (nowe różnice nukleotydów) w wariantach SARS-CoV-2 na całym świecie odwzorowuje znane

Lokalizacje starterów PCR (Penarrubia i in., 2020) . Dlatego zalecamy ciągle monitorowanie zmian genomowych w celu zapewnienia szybkiej odpowiedzi w przypadku konieczności ponownego zaprojektowania testu.

Dlatego z krajowego punktu widzenia zdrowia publicznego agencje powinny wymagać stałego nadzoru sekwencjonowania Sangera nad dodatnimi i ujemnymi RT-PCR, objawowymi osobnikami w celu wykrycia zaniku w Sanger-dodatnim i Sanger-ujemnym w czasie, aby zapobiec ucieczce PCR opartej na ewolucji. W tym przypadku oficjalne liczby szacunków przypadków powinny zostać skorygowane w dół w oparciu o

utrąę Sangera-dodatniego i w górę w oparciu o utrąę Sangera-ujemnego (obie zgłoszone z przedziałami ufności).

Podsumowując, pozytywne wyniki testu obejmują mieszanę prawdziwych przypadków COVID-19 (tj. kontakt z SARS-CoV-

2 co najmniej 9 dni przed badaniem, prawdopodobnie zakaźny z objawami choroby układu oddechowego), przypadki nieprawdziwe (tj. kontakt z wirusem lub fragmentami wirusa mniej niż 9 dni temu, prawdopodobnie niezakaźny, czasem z objawami) oraz przypadki fałszywe (zdrowe, na pewno nie zakaźne). Rozkład tych trzech kategorii zależy od różnic laboratoryjnych, używanych zestawów, umiejętności techników itp. Dlatego zdecydowanie sprzeciwiamy się stosowaniu technologii RT-PCR do pomiaru „przypadków” lub „zakażeń” bez odpowiedniego i niezależnego „staromodnego” diagnoza postawiona przez lekarza. Doszliśmy do wniosku, że zastosowanie tej technologii jako instrumentu do masowych testów obejmujących całą populację niepotrzebnie wyolbrzymiło i przedłużyło pandemię COVID-19 i powinno zostać pominięte w podobnych przyszłych scenariuszach.

Ramka 3: Uznane międzynarodowo zasady dobrej praktyki naukowej obejmują:

- aspekty formalne, np. rzetelna weryfikacja wyników badań przez niezależnych recenzentów przed publikacją oraz wyrażenie wszelkiego rodzaju istniejącego konfliktu interesów przez wszystkich współautorów, np. finansowanie projektu przez przemysł farmaceutyczny,
- aspekty badawcze, np. wdrożenie ważnego protokołu, w tym kontroli pozytywnych i negatywnych, a także potwierdzenie wyników i zastosowanie odpowiednich i solidnych technik,
- zapewnienie jakości i ustanowienie standardów. Te ostatnie mają szczególne znaczenie przy opracowywaniu nowych metod lub testów diagnostycznych, zwłaszcza gdy wynik testu może zadecydować o leczeniu pacjenta.

BRĄK PRZEJRZYSTOŚCI BYŁ I NADAL JEST WSZECHOBECNYM TOWARZYSZEM KRYZYSU, KTÓRY PRZYCZYNIŁ WIĘCEJ SZKODY NIŻ POŻYTKU

Dwa artykuły redakcyjne BMJ argumentowały, że podczas COVID-19 politycy i rządy tłumią naukę, aby przyspieszyć komercyjną dostępność diagnostyki i leczenia (Abbasi, 2020 ; Jureidini i McHenry, 2022) . Chociaż w świetle zbliżającej się „pandemii zabójczego wirusa” można obronić publikację i wprowadzenie na rynek suboptymalnego testu RT-PCR do wykrywania SARS-CoV-2, wszelkie błędy i nieodpowiednie standardy naukowe wykryte po publikacji muszą zostać natychmiast zgłoszone i poprawione. Wniosek o wycofanie protokołu Charité (Corman i in., 2020) w oparciu o dziesięć zastrzeżeń formalnych i technicznych został złożony do redakcji Eurosurveillance w listopadzie 2020 r., ale wydaje się, że nigdy nie została poważnie rozważona (Borger i in., 2020) . Prośba została odrzucona w internetowym oświadczeniu opartym na pięciu nieujawnionych opiniach ekspertów, chociaż żaden z problemów nie został odpowiednio rozwiązany ([Nota redakcyjna](#) Euroinwigilacja). Co więcej, nie wspomniano nawet o dodatku zawierającym 20 recenzowanych, opublikowanych artykułów potwierdzających te obawy. Późniejszy apel o ujawnienie raportów recenzentów pięciu recenzentów został odrzucony przez Radę Redakcyjną Eurosurveillance, a tym samym naruszył kluczowe standardy naukowe, które gwarantują przejrzysty proces recenzowania, aby umożliwić uczciwy dialog naukowy. Dlaczego nie zdecydowali się poinformować społeczności naukowej o możliwych niedociągnięciach i pułapkach protokołu Charité, pozostaje nieuchwytny.

