RT-PCR Test Targeting the Conserved 5'-UTR of SARS-CoV-2 Overcomes Shortcomings of the First WHO-Recommended RT-PCR Test

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] Professor, University Hospital Würzburg, Department of Obstetrics and Gynecology, Research Laboratory, Germany; u.kaemmerer@mail.uni-wuerzburg.de; https://orcid.org/0000-0002-2311-6984

[2] Tilia Laboratories, Laboratory for Molecular Diagnostics, Pchery, Czech Republic; sona.pekova@tilialaboratories.cz; https://orcid.org/0000-0003-0106-4543

[3] Leopoldina Hospital Schweinfurt, Department of Radiation Oncology, Germany; rainer_klement@gmx.de; https://orcid.org/0000- 0003-1401-4270

[4] Erasmus University Medical Center Rotterdam, Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Netherlands; Current address: CCassured (CRISPR Commons assured), Breda, Netherlands; rlouwen@hotmail.com, https://orcid.org/0000-0003-2537- 4941

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

[6] Corresponding Author: Professor Emeritus, Justus Liebig University Giessen, Germany; Klaus.Steger@chiru.med.uni-giessen.de; https://orcid.org/0000-0002-2104-0840

Zusammenfassung

Zum ersten Mal in der Geschichte der Medizin wurde ein Labortest (RT-PCR) als einziges Kriterium zur Diagnose einer Krankheit (COVID-19) und zur Definition der Infektiosität eines Virus (SARS-CoV-2) verwendet, ohne dass klinische Symptome und der Nachweis replikationsfähiger Viren die Durchführung bevölkerungsweiter, nicht getesteter Interventionen rechtfertigen. Ziel ist es, (1) ein robustes quantitatives RT-PCR (RT-qPCR)-Protokoll zu evaluieren, das die größten Bedenken der wissenschaftlichen Gemeinschaft hinsichtlich des ersten von der WHO empfohlenen RT-qPCR-Protokolls für SARS-CoV-2-Sequenzen ausräumt, (2) einzelne SARS-CoV-2-Stämme, die von Herbst 2020 bis Frühjahr 2021 in der Tschechischen Republik zirkulieren, mit Hilfe der Sequenzierung der nächsten Generation zu charakterisieren und (3) den wissenschaftlichen Dialog wieder aufzunehmen und zur Vernunft und evidenzbasierten Medizin zurückzukehren. Wir stellen einen RT-qPCR-Test vor, mit dem alle bisher bekannten SARS-CoV-2-Varianten nachgewiesen werden können, ohne dass es zu falsch-positiven Ergebnissen kommt. Anhand des genomischen Mutationsprofils zeigen wir, dass die drei einzelnen Wellen (Herbst 2020 bis Frühjahr 2021) in der Tschechischen Republik zwar aufeinander folgten, aber in keinem direkten genomischen Zusammenhang zueinander standen. Dies wurde bei der Omicron-Variante deutlich, die keine direkte evolutionäre Verbindung zu einer der früheren SARS-CoV-2-Varianten erkennen ließ. Darüber hinaus belegen wir, dass die Vernachlässigung von Grundsätzen guter wissenschaftlicher Praxis nicht nur zur Veröffentlichung des von der WHO empfohlenen Charité-RT-qPCR-Protokolls führte, sondern auch zu gesundheitlichen Problemen. Unnötige Quarantäne gesunder Personen sowie Abriegelungen und schreckliche Kollateralschäden für Gesellschaften und Volkswirtschaften weltweit aufgrund einer hohen Zahl falsch-positiver "PCR-Fälle". Andererseits wurde infektiösen symptomatischen Personen durch falsch-negative Testergebnisse ein falsches Gefühl der Sicherheit vermittelt, was zu COVID-19-Clustern führen könnte. Sowohl unsere Ergebnisse als auch Daten aus der Literatur bestätigen, dass eine Validierung jedes PCR-basierten diagnostischen Tests durch Sequenzierung regelmäßig erforderlich ist. Um künftiges Fehlverhalten zu verhindern, braucht die Wissenschaft einen Realitätscheck und muss den wissenschaftlichen Dialog wieder aufnehmen und sich von politischem Einfluss und Dogmen befreien.

EINLEITUNG

Seit März 2020 hält COVID-19 (Coronavirus-Krankheit-2019) die Welt in Atem, vor allem wegen der Kollateralschäden mit katastrophalen Auswirkungen auf Gesundheit, Gesellschaft und Wirtschaft. Von Beginn der mutmaßlichen Pandemie an bestand zum ersten Mal in der Geschichte der Medizin ein globaler politischer Konsens (Hedges & Lasco, 2021), dass der Krankheitsstatus, die Infektion und die Infektiosität allein durch einen Labortest mit reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) diagnostiziert werden können, ohne eine unabhängige klinische Bewertung der Symptome von Personen, bei denen eine COVID-19-Erkrankung diagnostiziert wurde (China CDC, 2020; Paul-Ehrlich-Institut, 2020). Aufgrund der großen Bedeutung der RT-PCR-Ergebnisse könnte man annehmen, dass die höchsten Qualitätsstandards für Genauigkeit und Zuverlässigkeit angewandt werden. In diesem Beitrag stellen wir jedoch das erste von der WHO (Weltgesundheitsorganisation) empfohlene und daher am häufigsten angewandte RT-PCR-Testprotokoll in Frage, das zu Beginn der Pandemie verwendet wurde und im Folgenden als Charité-Protokoll bezeichnet wird (Corman et al., 2020; WHO, 24. Januar 2021). Darüber hinaus stellen wir einen alternativen und robusten RT-PCR-Test vor, der auf die 5'-UTR (untranslatierte Region) von SARS-CoV-2 (Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom - CoronaVirus-2) abzielt und die Unzulänglichkeiten des Charité-Protokolls überwindet. Um den Fokus zu wahren, werden in dieser Studie keine anderen Tests als RT-PCR berücksichtigt. Leser, die an anderen Antigen-Schnelltests als RT-PCR-Assays interessiert sind, werden auf eine aktuelle Übersicht verwiesen (Puhach et al., 2022). Im Folgenden werden die Frühphase von COVID-19 und die WHO-Teststrategie zur Bekämpfung der Pandemie beschrieben.

Zeitleiste der sogenannten COVID-19-Pandemie

Am 30. Dezember 2019 meldete ein Krankenhaus in der chinesischen Stadt Wuhan, dass sieben seiner Patienten an einer schweren Lungenentzündung unbekannter Herkunft litten (Reuters, 2019). Die örtlichen Gesundheitsbehörden informierten sofort die WHO und hatten den Erreger bereits mittels Ganzgenomsequenzierung und RT-PCR als Coronavirus identifiziert (Ren et al., 2020; Zhu et al., 2020; Lu et al., 2020). Am 7. Januar 2020 wurde das identifizierte Virus als 2019-nCoV (2019-novel CoronaVirus) bezeichnet und am 1. Februar 2020 in SARS-CoV-2 umbenannt (Coronaviridae Study Group, 2020), trotz des Protestes der chinesischen Wissenschaftler, die den Namen HCoV-19 bevorzugten (Jiang et al., 2020). In der Folge meldete das chinesische Zentrum für Seuchenkontrolle (CCDC), dass es einen RT-PCR-Test zum Nachweis des neuen Virus in Patientenproben entwickelt habe (China CDC, 2020). Die Sequenzierungsergebnisse ordneten das identifizierte Virus den beta-Coronaviridae der Untergattung Sarbecoviren zu (Ren et al., 2020). Am 9. Januar 2020 teilten die chinesischen Wissenschaftler ihre Ergebnisse der WHO mit (Tan et al., 2020) und luden die Virussequenz in voller Länge in die Datenbank der Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) mit Sitz in den USA (NC_045512.1).
Die WHO hat am 13. Januar 2020 das erste diagnostische RT-PCR-Testprotokoll für eine RT-qPCR online veröffentlicht (WHO, 13. Januar 2020). Bemerkenswerterweise basierten die veröffentlichten RT-PCR-Testrichtlinien nicht auf den von den chinesischen Wissenschaftlern erstellten und gemeinsam genutzten Protokollen (China CDC, 2020), sondern waren ein Artefaktprodukt mehrerer kooperierender Laboratorien in Europa (Reusken et al., 2020). Die Autoren verwendeten die vom CCDC in der GISAID-Datenbank hinterlegten Wuhan-Sequenzen für die Entwicklung von Primern und Sonden, ohne dass positive Patientenproben vorlagen und ohne dass das Virus selbst zur Validierung des Tests zur Verfügung stand (Corman et al., 2020). Das europäische Protokoll, das wir als "Charité-Protokoll" bezeichnen, empfiehlt drei Ziele (im Nukleokapsid (N)-Gen, dem Hüllgen (E)-Gen und entsprechend der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) aus dem ersten und zweiten Open Reading Frames (ORF1a und ORF1b) Gen. Letztere sollten die gesamte SARS-Beta-Coronavirus-Untergruppe (Sarbeco) mit nur einer RdRp-Sonde als diskriminierendem Oligonukleotid nachweisen. Dies ermöglichte die Verwendung des SARS-CoV-Stamms Frankfurt-1 als Positivkontrolle, jedoch wurde der Nachweis der Genauigkeit der amplifizierten Ziele durch geeignete Kontrollen und Sequenzierung nicht erbracht.