Wreszcie, procesy decyzyjne WHO nie są przejrzyste, ponieważ są stosowane 12 lat po świńskiej grypie, nadal nie jest jasne, dlaczego WHO zmodyfikowała definicję pandemii. Zgodnie ze starą definicją w ogóle nie byłoby możliwe ogłoszenie pandemii COVID-19. Niezrozumiałe jest również, dlaczego WHO nie opublikowała od razu angielskiej wersji testu RT-PCR opracowanego przez CCDC, ale opublikowała inny test europejski. Kolejnym pytaniem bez odpowiedzi jest to, dlaczego WHO nie poinformowała od razu o znaczeniu wartości Ct i interpretacji wyników testu RTPCR, kiedy technologia PCR została przyjęta jako „złoty standard” w wykrywaniu SARS-CoV-2? Dlaczego zrobili to dopiero po pełnym roku od wybuchu pandemii (WHO, 20 stycznia 2021 r.)? Dlaczego wpływowi naukowcy, tacy jak Marion Koopmanns i Anthony Fauci, nie zwrócili uwagi na niewłaściwe wykorzystanie PCR jako tak zwanego „złotego standardu” do wykrywania osobników „zakaźnych”, chociaż musieli wiedzieć lepiej, jak wykazali w wywiadach i podcastach (zob. ramka 1)? Jeśli brak przejrzystości nie wynika z ignorancji naukowej, co uważamy za rozsądny wniosek, wydaje się, że wiąże się to z niepożądaną ingerencją polityki w naukę i praktykę medyczną. Jeśli tak, byłoby to niepokojące. Za wszelką cenę sama nauka musi przynajmniej pozostać wolna od ideologii politycznych, dogmatów i interesów finansowych.

Podziękowanie

Dziękujemy licznym członkom społeczności naukowej, którzy dostarczyli cennych informacji, ale zdecydowali się pozostać anonimowi lub są cytowani w tekście. Ogromne podziękowania dla dr Sin Hang Lee i dr Jamesa Lyonsa-Weilera za pomoc jako redaktorów-czytelników.

Autorskie Wkłady

UK, SP, PB, KS: Projekt studium. SP: analiza NGS. RJK, RL, KS: Przegląd projektu. Wszyscy autorzy byli zaangażowani w przegląd literatury i pisanie manuskryptu.

Oświadczenie o finansowaniu

RL zostało sfinansowane z unijnego programu badań i innowacji Horyzont 2020 na podstawie umowy o dotację nr. 883441, projekt STAMINA (Demonstracja inteligentnego wspomaganie decyzji w przewidywaniu i zarządzaniu kryzysem pandemicznym w granicach Europy i poza nią). Żaden inny autor nie zadeklarował specjalnego grantu na te badania od żadnej agencji finansującej w sektorze publicznym, komercyjnym lub non-profit.

Deklaracja dotycząca konfliktu interesów

SP jest właścicielem i szefem firmy Tilia Laboratories, która koncentruje się na diagnostyce i badaniach z zakresu mikrobiologii molekularnej i genetyki. RL, Erasmus MC i BioCoS podpisali umowę współwłasnościową związaną z metodami wykrywania SARS-CoV-2. Wszyscy pozostali autorzy oświadczają, że nie otrzymali żadnego wsparcia ze strony żadnej organizacji na nadesłaną pracę; że nie mieli powiązań finansowych z żadną organizacją, która mogłaby być zainteresowana przedłożoną pracą w ciągu ostatnich trzech lat; i nie mają żadnych innych relacji, ani nie angażowali się w żadne działania, które mogłyby choćby pozornie mieć wpływ na przedłożoną pracę.

Bibliografia

Abbasi, K. (2020). COVID-19: upolitycznienie, „korupcja” i tłumienie nauki. Brytyjski dziennik medyczny 71m4425. <https://doi.org/10.1136/bmj.m4425>.