Am 17. Januar 2020 wurde auf der WHO-Webseite eine Aktualisierung veröffentlicht, in der das frühere Protokoll korrigiert wurde, indem das spezifischste Primerpaar für das N-Gen-Target wegen "mangelnder Empfindlichkeit" weggelassen wurde (WHO, 24. Januar 2021). Sechs Tage später, am 23. Januar 2020, wurde dieses RT-qPCR-Protokoll - das schnell zum Standard für den Nachweis von SARS-CoV-2-RNA in Europa und vielen anderen Regionen der Welt wurde - als Forschungsmanuskript von Eurosurveillance nach einem angeblich vollständigen Peer-Review-Verfahren veröffentlicht, das nur einen Tag dauerte (Corman et al., 2020). Primer und Sonden aus dem Charité-Protokoll wurden fast sofort kommerziell verfügbar gemacht, wie ein Labor in Slowenien berichtete (Poljak et al., 2020):
"Nach umfassender Evaluierung hat unser Labor am 17. Januar 2020 die LightMix-basierte SARS-CoV-2-Testung eingeführt. Die routinemäßige Untersuchung auf SARS-CoV-2 begann am 27. Januar 2020, und die erste positive Probe wurde am 4. März 2020 nach der Untersuchung von 353 Routineproben entdeckt. Bis zum 8. April 2020 wurden in Slowenien insgesamt 30.669 SARS-CoV-2-Tests durchgeführt (15.330 Tests pro Million Einwohner), 1.103 laborbestätigte Fälle von COVID-19 festgestellt und 40 Todesfälle gemeldet."
Zu diesem Zeitpunkt gab es keinen einzigen COVID-19-Fall in Europa und die "Entscheidung für einen Wechsel des diagnostischen Ansatzes" wurde fast eine Woche vor der Veröffentlichung des Charité-Protokolls durch Eurosurveillance getroffen.
Doch nur drei Tage nach der "Umstellung der Diagnose", am 30. Januar 2020, erklärte die WHO-Notfallkommission (WHO, 30. Januar 2020) einen internationalen Gesundheitsnotfall (PHEIC), obwohl es nur 1.651 positiv getestete Fälle in China gab, darunter 38 Todesfälle, und 98 Fälle in 18 Ländern außerhalb Chinas ohne gemeldete Todesfälle (Unsere Welt in Daten). Am 11. März 2020 war die Zahl der positiven SARS-CoV-2-Testfälle weltweit auf 4.670 gestiegen, darunter 280 Todesfälle, die dieser neuen virusbedingten Krankheit COVID-19 zugeschrieben wurden (Unsere Welt in Daten), und der Generaldirektor der WHO, Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus, erklärte COVID-19 zu einer "Pandemie" (WHO, 11. März 2020) - einer weltweiten Krise, von der weniger als eine Person pro Million betroffen ist (etwa 8 Milliarden geteilt durch 4.670). Dies war möglich, weil die WHO-Definition einer "Pandemie" im Jahr 2009 umformuliert wurde, so dass sie nicht mehr eine "enorme Anzahl von Todesfällen und Erkrankungen" voraussetzt (Doshi, 2010).

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

Am 16. März 2020 verkündete Ghebreyesus die globale Strategie für den Umgang mit COVID-19: "Wir haben eine einfache Botschaft an alle Länder: Testen, testen, testen. Testen Sie jeden Verdachtsfall. Wenn sie positiv getestet werden, isolieren Sie sie und finden Sie heraus, mit wem sie bis zu zwei Tage vor dem Auftreten der Symptome in engem Kontakt standen, und testen Sie auch diese Personen (WHO, 16. März 2020)."
Parallel dazu führte die WHO die COVID-19-Dashboard-Funktion ein, die eine Echtzeitverfolgung positiver RT-PCR-Testergebnisse in absoluten Zahlen ermöglicht, unabhängig von der Anzahl der durchgeführten Tests und ohne weitere Angaben zum verwendeten Testsystem. Dies sollte die Planung, Durchführung und Bereitstellung von Ressourcen
Auf der Grundlage der weltweiten RT-PCR-Tests wurden angeblich 13.982 positive Fälle identifiziert, darunter 871 COVID-19-bedingte Todesfälle (Unsere Welt in Daten). Die von der WHO empfohlene Strategie, so viele Menschen wie möglich unabhängig von klinischen Symptomen mit diesem molekularen Test zu testen, erscheint rätselhaft, da die RT-PCR-Technologie an sich weder über eine ausreichende Sensitivität und Spezifität verfügt, um einen intakten infektiösen Erreger wie ein Virus nachzuweisen und somit eine ansteckende Person zu identifizieren, noch kann sie sinnvoll zur Diagnose einer Krankheit eingesetzt werden. Vielmehr lässt sich damit jegliches genetische Material von Interesse unabhängig von der "Lebensfähigkeit" der Quelle vervielfältigen (Kasten 1). Auf Seite 9 eines Konsenspapiers der WHO (2003) über die Epidemiologie des Schweren Akuten Respiratorischen Syndroms (SARS), einem sehr verwandten Virus, heißt es weiter "Es ist eine Datenverknüpfung erforderlich, um festzustellen, ob es eine

direkte Beziehung zwischen dem klinischen Schweregrad und der Viruslast und -ausscheidung gibt."
Dies bedeutet, dass eine RT-PCR-positiv getestete Person nicht automatisch als symptomatisch oder infektiös betrachtet werden kann, ohne dass sich klinische Symptome bestätigen. Daher ist es unverständlich, dass die WHO an der RT-PCR-Teststrategie festhält, selbst
Unverständlich ist daher, dass die WHO an der RT-PCR-Teststrategie festhielt, nachdem eine systematische Überprüfung ergeben hatte, dass Patientencharakteristika (d. h. die Schwere der Symptome) und Testparameter (d. h. die Zyklusschwelle) die Zuverlässigkeit der RT-PCR-Testergebnisse radikal einschränken (Jefferson et al., 2020). Darüber hinaus hätten sich die WHO-Forscher über die Tücken der PCR-Tests im Klaren sein müssen, denn im Jahr 2007 führten falsch-positive Ergebnisse zu einer Pseudo-Pandemie des Keuchhustens im Dartmouth-Hitchcock Medical Center (New York Times, 2007). Nichtsdestotrotz wurden Massentests mittels RT-PCR zur bevorzugten Strategie für die Überwachung von COVID-19, und von diesem Zeitpunkt an wurde die Zahl der positiven Tests zur Rechtfertigung massiver Einschränkungen der Menschenrechte und landesweiter Abriegelungen verwendet.