- F. Amanat, D. Stadlbauer, S. Strohmeier i in. (2020). Test serologiczny do wykrywania serokonwersji SARS-CoV-2 u ludzi. *Medycyna przyrodnicza* 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). Jak wybrać odpowiednie zestawy starterów RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania genomu SARS-CoV-2? *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). Potencjalne wykorzystanie niekodujących RNA i innowacyjnych strategii terapeutycznych do ukierunkowania na 5'-UTR SARS-CoV-2. *Epigenomika* 12:1349-1361. <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0162> . _____
- Basile K., Maddocks, S., Kok, J. & Dwyer, DE (2020.) Dokładność wśród niejednoznaczności: również pozytywne testy kwasu nukleinowego SARS-CoV-2, gdy częstość występowania COVID-19 jest niska. *Patologia* 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). Patologia płuc COVID-19: wieloinstytucjonalna kohorta sekcji zwłok z Włoch i Nowego Jorku. *Współczesna patologia* 33:2156-2168. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-00661-1> . _____
- Borger, P., Malhotra, BR, Yeadon, M. i in. (2020). Zewnętrzna recenzja testu RTPCR do wykrywania SARS-CoV-2 ujawnia 10 głównych błędów naukowych na poziomie molekularnym i metodologicznym: konsekwencje fałszywie dodatnich wyników. <https://web.archive.org/web/20220122062141/https://cormandrostenreview.com/report/> . [Oryginalny link <https://cormandrostenreview.com/report> nie dostępny].
- Braun, J., Loyal, L., Frensch, M. et al. (2020). Komórki T reagujące na SARS-CoV-2 u zdrowych dawców i pacjentów z COVID-19. *Natura* 587: 270–274. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9> . _____
- Bruce, EA, Mills, MG, Sampoleo, R., Perchetti, GA, Huang, ML, Despres, HW i in. (2022). Przewidywanie zakaźności: porównanie czterech testów opartych na PCR w celu wykrycia możliwego do hodowli wirusa SARS-CoV-2 w próbkach klinicznych. *EMBO Medycyna molekularna* 14:e15290. <https://doi.org/10.15252/emmm.202115290> .
- Bustin, SA, Benes, V., Garson, JA, Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M. et al. (2009). Wytyczne MIQE: minimum informacji do publikacji ilościowych eksperymentów PCR w czasie rzeczywistym. *Chemia kliniczna* 55:611-22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797> .
- Bustin, S. i Nolan, T. (2017). Gadanie, ale nie spacer: RTqPCR jako paradygmat braku odtwarzalności w badaniach molekularnych. *European Journal of Clinical Investigation* 47:756-774. <https://doi.org/10.1111/eci.12801> .
- Case, JB, Bailey, AL, Kim, AS, Chen, RE & Diamond, MS (2020). Wzrost, wykrywanie, oznaczanie ilościowe i inaktywacja SARS-CoV-2. *Wirusologia* 548: 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.05.015> .
- CDC (2019a). Tymczasowe wytyczne dotyczące testów SARS-CoV-2 w miejscach pracy niezwiązanych z opieką zdrowotną. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/community/organizations/testing-miejsca-pracy-pozza-opieka-zdrowotna.html> .
- CDC (2019b). Tymczasowe wytyczne dotyczące testów antygenowych w kierunku SARS-CoV-2. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#previous> .
- CDC (2021c). Panel diagnostyczny RT-PCR w czasie rzeczywistym z nowatorskim koronawirusem (2019-nCoV) 2019. Tylko do użytku awaryjnego. Instrukcja użycia. <https://www.fda.gov/media/134922/download> .
- Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J. & Peiris, M. (2020). Wirusologia, transmisja i patogeneza SARS-CoV-2. *Brytyjski dziennik medyczny* 371:m3862. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3862> .

- Cevik, M., Tate, M., Lloyd, O., Maraolo, AE, Schafers, J. & Ho, A. (2021). Dynamika obciążenia wirusem SARS-CoV-2, SARS-CoV i MERS-CoV, czas trwania wydalania wirusa i zakaźność: przegląd systematyczny i metaanaliza. *Lancet Microbe* 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 i in. (2020). Ulepszona diagnostyka molekularna COVID-19 za pomocą nowatorskiego, wysoce czulego i swoistego testu PCR z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym COVID-19-RdRp/Hel, zwalidowanego in vitro i na próbkach klinicznych. *Journal of Clinical Microbiology* 58:e00310-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20> . _ _
- Chiny CDC. (2020). Testy laboratoryjne na obecność COVID-19. [<http://wjw.wuhan.gov.cn/front/web/showDetail/2019123108989> teraz ma być dostępny pod adresem https://en.chinacdc.cn/special/COVID19_Response/discoveries_guidelines/202205/t20220516_259215.html w a s ale link do programu PowerPoint nigdzie nie prowadzi; później zmieniono na <http://www.chinacdc.cn/en/COVID19/202003/P020200323390321297894.pdf> , ale żaden z tych linków nie działa w chwili pisania tego tekstu. Dlatego udostępniliśmy plik pdf jako osobny dokument pod adresem <https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v3i1.74>] .
- Chomczyński, P. & Sacchi, N. (1987). Jednoetapowa metoda izolacji RNA metodą ekstrakcji kwaśnym tiocyjanianem guanidyny-fenolchloroformem. *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. & Milgroom, MG (2020). Diagnozowanie infekcji SARS-CoV-2: niebezpieczeństwo nadmiernego polegania na pozytywnych wynikach testów. medRxiv Preprint. <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). Wykrywanie nowego koronawirusa 2019 (2019-nCoV) metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym. *Eurosurveillance* 25:2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045> .
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (2020). Gatunek Koronawirus związany z zespołem ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej: klasyfikacja 2019-nCoV i nazwanie go SARS-CoV-2. *Natura Mikrobiologia* 5: 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z> . _ _ _ _ _ Preprint z 11 lutego 2020: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.07.937862v1> .
- Doshi, P. (2010). Więcej zmieniających się stron internetowych w WHO. Szybka reakcja na: WHO jest oskarżona o „płaczącego wilka” w związku z pandemią świńskiej grypy. *Brytyjski dziennik medyczny* 340:c1904. <https://doi.org/10.1136/bmj.c1904> .
- Uwaga redakcyjna Eurosurveillance. (3 grudnia 2020). <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/15607917.ES.2020.25.48.2012031> . _
- Portal EVAg. https://www.european-virus-archive.com/evag-portal?portal_search=SARS-CoV_20272&advanced_ictv_tax_search . _ _ _ _ _
- Fauci, A. (30 grudnia 2021). <https://www.youtube.com/watch?v=bAICMQ1D5F8> .
- Pola, BN, Knipe, DM, Howley, PM & Griffin, DE (2001). *Fields Virology*, 4 · wydanie, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia.
- Finn, K. & Lucey, B. (2021). Błędna diagnoza SARS-CoV-2: krytyczny przegląd wpływu pobierania próbek i klinicznych metod wykrywania. *Nauki medyczne* 9:36. <https://doi.org/10.3390/medsci9020036> .