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

Von größter Bedeutung und unabhängig von der Gestaltung des Protokolls ist, dass die RT-PCR lediglich die durch die verwendeten Primer selektierte(n) revers transkribierte(n) und amplifizierte(n) RNA-Target(s) nachweist und daher keineswegs beweisen kann, dass in einer bestimmten Probe tatsächlich ein replikationsfähiges, infektiöses Virus vorhanden ist. Aufgrund der hohen Sensitivität der RT-PCR kann auch in Abwesenheit infektiöser Viren restliche, nicht infektiöse virale RNA nachgewiesen werden. Wenn externe Standards mit definierten viralen RNA-Kopienzahlen verwendet werden, können die RNA-Viruslasten mit den durch RT-qPCR erhaltenen Ct-Werten korreliert werden. Allerdings lässt weder eine bestimmte RNA-Kopienzahl noch ein bestimmter Ct-Wert als Schwellenwert eine sichere Aussage darüber zu, ob die Viruslast steigt oder sinkt.
Bereits am 23. Mai 2020 wurden die vorstehenden grundlegenden Informationen zur RT-PCR in einer Stellungnahme des Nationalen Zentrums für Infektionskrankheiten (2020) veröffentlicht. In der Folge wurden sie in einem Podcast vom 26. November 2020 von Marion Koopmans (2020), Mitautorin des Charité-Protokolls (Corman et al., 2020), in einem Video-Statement vom 30. Dezember 2021 von Anthony Fauci (2021), dem medizinischen Chefberater von Präsident Biden in den USA, und ganz aktuell in einem umfassenden Review mit der korrespondierenden Autorin Isabella Eckerle bestätigt, worauf Puhach et al. (2022) hinweisen. Letzteres enthält eine ausführliche Darstellung, die zeigt, warum die Infektiosität durch die Bewertung der viralen Replikation in der Zellkultur bestimmt werden muss, die den Goldstandard für replikationskompetente, infektiöse Viren darstellt. Das letztgenannte Papier kommt zu dem Schluss, dass "bis heute keine diagnostischen Tests existieren, die das Vorhandensein infektiöser Viren zuverlässig bestimmen".
Letztendlich kann die RT-PCR zur Bestimmung der RNA-Menge nur stellvertretend verwendet werden, da die Zellkultur mit SARS-CoV-2 Laborbedingungen der Biosicherheitsstufe 3 erfordert (Risi et al., 2010). Außerdem muss jede Diagnose von einem oder mehreren Klinikern bestätigt werden, die die Übereinstimmung eines Labortests mit den klinischen Symptomen der RT-PCR-getesteten Person nachweisen müssen, wie dies auch bei jedem anderen Labortest der Fall ist.
Es ist zu beachten, dass jeder Labortest, selbst wenn er sowohl eine hohe Spezifität als auch eine hohe Sensitivität aufweist, zu falsch-positiven Ergebnissen führt, die bei einer niedrigen Prävalenz, d. h. bei Massentests an asymptomatischen Personen, sogar die Zahl der richtig-positiven Ergebnisse übersteigen können (Skittrall et al., 2020; Lyons-Weiler, 2021). Positiv getestete, asymptomatische Personen stellen eine niedrige anfängliche Zielzahl dar, die mit hohen Ct-Werten verbunden ist. Selbst wenn das Testergebnis korrekt ist, sind diese Personen nicht infektiös, sondern stellen klinische Falsch-Positive dar, die entweder aus genesenen Personen bestehen, die noch

Virusreste aufweisen, oder aus immunen Personen, die aufgrund einer niedrigen Viruslast nicht ansteckend sind (Cevik et al., 2020; Lyons-Weiler, 2021). Basile et al. (2020) berichteten über eine falsch-positive Rate bei RT-PCR-Tests von 11 % (13/122), zu einem Zeitpunkt, als die COVID-19-Prävalenz bei 2 % lag. Nur bei zwei der 13 falsch-positiven Tests lag eine SARS-CoV-2-Serologie vor, beide waren negativ für SARS-CoV-2, während einer positiv für ein Rhinovirus war. Das Problem der Kontamination wurde bereits sehr früh von Wernicke et al. (2020) angesprochen, die Ct-Werte von bis zu 17 für Negativkontrollen meldeten, was auf ein hohes Maß an Kontamination in Reagenzien von Oligonukleotidlieferanten hinweist. Daher muss jede Charge von PCR-Reagenzien vor ihrer Verwendung in der Routinediagnostik vorab getestet werden.

Der einzige Ansatz, mit dem sich falsch-positive Ergebnisse auf Null reduzieren lassen, erfordert die Durchführung einer Sanger-Sequenzierung (Lee, 2021). Die Verwendung von verschachtelter RT-PCR mit anschließender Sanger-Sequenzierung zur erneuten Prüfung von 50 Proben, die als RT-qPCR-positive Referenz verkauft wurden, bestätigte 21 (42 %) falsch-positive Ergebnisse (Lee, 2022).

Da eine Vielzahl von Wissenschaftlern, Ärzten und medizinischen Beratern die Unzulänglichkeiten der ersten von der WHO empfohlenen RT-PCR beanstandet haben, haben wir das wegweisende Protokoll für den Nachweis von SARS-CoV-2 weiter in Frage gestellt. Um die RT-PCR-Testung von SARS-CoV-2-RNA als Stellvertreter für die Viruslast zu verbessern, die Probleme des Charité-Protokolls zu umgehen und einen zuverlässigen und überprüfbaren PCR-Ansatz zu implementieren, wurde ein alternatives Testsystem eingeführt. Im Folgenden bezeichnen wir es als "5'-UTR RT-qPCR-Protokoll". Auf der Grundlage der interindividuellen genomischen Heterogenität der SARS-CoV-2-Stämme alpha, beta, gamma und delta (Ong et al., 2022) identifizierten wir eine einzigartige Konsensusregion in der 5'-UTR als spezifisches und empfindliches Ziel für den Nachweis von SARS-CoV-2-verwandter RNA mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) in Echtzeit. Anschließend haben wir die Genomsequenzen einzelner SARS-CoV-2-Stämme charakterisiert, die von Herbst 2020 bis Frühjahr 2021 in der Tschechischen Republik zirkulierten. Mit dieser Erfahrung gehen wir auf die kritischen Kommentare ein, die in der wissenschaftlichen Gemeinschaft nach unserem Antrag auf Rücknahme des Charité-Protokolls (Borger et al., 2020) geäußert wurden, und wir erörtern umfassend unsere Hauptbedenken in Bezug auf das Charité-Protokoll und die Art und Weise, wie die Politisierung der Wissenschaft die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis mit schädlichen und tödlichen Auswirkungen auf die Gesellschaft weltweit auslöscht.

Methoden

Primerdesign für die 5'-UTR-Region von SARS-CoV-2 für RT-qPCR

Anhand eines Alignments der im Februar 2020 verfügbaren genomischen Sequenzen von Fledermaus/SARS/nCOV-19-Coronaviren wählten wir eine einzigartige Region innerhalb der konservierten und spezifischen 5'-UTR von SARS-CoV-2 aus, die als spezifisches und empfindliches Ziel für den Echtzeit-RT-qPCR-Nachweis der viralen RNA dienen sollte und zu einem Amplikon von 207 Basenpaaren (bp) führte. Wir haben den Assay intern gemäß den europäischen ISO 13485-Richtlinien für die Herstellung von In-vitro-Diagnostika validiert. Wie im Folgenden beschrieben, wurden 50 positive Fälle, die in authentischen symptomatischen Patientenproben (Nasopharyngealabstriche) identifiziert wurden, durch direkte Sanger-Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte bestätigt. Der Assay erfüllte alle Anforderungen an die Spezifität (keine falsch-spezifischen Produkte) und auch an die Sensitivität (sieben Kopien der Targets in einer PCR-Reaktion). Darüber hinaus wurde unser Assay einer externen Validierung durch die britische NEQAS-Behörde für Qualitätsbewertung unterzogen und anschließend in der Routinediagnostik von 31 028 bisher getesteten authentischen Proben eingesetzt. Die Merkmale der Primer und Sonden sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Das PCR-Profil umfasste einen ersten Denaturierungsschritt bei 94 °C für 5 Minuten, gefolgt von 45 Zyklen bei
94 °C für 30 Sekunden, bei 58 °C für 30 Sekunden (Akquisition bei FAM) und bei 72 °C für 30 Sekunden. Die Identität der erzeugten Amplikons wurde durch Sanger-Sequenzierung bestätigt (siehe ergänzende Abbildung 1). In jeder analysierten Probe zeigte der Sanger-Chromatograph eine authentische SARS-CoV-2-Sequenz, was die erforderliche Spezifität des 5'-UTR-RT-qPCR-Assays bestätigte. Die Kopienzahl des SARS-CoV-2-Genoms in 1 ml des ursprünglichen Probeneluats wurde anhand einer Kalibrierungskurve berechnet, die aus 4-log-Verdünnungen einer synthetischen genomischen Sequenz, die die 5'-UTR-Sequenz und ihre unmittelbare flankierende Region abdeckt (kundenspezifisch synthetisiert von Eurofins Genomics, Deutschland), unter Verwendung der folgenden Kalibrierungskurvengleichung erstellt wurde: 10^(-0,279 * Ct+11,244). Die ergänzende Abbildung 2 zeigt die logarithmische Verdünnung der synthetischen SARS-CoV-2-Vorlage von 10e10 Kopien pro PCR-Reaktion bis hinunter zu 10e1 Kopien pro PCR-Reaktion. Die Negativkontrolle ist negativ, d. h. es waren keine unspezifischen Amplikons vorhanden, die durch unerwünschte inter- und intramolekulare Wechselwirkungen entstanden. Anschließend wurden die für die authentischen Patientenproben gemessenen Ct-Werte verwendet, um die Anzahl der Kopien des SARS-CoV-2-Genoms in 1 ml des ursprünglichen Probeneluats zu berechnen. Da es sich bei der verwendeten Quantifizierungsmethode um die so genannte ABSOLUTE-Methode handelte (ein typischer Aufbau in der molekularen Mikrobiologie), wurde die Kopienzahl von SARS-CoV-2 in jeder Patientenprobe mit Hilfe der Kalibrierkurvengleichung bestimmt, die aus seriell verdünntem synthetischem SARS-CoV-2-Genom erstellt wurde und die nach dem Stand der Technik die genaueste Methode zur Erstellung einer Kalibrierkurve in der molekularen Mikrobiologie darstellt.

Tabelle 1
Diagnostisches Primer-Set und TaqMan-Hybridisierungssonde für die routinemäßige SARS-CoV-2-Echtzeit-qPCR (5'-UTR) sowie Primer für die Sanger-Genotypisierung im SARS-CoV-2-Gen, wie sie bei Tilia Laboratories von März 2020 bis April 2022 durchgeführt wurden. Angesichts der intrinsischen genomischen Stabilität der 5'-UTR-Region von Coronaviren musste der Test trotz der verschiedenen SARS-CoV-2-Stämme, die seit März 2020 aufgetaucht sind, nicht neu konzipiert werden. Die Werte für Tm und GC-Gehalt der Oligonukleotide wurden vom Hersteller (Eurofins Genomics, Deutschland) berechnet. Tm: Schmelztemperatur des Primers; GC: Anteil der Guanine und Cytosine des Primers.

Oligo name	**Sequence 5'-3'**	**Tm [°C]**	**GC [%]**
5'-UTRforward	CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTC	58.9	43
5'-UTRreverse	CACCCGGACGAAACCTAGATGTGC	66.1	58
5'-UTR TaqMan probe	FAM–TACTGTCGTTGACAGGACACGAGTAACTCGTCT-BHQ1	70.6	48
SARS-CoV-2 forward	CACACGTGGTGTTTATTACCCTGAC	58.0	36
SARS-CoV-2 delta-reverse	FAM-TCAAAAGTGCAATTATTCGCACTAG	58.1	36
SARS-CoV-2 UK-forward	GTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGAC	59.7	40
SARS-CoV-2 UK-reverse	CCACAAACAGTTGCTGGTGCATGTAG	64.8	50

Molekulare Rückverfolgung der zirkulierenden SARS-CoV-2-Stämme in der Tschechischen Republik

Wir haben 260 authentische SARS-CoV-2-Proben von symptomatischen Personen (ohne klinische Daten), die zwischen September 2020 und April 2021 gesammelt wurden, mittels Sanger-Sequenzierung und Fragmentanalyse des SARS-CoV-2-S-Protein-Gens genomisch charakterisiert, wodurch wir drei verschiedene genomische Cluster von SARS-CoV-2 unterscheiden konnten, die direkt den einzelnen "Wellen" entsprechen. Die für die Genotypisierung der einzelnen SARS-CoV-2-Stämme verwendeten Primer, die für alle zirkulierenden Stämme gelten, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

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

Sequenzierung des gesamten Genoms von SARS-CoV-2-Isolaten mittels NGS

Die gesamte RNA wurde aus authentischen Patientenproben mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Deutschland) gemäß den Empfehlungen des Herstellers isoliert. Die Gesamt-RNA wurde mit dem Verso cDNA-Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) revers transkribiert und die Tailing-Produkte, die das gesamte SARS-CoV-2-Genom abdecken, wurden mit den ARTIC v3-Primern (IDT, USA) PCR-amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Pools (Fragmente von ca. 400 bp) wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Deutschland) gelgereinigt und gemäß den Anweisungen des Herstellers mit dem NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent Kit (NEB, USA) zu NGS-Bibliotheken zusammengestellt. Die Bibliotheken wurden mit dem Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) quantifiziert, und ein 10 pM großer Bibliotheks-Pool diente als Vorlage für die Emulsions
PCR (emPCR) mit dem Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. Nach der Bead-Anreicherung (OT2-Instrument, Thermo Fisher Scientific, USA) wurde ein v316 NGS-Sequenzierungschip geladen, um eine ausreichende Basenabdeckung zu erreichen. Die NGS-Sequenzierung wurde mit der Ion Torrent PGM-Plattform (Thermo Fisher Scientific, USA) unter Verwendung der Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit Chemie (Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt. Die gewonnenen Rohdaten wurden end- und qualitätsgetrimmt und für ein direktes Alignment mit dem SARS-CoV-2-Referenzgenom (MT192773) verwendet, um genomische Mutationen zu identifizieren, die für die Wellen im September, November und Dezember 2020 charakteristisch sind.

Kontrollen

Bei allen durchgeführten Experimenten wurde ein interner Standard (Kontrolle) verwendet, und zwar das Humanalbumin-Transkript. Da es sich um eine ABSOLUTE Quantifizierung handelte, wurde der interne Standard nur zur Bewertung der Qualität und Integrität der getesteten klinischen Proben verwendet. Daher wurde für die absolute Quantifizierung von SARS-CoV-2 in jeder klinischen Probe die oben beschriebene Kalibrierungskurvengleichung verwendet und nicht die ΔΔCt-Methode, die normalerweise für die RELATIVE Quantifizierung verwendet wird.

Ethische Erklärung

Die Proben für die molekulare Routinediagnostik wurden mit informierter Zustimmung und gemäß den gesetzlichen Richtlinien der Regierung im Hinblick auf die COVID-19-Pandemie-Teststrategie entnommen, die von den überweisenden Kliniken ausgestellt und archiviert wurden. Anonymisierte Proben wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki verarbeitet.

Literaturüberprüfung

Am 27. November 2020 reichte eine internationale Gruppe von 22 Wissenschaftlern (darunter UK, PB, RJK und KS dieser Arbeit) einen externen Überprüfungsbericht (Borger et al., 2020) zusammen mit einem Antrag auf Rücknahme des Charité-Protokolls (Corman et al., 2020) beim Eurosurveillance Editorial Board ein. Da die Dokumente parallel dazu sowohl auf einem wissenschaftlichen Preprint-Server als auch bei ResearchGate.net online gestellt wurden, lieferte die wissenschaftliche Gemeinschaft sowohl zusätzliche Referenzen als auch angemessene Kritik hinsichtlich des Fehlens von experimentellen Nasslabor-Daten, die die von uns geäußerten Bedenken stützen. Diese Informationen wurden in einem Addendum zusammengefasst und am 11. Januar 2021 bei Eurosurveillance eingereicht. Alle Dokumente sind online verfügbar (Borger et al., 2020). In unsere umfassende Diskussion beziehen wir Publikationen aus einer PubMed-Suche mit den Begriffen "PCR" oder "RT-PCR" oder "RT-qPCR" und "SARS-CoV-2" oder "COVID-19" ein. Wir beziehen auch zahlreiche WHO-Empfehlungen zur Teststrategie ein, die auf der WHO-Webseite zu finden sind.

Ergebnisse

Im Gegensatz zum von der WHO empfohlenen Charité-Protokoll, das 45 Zyklen empfiehlt, ohne einen Ct-Wert für die Unterscheidung zwischen positiv und negativ festzulegen, und das bei einem Ct-Wert von >35 zu einer hohen Rate falsch-positiver Ergebnisse führt, übertraf der vorgeschlagene 5'-UTR-Assay das Charité-Protokoll in Bezug auf die Spezifität deutlich (keine unspezifischen PCR-Produkte, selbst bei Anwendung von 45 Zyklen), wobei die erforderliche Empfindlichkeit beibehalten wurde. Im Gegensatz zu nachgeschalteten Genen, die anfällig für Mutationen sind, ist die 5'-UTR-Genomsequenz entscheidend für die Regulierung der viralen Proteinsynthese durch den menschlichen Wirt und bleibt bei Coronaviren von Natur aus stabil (Yang & Leibowitz, 2015; Fields, 2021), wie auch bei SARS-CoV-2 (Baldassarre et al., 2020; Miao et al., 2021; Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2021). Daher konnten wir den 5'-UTR-Assay während der gesamten mutmaßlichen COVID-19-Pandemie erfolgreich einsetzen, unabhängig von der im Laufe der Zeit beobachteten genomischen Heterogenität der einzelnen zirkulierenden Stämme (d. h. Alpha, Beta, Gamma, Delta und auch Omicron). Der 5'-UTR-Assay zeichnet sich dadurch aus, dass es keinen falschen Hintergrund gibt (d. h. eine negative Probe ist wirklich PCR-negativ). Insgesamt wurden 31.028 Proben getestet, von denen 2.737 positiv waren (8,8 %).