- Hedges, K. & Lasco, G. (2021). Populizm medyczny i testy na COVID-19. *Otwarte badania antropologiczne* 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). Korelacja między 3790 ilościowymi próbkami z pozytywną reakcją łańcuchową polimerazy a dodatnimi hodowlami komórkowymi, w tym 1941 izolatów koronawirusa zespołu ostrej niewydolności oddechowej 2. *Kliniczne choroby zakaźne* 72:e921. <http://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491> . _
- Jefferson, T., Spencer, EA, Brassey, J. & Heneghan, C. (2020) Hodowle wirusowe do oceny potencjału zakaźnego COVID-19 – przegląd systematyczny. *Kliniczne choroby zakaźne* 3:ciaa1764. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1764> .
- Jiang, S., Shi, Z., Shu, Y., Song, J., Gao, GF, Tan, W. & Guo, D. (2020). Potrzebna jest odrębna nazwa dla nowego koronawirusa. *The Lancet* 395:949. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30419-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30419-0) .
- Jureidini, J. i McHenry, LB (2022). Iluzja medycyny opartej na dowodach. *Brytyjski dziennik medyczny* 376:o702. <https://doi.org/10.1136/bmj.o702> .
- Kan ji, JN, Zelyas, N., MacDonald, C., Pabbaraju, K., Khan, MN, Prasad, A. et al. (2021). Falszywie negatywny wskaźnik testów PCR na COVID-19: niezgodna analiza testów. *Dziennik wirusologiczny* 18:13. <http://doi.org/10.1186/s12985-021-01489-0> . _ _ _ _ _
- Klement, RJ & Bandyopadhyay, PS (2021). Epistemologia pozytywnego testu SARS-CoV-2. *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). Analiza porównawcza testów amplifikacji kwasu nukleinowego SARS-CoV-2 (NAT) w miejscu opieki nad chorymi, o wysokiej przepustowości i opracowanych w laboratorium. *Journal of Virological Methods* 291:114102. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114102> .
- Koopmans, M. (26 listopada 2020). <https://www.youtube.com/watch?v=flsF7trvq2c> .
- Konrad, R., Eberle, U., Dangel, A., Treis, B., Berger, A., Bengs, K. et al. (2020). Szybkie utworzenie diagnostyki laboratoryjnej nowego koronawirusa SARS-CoV-2 w Bawarii, Niemcy, luty 2020 r. *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). Wykrywanie SARS-CoV-2 za pomocą testu reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkryptazą: analiza wyników fałszywie dodatnich i zalecenia dotyczące środków kontroli jakości. *Praktyka badawcza patologii* 225:153579. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153579> .
- Lee, SH (2021). qPCR to nie PCR, tak jak kaftan bezpieczeństwa nie jest marynarką – prawdę ujawniły fałszywie pozytywne wyniki testu SARS-CoV-2. *Infotekst badawczy* 02:230–278. <https://researchinfotext.com/article-details/qPCR-to-nie-PCR-Tak-jak-a-Kaftan-bezpieczenstwa-to-nie-a-Kurtka-prawda-ujawniona-przez-SARS-CoV-2-Falszywie-pozytywny-test-wyniki> .
- Lee, SH (2022). Oparta na dowodach ocena diagnostyki PCR dla SARS-CoV-2 i wariantów Omicron za pomocą sekwencjonowania Sangera według złotego standardu. *Nauka Polityka zdrowia publicznego i prawo* 4:144-189. <https://www.publichealthpolicyjournal.com/about-7> . _ _
- Liu, DX, Liang, JQ & Fung, TS (2021). Ludzki koronawirus-229E, -OC43, -NL63 i -HKU1 (Coronaviridae). *Encyklopedia Wirusologia*, 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). Charakterystyka genomu i epidemiologia nowego koronawirusa 2019: implikacje dla pochodzenia wirusa i wiązania receptora. *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). Bilans ryzyka w COVID-19 ujawnia ekstremalne koszty fałszywych alarmów. *International Journal of Vaccine Theory Practice and Research* 1:209–222. <https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v1i2.15> .
- Mendoza, EJ, Manguiat, K., Wood, H. & Drebot, M. (2020). Dwa szczegółowe protokoły testu płytki nazębnej do ilościowego oznaczania zakaźnego SARS-CoV-2. *Aktualne protokoły w mikrobiologii* 57: ecpmc105. <https://doi.org/10.1002/cpmc.105> .
- Miao, Z., Tidu, A., Eriani, G. & Martin, F. (2021). Struktura drugorzędowa SARS-CoV-2 5'-UTR. *Biologia RNA* 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). Sekwencja regulująca transkrypcję w nieulegającym translacji regionie 5' SARS-CoV-2 jest niezbędna do replikacji wirusa ze zmienionym wzorcem ewolucyjnym przeciwko ludzkim mikroRNA hamującym. *Komórki* 10:319. <https://doi.org/10.3390/cells10020319.P4> .
- M. Muenchhoff, H. Mairhofer, H. Nitschko, N. Grzimek-Koschewa, D. Hoffmann, A. Berger i in. (2020). Wieloośrodkowe porównanie ilościowych testów opartych na PCR do wykrywania SARS-CoV-2, Niemcy, marzec 2020 r. *Eurosurveillance* 5:pii=2001057. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.24.2001057> .
- Mullis, KB (1990). Amplifikacja celu do analizy DNA metodą reakcji łańcuchowej polimerazy. *Annales de Biologie Clinique* 48:579-582. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2288446/> .
- Muth, D., Corman, VM, Roth, H. i in. (2018). Tłumienie replikacji przez delecję 29 nukleotydów w SARSkoronawirusie nabytym podczas wczesnych etapów transmisji człowiek-człowiek. *Raporty naukowe* 8:15177. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33487-8> .
- Narodowe Centrum Chorób Zakaźnych i Kapituła Lekarzy Chorób Zakaźnych Akademii Medycznej w Singapurze. (23 maja 2020). Dostępne w Internecie: <https://www.ncid.sg/Documents/Period%20of%20Infectivity%20Position%20Statementv2.pdf> .
- New York Times. (22 stycznia 2007). <https://www.nytimes.com/2007/01/22/health/22whoop.html> .
- NIH. Repozytorium zasobów BEI. <https://www.niaid.nih.gov/research/bei-resources-repository> .
- Okba, NMA, Müller, MA, Li, W., Wang, C., Geurtsvan-Kessel, C, H, Corman, VM i in. (2020) Zespół ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej Reakcje przeciwciał swoistych dla koronawirusa 2 u pacjentów z chorobą koronawirusową. *Pojawiające się choroby zakaźne* 26:1478-1488. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841> .
- Ong, SWX, Chia, T. & Young, BE (2022). Warianty SARS-CoV-2 budzące obawy i ucieczka szczepionki, od alfa do omikrona i dalej. *Przegląd ekspercki medycyny układu oddechowego* 16. <https://doi.org/10.1080/17476348.2022.2057299> .
- Osorio, NS & Correia-Neves, M. (2020). Implikacja ewolucji SARS-CoV-2 na czułość testów diagnostycznych RT-qPCR. *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) .
- Nasz świat w danych. <https://ourworldindata.org/explorers/coronavirus-data-explorer> .
- Paul-Ehrlich-Institut. (2020). <https://www.pei.de/EN/newsroom/hp-news/2020/200323-COVID-19-nat-tests.html> .
- Pecoraro, V., Negro, A., Pirotti, T. & Trenti, T. (2021). Oszacuj wskaźniki fałszywie ujemnych wyników RT-PCR dla SARS-CoV-2. Systematyczny przegląd i metaanaliza. *Europejski Dziennik Badań Klinicznych* 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). Wiele testów w panelu RT-PCR SARS-CoV-2 w czasie rzeczywistym może zmniejszyć ryzyko utraty czułości przez nowe warianty genomowe podczas wybuchu COVID-19. *International Journal of Infectious Diseases* 97:225-229. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.027> .