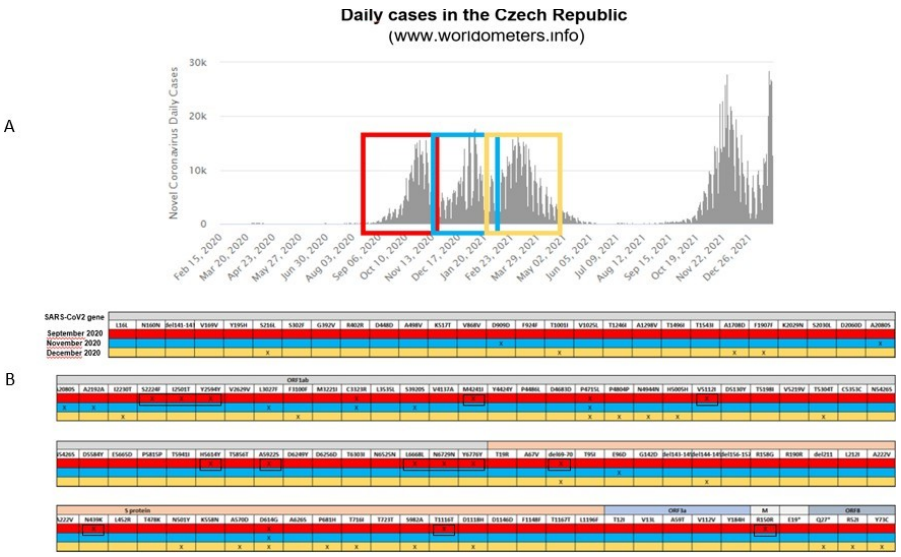

Abbildung 1. SARS-CoV-2-NGS-Ganzgenomsequenzierungsdaten von drei zufällig ausgewählten repräsentativen Genomen, die zwischen September 2020 und April 2021 in der Tschechischen Republik gesammelt wurden. A. Einzelne SARS-CoV-2-Wellen vom Herbst 2020 sind rot (September 2020), blau (November 2020) und gelb (Dezember 2020) hervorgehoben. Die Grafik wurde von

www.worldometers.info open source übernommen. B. Die Tabelle zeigt (von 5' nach 3') die wellenspezifischen SARS-CoV-2-Mutationen, die in den jeweiligen Genomen (Orf1ab, S, Orf3a, M, Orf8) gefunden wurden. Die Mutationen sind in Aminosäuren übersetzt und durch ein schwarzes "x" hervorgehoben. In den schwarzen Kästen sind die Mutationen hervorgehoben, die im SARS-CoV-2-Stamm vom September 2020 vorhanden waren, aber im direkt darauf folgenden SARS-CoV-2-Stamm vom November 2020 nicht vorhanden waren. Ein ähnliches Muster ist beim SARS-CoV-2-Stamm vom Dezember 2020 zu erkennen (der bereits als "British" bzw. später als "Alpha" bezeichnet wurde). In Anbetracht der Tatsache, dass das Gebiet der Tschechischen Republik zu diesem Zeitpunkt aus genetischer Sicht einem genetisch begrenzten Gebiet entsprach, ist die Beobachtung, dass die einzelnen Stämme nicht direkt genetisch miteinander verbunden waren, eher erstaunlich.

Auf der Grundlage unserer langjährigen Erfahrung auf dem Gebiet der quantitativen molekularen Mikrobiologie haben wir das folgende Routinekriterium zur Bewertung der klinischen Bedeutung der gemessenen SARS-CoV-2-Viruslast angenommen: Ct
<25, stark positiv (>10e6 Kopien/ml); Ct 25-30, positiv; Ct 30-35, positive Spuren, aber unwahrscheinlich infektiös; Ct >35, negativ, nicht infektiös (<10e2 Kopien/ml). Beachten Sie, dass die "Kopienzahlen" von Labor zu Labor unterschiedlich sein können, da es einen Unterschied zwischen den Kopienzahlen in einem PCR-Reaktionsgefäß und in einer echten Patientenprobe gibt. In letzterem Fall müssen verschiedene Verdünnungsschritte berücksichtigt werden: Die in 1 ml Abstrich enthaltene RNA wird in 50 µl Elutionspuffer überführt, wovon 4 µl für die cDNA-Synthese und 2 µl für die PCR-Reaktion verwendet werden. Wir haben eine Neukalibrierung vorgenommen, indem wir das anfängliche Probenvolumen neu berechnet haben, um alle unsere PCR-Ergebnisse mit Standardmessungen aus der klassischen Zellkultur vergleichbar zu machen. Wir bewerteten Ct 25, um unseren Standard mit Ct 20 gleichzusetzen (siehe ergänzende Abbildung 2), der den Cut-off der Patientenprobe für eine plausible Korrelation mit der infektiösen Viruslast darstellt.

Durch genomische Nachuntersuchungen und NGS-Ganzgenomsequenzierung von zufälligen Vertretern aus jeder der drei Herbst-2020-Wellen konnten wir nachweisen, dass jede Welle von einem anderen SARS-CoV-2-Stamm repräsentiert wurde. Tatsächlich wurden in der Welle vom September 2020 Mutationen gefunden, die in den direkt folgenden Wellen vom November 2020 und Dezember 2020 (auch bekannt als "British", "B.1.1.7." oder später "alpha") nicht vorhanden waren. Am auffälligsten ist die Diskrepanz zwischen dem SARS-CoV-2-Stamm vom September 2020 und dem vom November 2020.
Vor allem hat die November-Welle 14 Mutationen "verloren", die in der vorangegangenen September-Welle vorhanden waren
(Abbildung 1).

Diskussion

Im Januar 2020 entwickelte eine Gruppe von Wissenschaftlern aus Europa und Hongkong (China) ein RT-PCR-Protokoll, das vor der Veröffentlichung in Eurosurveillance (Corman et al., 2020) auf die WHO-Webseite hochgeladen wurde (WHO, 13. Januar 2020). Dieses sogenannte Charité-Protokoll diente als Vorlage für die meisten nachfolgenden Protokolle zumindest in Europa und hatte zum Ziel, "eine robuste Diagnosemethode zu entwickeln und einzusetzen, die den Einsatz in einem Labor der öffentlichen Gesundheit ermöglicht, ohne dass Virusmaterial zur Verfügung steht". Bereits zu diesem Zeitpunkt war klar, dass das vorgeschlagene Ziel aus folgenden Gründen irreführend war: Spezifisches biologisches Material (in diesem Fall das Virus von Interesse) ist unerlässlich, um die Spezifität und Sensitivität des Testdesigns zu gewährleisten, war aber nicht verfügbar, obwohl seine Notwendigkeit bereits in der veröffentlichten Arbeit der chinesischen Wissenschaftler, die maßgeblich für die Erstellung des Charité-Protokolls verantwortlich waren, erkannt worden war (Zhu et al., 2019; Ren et al., 2020). Darüber hinaus wurde ein ordnungsgemäßes Testdesign, das internationalen Standards entspricht und äußerst spezifische Testmaterialien (Primer und Sonden) umfasst, vom Charité-Protokoll nicht erfüllt. Das Primerdesign des Charité-Protokolls wurde nicht auf maximale Spezifität ohne Kreuzreaktivität ausgelegt und überprüft, sondern ermöglichte einen gruppenspezifischen Nachweis verschiedener Coronaviren der Untergattung Sarbeco. Dies ist fraglich angesichts der Tatsache, dass chinesische