- Perez, DR (2017). *Odwrotna genetyka wirusów RNA: metody i protokoły*. Metody biologii molekularnej 1602. Humana Press. ISBN: 978-1-4939-6964-7.
- Perez, JC, Moret-Chalmin, C. i Montagnier, L. (2023). Pojawienie się nowej choroby Creutzfeldta-Jakoba: 26 przypadków ludzkiej wersji choroby szalonych krów, kilka dni po wstrzyknięciu COVID-19. *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*, 3 (1), 727–770. <https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v3i1.66>
- Poljak, M., Korva, M., Knap-Gašper, N., Komloš, KF, Sagadin, M., Uršič, T., et al. (2020). Kliniczna ocena testu Cobas SARS-CoV-2 i zmiany platformy diagnostycznej w ciągu 48 godzin w środku pandemii COVID-19. *Journal of Clinical Microbiology* 58:e00599-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00599-20> . _ _
- Puhach, O., Meyer, B. & Eckerle, I. (2022). Obciążenie wirusem SARS-CoV-2 i kinetyka wydalania. *Nature Recenzje Mikrobiologia* 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). Identyfikacja nowego koronawirusa powodującego ciężkie zapalenie płuc u ludzi: badanie opisowe. *Chiński dziennik medyczny* 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). Gotowość i reakcja laboratoriów na nowy koronawirus (2019-nCoV) w specjalistycznych laboratoriach w 30 krajach UE/EQG, styczeń 2020 r. *Eurosurveillance* 25:2000082. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000082> .
- agencji Reutersa. (31 grudnia 2019). <https://www.reuters.com/article/us-china-health-zapalenie-płuc-idUSKBN1YZ0GP> .
- Risi, GF, Bloom, ME, Hoe, NP, Arminio, T., Carlson, P., Powers, T., Feldmann, H. i Wilson, D. (2010). Przygotowanie szpitala środowiskowego do zarządzania narażeniami związanymi z pracą na czynniki zakaźne w laboratoriach o poziomie bezpieczeństwa biologicznego 3 i 4. *Pojawiające się choroby zakaźne*, 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). Swoistość i dodatnia wartość predykcyjna testów amplifikacji kwasu nukleinowego SARS-CoV-2 w warunkach niskiej częstości występowania. *Mikrobiologia kliniczna i zakażenia* 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). Działanie testu SARS-CoV-2 RT-PCR jako narzędzia do wykrywania zakażenia SARS-CoV-2 w populacji. *Dziennik infekcji* 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 i in. (2020). Objawy przedmiotowe i podmiotowe w celu ustalenia, czy pacjent zgłaszający się do podstawowej opieki zdrowotnej lub ambulatorium szpitalnego ma chorobę COVID-19. *Przeglądy systematyczne bazy danych Cochrane* 7: CD013665. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013665> .
- Sun, Y., Lin, W., Dong, W. & Xu, J. (2022). Pochodzenie i analiza ewolucyjna odmiany SARS-CoV-2 Omicron. *Dziennik bezpieczeństwa biologicznego i bezpieczeństwa biologicznego* 4:3337. <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2021.12.001> .
- Tan, W., Zhao, X., Ma, X., Wang, W., Niu, P., Xu, W. et al. (2020). Notatki z terenu: nowy genom koronawirusa zidentyfikowany w skupisku przypadków zapalenia płuc — Wuhan, Chiny 2019-2020. *Chiny 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). Porównanie czułości analitycznej i wydajności dla zestawów starterów SARS-CoV-2 przez RT-qPCR oparty na TaqMan i SYBR Green. *Stosowana mikrobiologia i biotechnologia* 106:2207-2218. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11822-4> . _ _ _ _ _
- Tib Molbiol. Instrukcja użycia. Modułowy gen RdRP LightMix® Wuhan CoV. Nr kat. 53-0777-96.