Wissenschaftler bereits am 5. Januar 2020 die gesamte Genomsequenz des Wuhan-Virus mit der WHO geteilt hatten (WHO, 28. Februar 2020) und die Sequenz des Genoms in voller Länge an die Nukleotiddatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (NC_045512.1) übermittelt hatten, was die Erstellung hochspezifischer Primer und Sonden ermöglichte. Das Charité-Protokoll und das Primerdesign basierten jedoch auf einer Reihe von synthetischen Sequenzen und dem SARS-CoV-Stamm Frankfurt-1 als Positivkontrolle, ohne dass die PCR-Produkte durch Sequenzierung verifiziert wurden. Schlimmer noch, es wurde kein Cut-Off-Fenster für den Ct-Wert in Bezug auf eine genau definierte, spezifische Viruslastkontrolle für irgendeines der verschiedenen Zielgene festgelegt. Wie Puhach et al. (2022) feststellten, ist eine Viruslast von 1,00E+06 RNA-Kopien inzwischen allgemein anerkannt, um mit der minimalen Viruslast infektiöser Personen zu korrelieren. Dies wurde bereits vom CCDC-Protokoll (2020) berichtet und entsprach einem mittleren Ct-Wert von 25. In Bezug auf das Charité-Sarbeco-E-Gen entspricht die oben erwähnte RNA-Kopienzahl einem Ct-Wert von etwa 28,19, der jedoch nicht mitgeteilt wurde (Corman et al., 2020), was die Tür für Ct-Werte von bis zu 45 öffnete, die von kommerziellen Labors als positiv gemeldet wurden, und so "Wellen" unplausibler (wahrscheinlich falscher) "positiver" Testergebnisse anheizte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Charité-Protokoll keine der erwarteten und normalerweise obligatorischen Anforderungen an einen "robusten diagnostischen Test" in einer Standardarbeitsanweisung (SOP) erfüllte. In der Tat war die Notwendigkeit dieses Protokolls von Anfang an fraglich, da das CCDC (2020; siehe auch Chan et al., 2020) bereits am 3. Januar 2020 ein effizientes RT-PCR-Protokoll erstellt hatte, das spezifische Kontrollproben enthielt. Unverständlicherweise wurde dieses Protokoll nach dem Charité-Protokoll auf die WHO-Webseite hochgeladen, und zwar teilweise nur auf Chinesisch (WHO, 24. Januar 2021). Obwohl die Hinzufügung dieses chinesischen Teils in englischer Sprache angemessen und wünschenswert gewesen wäre, hätte sie dennoch nicht ausgereicht, um das Hauptproblem zu lösen: Die RT-PCR kann RNA nur in Fragmenten nachweisen, die auch die intakte Zielregion eines positiven Amplikons enthalten. Somit ist die RT-PCR von Natur aus nicht in der Lage, zwischen replikationsfähigen, infektiösen Viruspartikeln Partikeln und nicht-infektiösen Resten von Virusgenomfragmenten zu unterscheiden, die im Grunde ein biologisches Rauschen im System darstellen (Kasten 1).

In Anbetracht der Tatsache, dass das Charité-Protokoll mit einem hohen unspezifischen Hintergrundrauschen behaftet war, das zu falsch-positiven Ergebnissen oberhalb eines Ct-Wertes von 35 für alle Zielregionen führte, und weil ein solch suboptimales Design in der Routinediagnostik nicht vertretbar ist, haben wir das Charité-Design verworfen und stattdessen einen neuen Assay entwickelt. Während das Charité-Protokoll die Amplifikation von drei Zielsequenzen empfiehlt, die sich innerhalb des E-Gens, des RdRp-Gens (bei dem es sich nach der Nomenklatur um das ORF1ab-Gen handelt, das für das RdRp-Protein kodiert) und des N-Gens befinden, zielt unser 5'-UTR-Assay nur auf eine zu amplifizierende Region ab, die jedoch aus der gut konservierten Sequenz innerhalb der 5'-UTR von SARS-CoV-2 besteht. Somit hat sich unser Testdesign als hochspezifisch erwiesen, ohne empfindlich auf den verrauschten Hintergrund relativ bedeutungsloser und nicht infektiöser Fragmente zu reagieren, was durch die Sanger-Sequenzierung der erhaltenen PCR-Amplikons bestätigt wurde.

Bewertung der infektiösen Viruslast durch Zellkultur, nicht durch RT-PCR

Ein früherer Kontakt mit einem bestimmten Virus kann durch immunologische Tests überprüft werden, bei denen eine durch das betreffende Virus ausgelöste Immunantwort im Wirt gesucht wird, die sich in spezifischen Antikörpern (d. h. IgM, IgG, IgA) oder T-Zellen manifestiert, die gegen das Antigen reagieren. Obwohl solche spezifischen Tests schon sehr früh während der Pandemie zur Verfügung standen (Amanat et al., 2020; Braun et al., 2020; Okba et al., 2020), wurden sie von den

Politikern weltweit nicht in ihre Testpolitik aufgenommen, sondern stattdessen molekulare Tests gefördert, die angeblich in der Lage sind, virale RNA mit RT-PCR oder später virales Protein mit Antigen-Schnelltests nachzuweisen. Es sei darauf hingewiesen, dass die PCR eine sehr empfindliche Technik zur DNA-Amplifikation ist, die nach ihrem Erfinder, Karry Mullis (1990), dazu dient, spezifische Sequenzen (d. h. Gene) aus extrem kleinen Probenmengen in kurzer Zeit zu vervielfältigen (Mullis, 1990). Die RT-PCR zum Nachweis von RNA-Zielen erfordert jedoch eine reverse Transkription der RNA, um sie in die DNA-Form umzuwandeln, für deren Nachweis die PCR entwickelt wurde. Bei der quantitativen PCR (qPCR), wie sie beim Test auf SARS-CoV-2 angewandt wird, umfasst die Genamplifikation bei Massentests einen dritten Primer, die so genannte Sonde, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und spezifisch an die amplifizierte Zielsequenz bindet. Nach der Zerstörung der Sonde durch die Polymerase während des Verlängerungsschritts wird ein Lichtsignal erzeugt, das als Ersatzmarker für Amplifikationsrunden verwendet wird (Bustin & Nolan, 2017; Lee, 2021).

Wichtig ist, dass die Probenvorbereitung vor allen Arten von PCR einen vollständigen Aufschluss aller biologischen Strukturen erfordert, um Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und Zelltrümmer zu trennen. Extraktionsprotokolle und kommerzielle Kits für die RNA-Extraktion vor der RT-PCR basieren hauptsächlich auf der so genannten "Chomscynski"-Isolierung (Chomscynski & Sacchi, 1987), bei der die Proben mit einer Mischung aus saurem Guanidiniumthiocyanat, Phenol und Chloroform behandelt werden, die alle komplexen Organismen vollständig zerstört. Folglich kann jede PCR, selbst wenn sie ordnungsgemäß durchgeführt wird, nur das Vorhandensein des betreffenden genetischen Ziels testen, nicht aber die "Lebensfähigkeit" des zugrunde liegenden pathogenen Organismus. Daher kann die PCR keinesfalls als Maßstab für die Beurteilung der Infektiosität eines Individuums dienen.
Der Goldstandard zur Bestimmung der Infektiosität und der infektiösen Viruslast ist die Reproduzierbarkeit des betreffenden Virus in einer geeigneten Zellkultur (Berczuk et al., 2020; Case et al., 2020; Puhach et al., 2022; EVAg Portal; NIH BEI Resources Repository). Eine mögliche Replikationsaktivität eines Virus innerhalb eines getesteten Individuums kann durch einen RT-PCR-Assay nachgewiesen werden, der auf dem Nachweis von subgenomischen RNA-Transkripten (sgRNA) basiert, die nur während der Virusreplikation in infizierten Zellen entstehen (Bruce et al., 2022; Puhach et al., 2022). Da sgRNA bis zu 17 Tage nach dem Nachweis der Infektion nachgewiesen wurde, deutet das Fehlen von sgRNA auf das Fehlen der Virusreplikation hin, während das Vorhandensein von sgRNA nicht unbedingt auf Infektiosität schließen lässt (Bruce et al., 2022). Bemerkenswerterweise wurde eine sgRNA-spezifische RT-PCR für SARS-CoV-2 in einem am 1. März 2020 eingereichten Manuskript von Wölfel et al. (2020) beschrieben, das vom Erst- und Seniorautor des Charité-Protokolls mitverfasst wurde.
Erst- und Seniorautor des Charité-Protokolls mitverfassten. Von diesem Zeitpunkt an hätten alle von der WHO empfohlenen Protokolle grundlegend geändert werden müssen. Sie wurden aber nicht geändert.

Generell kann die PCR jedoch zur Verbesserung der Differentialdiagnose beitragen, d. h. bei der Anwendung von Multiplex-Tests für ein breites Spektrum von Erregern, um zwischen verschiedenen Lungeninfektionen zu unterscheiden, die sich häufig in ähnlichen klinischen Symptomen äußern. Wie bei jedem anderen Labortest auch, muss das Ergebnis des PCR-Tests im Zusammenhang mit den Symptomen des Patienten interpretiert werden.
Da es sich bei der PCR um eine hochempfindliche Technik handelt, war es tatsächlich möglich, einen unterrepräsentierten Erreger innerhalb eines Erregergemischs in einer Körperflüssigkeit oder einem Gewebe in einer Patientenprobe nachzuweisen, wie dies bei zwei der ersten fünf COVID-19-Patienten in Wuhan der Fall war (Ren et al., 2020). Darüber hinaus können Reste in Form von verbleibenden Nukleinsäurefragmenten von SARS-CoV-2 oder anderen Coronaviren oder früheren Erregern durch die PCR nachgewiesen werden, nachdem das natürliche Immunsystem des Patienten

bereits alle infektiösen Erreger beseitigt hat, was zu einem eindeutig positiven PCR-Signal führen kann, das in Wirklichkeit falsch ist (Puhach et al., 2022).

RT-PCR kann medizinische Differentialdiagnosen nur unterstützen, aber nicht ersetzen

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

- Erstens gibt es einen klaren Unterschied in der Kernfrage zwischen klinischen und epidemiologischen Tests. Während klinische Tests auf eine hohe Empfindlichkeit abzielen, um eine vermutete Infektion bei einer symptomatischen Person zu bestätigen oder abzulehnen, zielen epidemiologische Tests auf den spezifischen Nachweis wirklich infektiöser Personen ab, die in der Lage sind, die Virusinfektion zu verbreiten. Da die PCR nicht in der Lage ist, festzustellen oder vorherzusagen, ob eine positiv getestete Person infektiös sein wird oder nicht (Puhach et al., 2022; Kasten 1), stellt sie kein "robustes Diagnoseinstrument" dar. Dementsprechend sollten PCR-basierte Tests niemals zur Überwachung einer asymptomatischen, gesunden Bevölkerung mit dem Ziel eingesetzt werden, Nukleinsäuresequenzen von SARS-CoV-2 oder einem anderen Virus "nachzuweisen".
- Zweitens kann das PCR-Testergebnis keineswegs eine gründliche medizinische Diagnose unter Berücksichtigung von Patientenmerkmalen, d. h. Symptomen, Kontaktanamnese, Komorbiditäten, Medikamentenanamnese, Alter und Ct-Wert, ersetzen. COVID-19 weist die gleichen Symptome wie Atemwegsinfektionen auf und kann daher nicht durch ein einziges eindeutiges Symptom oder Zeichen genau diagnostiziert werden, wie kürzlich in einem Cochrane-Bericht veröffentlicht wurde (Struyf et al. 2020).
- Drittens besteht selbst dann, wenn ein PCR-Test wie der unsere sowohl eine ausgezeichnete Spezifität als auch Sensitivität aufweist, das Risiko falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse, die durch technische und klinische Fehler entstehen können. Wie in einer systematischen Übersichtsarbeit und Meta-Analyse (Cevik et al., 2021) berichtet wurde, scheint die infektiöse Periode von SARS-CoV-2 etwa zwei Tage nach der Exposition zu beginnen und bis zu 12 Tage nach dem Auftreten von Symptomen anzuhalten. Im Gegensatz dazu kann die PCR nach Angaben der CDC (2019a) bis zu 90 Tage lang positiv bleiben. Folglich sind PCR-positive Personen nicht unbedingt Personen, die das Virus übertragen können. Diese Diskrepanz wird in der Gruppe der positiv getesteten, aber asymptomatischen Personen deutlich, die niedrige anfängliche Zielzahlen und hohe Ct-Werte in der Testauswertung aufweisen. Hier ist die überwiegende Mehrheit nicht infektiös, sondern es handelt sich um klinische Falsch-Positive, die sowohl genesene Personen, die noch Virusreste aufweisen, als auch immune Personen umfassen, die aufgrund einer unzureichenden Viruslast nicht ansteckend sind (Cevik et al., 2020; Lyons-Weiler, 2021). Eine umfassende Übersicht über das Problem der klinischen Falsch-Positiven und Falsch-Negativen findet sich in Abbildung 2 in Verna et al. (Verna et al., 2021). Vielmehr hilft der PCR-Test dem Arzt, wie von WHO und CDC empfohlen, einen Anfangsverdacht zu bestätigen oder zu entkräften, ob ein symptomatischer Patient an einer möglichen SARS-CoV-2-Infektion leidet (WHO, 20. Januar 2021; CDCb; CDCc).

Ct-Wert korreliert mit der Menge des Zielgens

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

Da es sich bei der reversen Transkription, den Priming-Bedingungen und den Sekundärstrukturen an den Primer-Bindungsstellen um stochastische Prozesse handelt, kann der Ct-Wert zwischen verschiedenen RT-PCR-Läufen und verschiedenen Labors variieren.
Daher müssen Referenzgene in definierten Mengen einbezogen werden, um die relative Quantifizierung zwischen verschiedenen Studiengruppen zu messen. Dies stellt eine Mindestanforderung für ein "robustes Diagnoseinstrument" dar, wurde aber unerklärlicherweise von den Autoren des Charité-Protokolls nicht durchgeführt. Darüber hinaus erfordert die absolute Quantifizierung einer definierten Viruslast in einer bestimmten Probe eine qPCR-Methodik mit einer Verdünnungsreihe bekannter Mengen inaktivierter Viren. Anschließend kann der Ct-Wert einer unbekannten Probe mit den Ct-Werten der Verdünnungsreihe korreliert und die Viruszahl geschätzt werden, um die Viruskopien pro ml - die sogenannte "Viruslast" - zu bestimmen.

Für SARS-CoV-2 wurde bereits im April 2020 berichtet (Wölfel et al., 2020; Co-Autor von Erst- und Seniorautor des Charité-Protokolls), dass ein Minimum von 106 RNA-Kopien/ml mit einer Viruslast vergleichbar ist, die zur Infektion einer geeigneten Zellkultur verwendet werden kann und somit als "potentiell infektiös" definiert ist. Bei Durchführung von 45 PCR-Zyklen wurden nach Corman et al. (2020) mit dem Charité-Protokoll nur vier RNA-Kopien pro Probe (etwa 103 RNA-Kopien/ml) nachgewiesen. Einige kommerzielle Testkits geben eine Nachweisgrenze von 10 RNA-Kopien pro Probe an (Tib Molbiol). Dies ist etwa 103- bis 105-mal empfindlicher als die infektiöse Viruslast, die für die Kultivierung von SARS-CoV-2 in einer geeigneten Zellkultur erforderlich ist. Unverständlicherweise zählt das Charité-Protokoll jede Probe mit einem PCR-Signal bis zu 45 Zyklen explizit positiv, ohne einen Ct-Cut-off-Wert zu definieren, der zwischen einer positiven/negativen Entscheidung unterscheidet, und ohne jegliche Korrelation zu Kontrollproben mit definierten RNA-Kopienzahlen. Im Gegensatz dazu korreliert unser 5'-UTR-Assay die quantifizierten RNA-Kopienzahlen mit definierten Ct-Werten auf der Grundlage einer Kalibrierungskurve, die aus seriellen log-Verdünnungen des synthetischen SARS-CoV-2-Genoms mit genau vorgegebenen Konzentrationen der Zielsequenz erstellt wurde. Darüber hinaus wird eine Sequenzierung durchgeführt, um die Amplikons zu bestätigen und den Typ der Virusvariante zu bestimmen, die im Test auftritt. Wichtig ist, dass ein positives PCR-Signal per se keine Rückschlüsse auf eine mögliche infektiöse Viruslast zulässt, wenn kein Ct-Wert angegeben wird und das Ergebnis nicht spezifisch auf eine definierte Standardkurve bezogen ist (Kohmer et al., 2021). Diese beiden Voraussetzungen müssen erfüllt sein. Ct-Werte unter 25 spiegeln mehr als 106 RNA-Kopien pro ml Probe wider, was mit einer potenziell infektiösen Viruslast in Verbindung gebracht werden kann.

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

Anzahl der Zielgene und Spezifität

Um ein spezifisches Virusgenom durch RT-PCR zuverlässig nachzuweisen, ist eine gut definierte, hochspezifische und idealerweise konservierte Zielregion erforderlich (wie wir sie in unseren 5'-UTR-Assay aufgenommen haben). Falls eine solche Region nicht identifiziert werden kann, muss alternativ mehr als ein Gen oder eine spezifische Sequenz des Virus durch verschiedene Sätze spezifischer Primer erfasst werden. Im Charité-Protokoll (Corman et al., 2020) wurden drei

Zielgene für den Nachweis von SARS-CoV-2 festgelegt, nämlich das E-Gen, das RdRp-Gen (das ORF-1ab-Gen, das für das RdRp-Protein codiert) und das N-Gen. Die für das E-Gen der Charité ausgewählten Primer wurden jedoch als
spezifisch für die gesamte Sarbeco-Gruppe von Coronaviren, einschließlich SARS und von Fledermäusen abgeleiteter Sarbecoviren. Dieses Target erfüllt eindeutig nicht die Anforderungen für einen spezifischen SARS-CoV-2-Nachweis und wurde daher in einem Manuskript von Tao et al. (2022), in dem alle von der WHO empfohlenen RT-PCR-Protokolle getestet wurden, von der Analyse ausgeschlossen. Darüber hinaus wurde die Sonde des RdRp-Targets als "Pan-Sarbeco" definiert, was sie als Test für SARS-CoV-2 noch unspezifischer macht.