https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_53-0777_96_Wuhan-R-gene_V200204_09155376001%20%282%29.pdf . _ _ _ _

- Nagroda Open Science, Nextstrain: Śledzenie ewolucji patogenów w czasie rzeczywistym. Epidemiologia genomowa nowego koronawirusa. 2020. <https://nextstrain.org/ncov> .
- Verna, R., Alallon, W., Murakami, M., Hayward, CPM, Harrath, AH, Alwasel, SH et al. (2021). Wydajność analityczna metod wykrywania COVID-19 (RT-PCR): obawy naukowe i społeczne. *Życie* 11:660-676. <https://doi.org/10.3390/life11070660> .
- Wernike, K., Keller, M., Conraths, FJ, Mettenleiter, TC, Groschup, MH & Beer, M. (2020). Pułapki w diagnostyce SARS-CoV-2 PCR. *Choroby transgraniczne i pojawiające się* 14:10.1111/tbed.13684. <https://doi.org/10.1111/tbed.13684> .
- KTO. (2003) Konsensus w sprawie epidemiologii zespołu ostrej niewydolności oddechowej (SARS). [Oryginalny link <https://www.who.int/csr/sars/en/WHOconsensus.pdf> został przeniesiony do https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70863/WHO_CDS_CSR_GAR_2003.11_eng.pdf] .
- KTO. (13 stycznia 2020). https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf?sfvrsn=d381fc88_2 .
- KTO. (30 stycznia 2020). <https://www.paho.org/en/news/30-1-2020-kto-deklaruje-zdrowie-publiczne-stan-wyjatkowy-nowy-koronawirus> .
- KTO. (28 lutego 2020). [https://www.who.int/publications/i/item/report-of-the-who-china-joint-mission-in-sprawy-koronawirusa-choroby-2019-\(COVID-19\)](https://www.who.int/publications/i/item/report-of-the-who-china-joint-mission-in-sprawy-koronawirusa-choroby-2019-(COVID-19)) .
- KTO. (2 marca 2020). Testy laboratoryjne na chorobę koronawirusową 2019 (COVID-19) w podejrzanych przypadkach u ludzi. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331329/WHO-COVID-19-laboratory-2020.4-pol.pdf?sequence=1&isAllowed=y> .
- KTO. (11 marca 2020). <https://www.paho.org/en/news/11-3-2020-kto-charakteryzuje-COVID-19-pandemia> .
- KTO. (16 marca 2020). <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-dyrektor-generalny-s-uwagi-wstępnego-w-media-briefing-on-COVID-19-16-marec-2020> .
- KTO. (19 marca 2020). Testy laboratoryjne na chorobę koronawirusową (COVID-19) w podejrzanych przypadkach u ludzi. <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501> .
- KTO. (8 stycznia 2021). Sekwencjonowanie genomowe SARS-CoV-2: przewodnik po wdrożeniu w celu maksymalnego wpływu na zdrowie publiczne. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018440> .
- KTO. (20 stycznia 2021). Informacja dla użytkowników 2020/05: Technologie testowania kwasu nukleinowego (NAT), które wykorzystują reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) do wykrywania SARS-CoV-2. <https://www.who.int/news/item/20-01-2021-kto-informacje-zawiadomienie-dla-ivd-uzytkownikow-2020-05> .
- KTO. (24 stycznia 2021 r.) <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf> . [Oryginalny link <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf> został usunięty, ponieważ w dniu 24 stycznia 2021 r. WHO podsumowała poszczególne protokoły w jednym pliku pdf z oryginalnym protokołem Charité z dnia 17 stycznia 2020 r. znajdującym się na stronach 60-72].

- R. Wölfel, VM Corman, W. Guggemos, M. Seilmaier, S. Zange, MA Müller i in. (2020). Ocena wirusologiczna pacjentów hospitalizowanych z powodu Covid-2019. *Natura* 581: 465–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x> . _ _ _ _ _
- Yang, D. & Leibowitz, JL (2015). Struktura i funkcje końców 3' i 5' genomu koronawirusa. *Badanie wirusów* 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-Virusgenom-Nachweis-SARS-CoV-2.pdf> . _ _ _ _ _
- Zimmermann, F., Urban, M., Krüger, C., Walter, M., Wölfel, R. & Zwirgmaier, K. (2022). Ocena in vitro wpływu mutacji w miejscach wiązania starterów na wykrywanie SARS-CoV-2 metodą RT²-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). Nowy koronawirus od pacjentów z zapaleniem płuc w Chinach. *New England Journal of Medicine* 382:727-733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017> .

Zastrzeżenia prawne

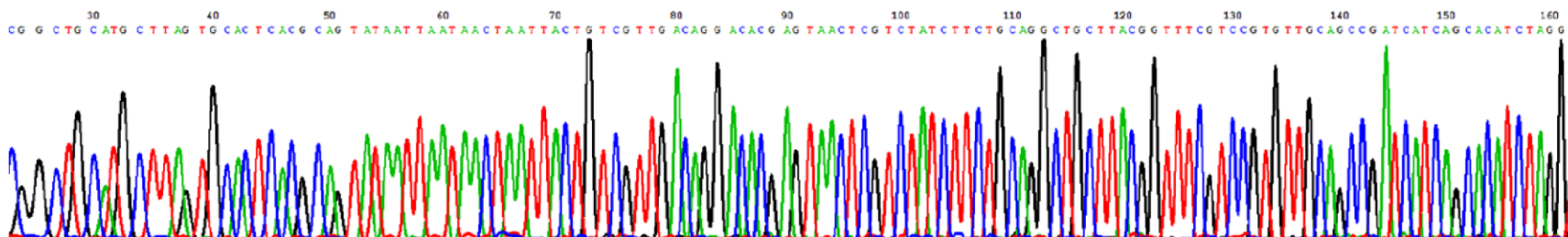
Informacje na stronie internetowej i w **IJVTPR** nie mają na celu diagnozy, zalecanego leczenia, zapobiegania ani leczenia jakiejkolwiek choroby ludzkiej lub procedury medycznej, do której można się w jakikolwiek sposób odnieść. Użytkownicy i czytelnicy, którzy mogą być rodzicami, opiekunami, opiekunami, klinicystami lub krewnymi osób dotkniętych jakimikolwiek stanami chorobowymi, procedurami lub protokołami, o których mowa, muszą kierować się własnym osądem w odniesieniu do konkretnych aplikacji. Współpracujący autorzy, redaktorzy i osoby powiązane w jakimkolwiek charakterze ze stroną internetową i/lub czasopismem zrzekają się wszelkiej odpowiedzialności wobec jakiejkolwiek osoby lub podmiotu za jakiejkolwiek szkody, straty finansowe, obrażenia fizyczne lub inne kary, które mogą wynikać z jakiegokolwiek wykorzystania lub aplikacji w jakimkolwiek kontekście informacji, wniosków, wyników badań, opinii, błędów lub jakichkolwiek stwierdzeń znalezionych na stronie internetowej lub w **IJVTPR** .

Prezentowany materiał jest swobodnie oferowany wszystkim użytkownikom, którzy mogą być zainteresowani jego zbadaniem, ale to, w jaki sposób mogą zastosować jakąkolwiek jego część, jest wyłączną odpowiedzialnością widza/użytkownika. Jeśli materiał jest cytowany lub przedrukowywany, użytkownicy proszeni są o podanie źródła/autora oraz o przestrzeganie niekomercyjnych wymagań licencji Creative Commons 4.0 NC ND [dotyczących niekomercji i zakazu tworzenia pochodnych](#) lub do jakiejkolwiek innej licencji, która ma pierwszeństwo przed nią.

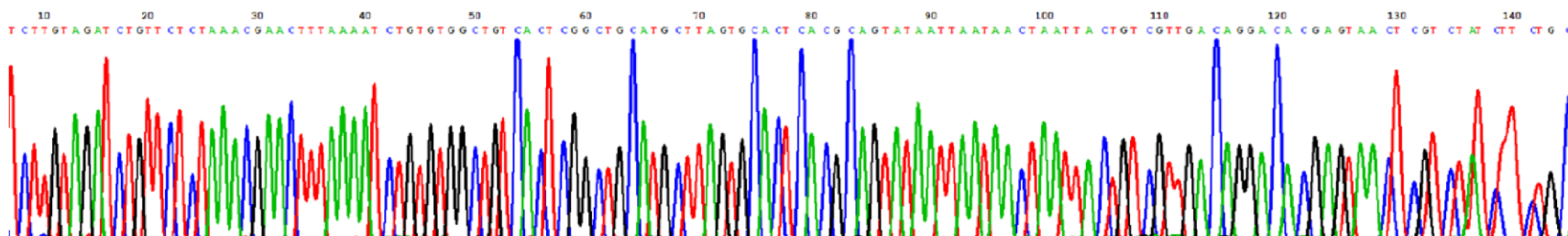
Rysunek uzupełniający 1A. Chromatogramy z sekwencjonowania Sanger w przód i w tył sekwencji 5'-UTR pacjenta indeksowego BD103, zdiagnozowanego z ładunkiem 5×10^7 kopii wirusa/ml eluatu próbki (wymaz z nosogardzieli).

A

BD103 5' UTR forward:



BD103 5' UTR reverse:



Rysunek uzupełniający 1B. Dopasowanie BLAST sekwencji 5'-UTR BD103 do sekwencji 5'-UTR najbliższych sąsiadów. Zwróć uwagę na 100% homologię z SARS-CoV-2 5'-UTR i uderzającą heterologię w porównaniu odpowiednio z Bat-coronavirus i Bat-SARS-coronavirus. Zapytanie: Autentyczna sekwencja uzyskana od pacjenta z indeksem BD103; Temat: Sekwencja referencyjna konkretnego koronawirusa zdeponowana w bibliotece NCBI ref seq (<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	CGATCTCTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTGGCTGTCACTCGGC	60		
Sbjct 43	CGATCTCTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTGGCTGTCACTCGGC	102		
Query 61	TGCATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAATCTACTGCTGTGACAGGACA	120		
Sbjct 103	TGCATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAATCTACTGCTGTGACAGGACA	162		
Query 121	CGAGTAACTCGTCTATCTTCTGCAGGCTGCTTACGGTTTCGTCCGTGTTCAGCCGATCA	180		
Sbjct 163	CGAGTAACTCGTCTATCTTCTGCAGGCTGCTTACGGTTTCGTCCGTGTTCAGCCGATCA	222		
Query 181	TCAGCACATCTAGGTTTCGTCCGGGTG	207		
Sbjct 223	TCAGCACATCTAGGTTTCGTCCGGGTG	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	CGATCTCTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTGGCTGTCACTCGGC	60		
Sbjct 41	CGATCTCTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTAGCTGTGCTCGCTCGGC	100		
Query 61	TGCATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAA--TTACTGCTGTGACAGGA	118		
Sbjct 101	TGCATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAAATATTAA--TAACTTACTGCTGCTGACTGGA	159		
Query 119	CACGAGTAACTCGTCTATCTTCTGCAGGCTGCTTACGGTTTCGTCCGTGTTCAGCCGAT	178		
Sbjct 160	TACGAGTAACTCGTCTTCTTCTGCAGACTGCTTACGGTTTCGTCCGTGTTCAGCTCGAT	219		
Query 179	CATCAGCACATCTAGGTTTCGTCCGGGTG	207		
Sbjct 220	CATCAGCATACCTAGGTTTCGTCCGGGTG	248		

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

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

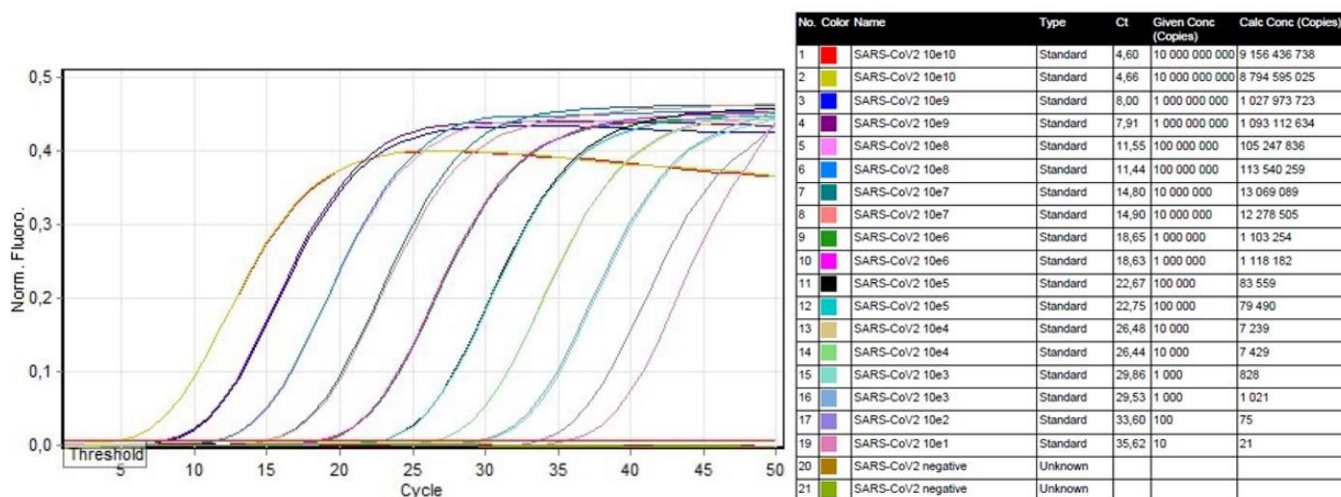
Range 1: 40 to 246 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
281 bits(152)	7e-72	190/208(91%)	3/208(1%)	Plus/Plus
Query 2	GATCTCTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTGGCTGTCACTCGGCT	61		
Sbjct 40	GATCTCTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTGGCTGTGCTCGCTCGGC	99		
Query 62	GCATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAA--TTACTGCTGTGACAGGAC	119		
Sbjct 100	GCATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAAATATTAA--TAACTTACTGCTGTGACAGAA	158		
Query 120	ACGAGTAACTCGTCTATCTTCTGCAGGCTGCTTACGGTTTCGTCCGTGTTCAGCCGATC	179		
Sbjct 159	ACGAGTAACTCGTCCCTTCTTCTGCAGACTGCTTACGGTTTCGTCCGTGTTCAGCTCGATC	218		
Query 180	ATCAGCACATCTAGGTTTCGTCCGGGTG	207		
Sbjct 219	ATCAGCATACCTAGGTTTCGTCCGGGTG	246		

Rysunek uzupełniająca 2A. Raport ilościowy SARS-CoV-2.

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

Rysunek uzupełniająca 2B. Przedstawiono krzywą standardową i rozcieńczenie logarytmiczne syntetycznej matrycy SARS-CoV-2 od 10e10 kopii/PCR do 10e1 kopii/PCR. Kolarstwo ilościowe. Zielony.



Rysunek uzupełniająca 2C. Krzywa standardowa.