Tabelle 2
Spezifität der SARS-CoV-2-Zielgene E, RdRp und N, bewertet in einem Ringversuch des deutschen Instituts Instand (Zeichhardt & Kammel, 2020), der ein hohes Risiko falsch-positiver Ergebnisse, insbesondere durch Kreuzreaktivität mit Erkältungscoronaviren wie HCoV 229E, aufweist.
*Anzumerken ist, dass HCoV229E zur Gattung der alpha-Coronaviridae gehört, während SARS-CoV-2 und andere Sarbecorviren zur Gattung der beta-Coronaviridae gehören. Die "Erkältungsviren" HCoV-HKU1 und OC43 werden der letztgenannten Gattung zugeordnet, wobei ihre Genomorganisation den Sarbecoviren viel näher kommt (Liu et al., 2021), weshalb eines dieser beiden Viren eine bessere Kontrolle gewesen wäre.

Target gene **SARS-CoV-2**	**No. of tests performed with different test kits**	**Specificity-Test 1** **Cell culture (virus-free)** **Correctly identified as negative Cases [%]**	**Specificity-Test 2 Cell culture (with HCoV229E*)** **Correctly identified as SARS-CoV-2 negative Cases [%]**	**Mean specificity from samples 1 and 2 [%]**	**Mean error rate (false-positives)** **(100 – mean specificity)** **[%]**
E-gene	373	371 [99.46]	355 [95.17]	97.31	2.69
RdRp-gene	182	178 [97.80]	165 [90.66]	94.23	5.77
N-gene	166	164 [98.20]	146 [87.95]	93.08	6.92

Trotz der Tatsache, dass ihr Design angeblich darauf abzielte, nicht ausschließlich spezifisch für das neue SARS-CoV-2 zu sein, haben die von ihnen zur Amplifikation gewählten Targets alle ihre eigene absolute Spezifität und Fehlerquote (Tabelle 2). Die Anzahl der falsch-positiven Ergebnisse kann für jedes einzelne Gen und auch für jede Kombination von Genen berechnet werden. Kurz gesagt, das Risiko falsch-positiver Ergebnisse für unspezifische Primer, wie sie im Charité-Protokoll verwendet werden, hängt von der Anzahl der getesteten Zielgene ab. Je weniger Zielgene getestet werden, desto größer ist die Anzahl der falsch-positiven Ergebnisse, die erzeugt werden. Es ist daher völlig unverständlich, warum die WHO im Verlauf der Pandemie empfahl, die Zahl der Zielgene zu reduzieren, ohne die Spezifität des Primerdesigns zu verbessern. Im ursprünglichen Charité-Protokoll (veröffentlicht am 13. Januar 2020) wurde von der WHO empfohlen, auf drei Zielgene (E-Gen, RdRp-Gen, N-Gen) zu testen (24. Januar 2021). Auf diese Weise hätte die Zahl der falsch-positiven Ergebnisse begrenzt werden können. In der ersten Änderung (veröffentlicht am 17. Januar 2020) wurde jedoch der PCR-Nachweis des N-Gens (das spezifischste und in Verdünnungsreihen das am wenigsten empfindliche Ziel gemäß Muenchhoff et al., 2020) und damit das am wenigsten häufig auftretende falsch-positive Ziel ausgelassen (WHO, 13. Januar 2020). Schlimmer noch, mit der zweiten Änderung (veröffentlicht am 2. März 2020) empfahl die WHO, dass "in Gebieten, in denen das COVID-19-Virus weit verbreitet ist, ein einfacherer Algorithmus angewandt werden könnte, bei dem zum Beispiel das Screening durch RT-PCR eines einzigen Unterscheidungstargets (d. h. des E-Gens) als ausreichend angesehen wird" (2. März 2020). Diese

Änderungen - insbesondere die abschließende Empfehlung, auf das sehr unspezifische E-Gen als einziges Ziel zu testen - würden mit Sicherheit das Risiko falsch-positiver Ergebnisse erhöhen und damit die Fallzahlen in die Höhe treiben, und sie würden wahrscheinlich auch die Zahl der falsch-negativen Ergebnisse erhöhen (Finn & Lucey, 2021; Kanji et al., 2021; Pecoraro et al., 2021).

Fragwürdiges Primerdesign

Jeder zuverlässige RT-PCR-Assay hängt entscheidend von der Qualität der Primer ab, die für die Amplifikation der als spezifisches Ziel ausgewählten Region innerhalb einer Sequenz entwickelt wurden. Für diagnostische Zwecke ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Primer zu 100 % spezifisch für die interessierende Sequenz sind, um eine Kreuzreaktivität mit nahezu homologen Sequenzen eng verwandter Gene zu vermeiden, bei denen es sich um Virusvarianten handeln könnte (Bustin & Nolan, 2017). Wenn zwei oder mehr Primer-Sets verwendet werden, können die Amplifikationseffizienzen pro Primer-Set dennoch unterschiedlich sein. Dies kann aufgrund von Unterschieden in der Primer-Effizienz, die mit der Sekundärstruktur oder Stabilität zusammenhängen, zu unterschiedlichen Assay-Empfindlichkeiten führen (Chan et al., 2020). Das Charité-Protokoll beschreibt Primer mit bis zu sechs unspezifizierten Positionen. Die nicht spezifizierten Positionen führen zum Design mehrerer verschiedener alternativer Primer-Sequenzen (zwei verschiedene RdRp_SARSr_F-Primer + 8 verschiedene RdRp_SARS_P1-Sonden + 4 verschiedene RdRp_SARSr_R). Darüber hinaus teilt einer der N-Primer (Sequenz GCAGACGTGGTCCAGAACAAA) 10 Basen mit einer Sequenz des menschlichen Chromosoms-1 (Sequenz GCAGACTCTGAGGGGATGCCA), von denen sich sechs Basen am 3′-Ende befinden und daher ein hohes Risiko für unspezifisches Priming darstellen (Borger et al., 2020). Der RdRp-Reverse-Primer des Charité-Protokolls ist jedoch noch problematischer, da er zu 100 % mit einer Sequenz auf dem menschlichen Chromosom-18 identisch ist (Borger et al., 2020). Dies kann selbst bei völliger Abwesenheit von SARS-CoV-2-Sequenzen zu unbeabsichtigten PCR-Amplifikationen führen. Darüber hinaus wurde das RdRp-Gen als problematisch eingestuft, da es die niedrigste Rate an positiven Nachweisen und den höchsten Ct-Wert aufweist (Anantharajah et al., 2021; Zimmermann et al., 2022). Ein weiterer wichtiger Aspekt beim Design von PCR-Primern ist die Annealing-Temperatur (Tm), die entscheidend vom GC-Gehalt der Primersequenz abhängt. Je niedriger die Tm ist, desto höher ist das Risiko falsch-positiver Ergebnisse. Außerdem sollten die Tm eines Primerpaares sehr nahe beieinander liegen, vorzugsweise nicht weiter als 2 °C voneinander entfernt (Bustin et al., 2009). Es ist anzumerken, dass die oben erwähnte In-silico-Tm-Vorhersage nur ein erster Hinweis ist. Sie kann nicht alle möglichen Sekundärstrukturen im weiteren genomischen Kontext der Matrize oder in der genauen Zusammensetzung der PCR-Mastermixe berücksichtigen, die Chemikalien enthalten, welche die Tm der PCR-Hybride beeinflussen, und somit eine flexiblere Verwendung von Primern und Sonden ermöglichen, wobei die notwendige Stringenz der Zielerkennung beibehalten werden soll. Trotz dieser beträchtlichen Flexibilität dank moderner PCR-Zusammensetzungen erfordert jedes PCR-Design letztendlich ein Design, das absolut spezifisch und ausreichend empfindlich ist - wie in den ISO13485-Richtlinien festgelegt und durch eine externe Qualitätsbewertung (in unserem Fall UK NEQAS) streng geprüft. Mehrere Primer des Charité-Protokolls weisen laut Borger et al. (2020) und Corman et al. (2020) ein hohes Maß an Tm-Flexibilität auf. In diesem speziellen Fall ging die Tm-Flexibilität der Primer jedoch mit einer deutlich suboptimalen Leistung des PCR-Tests in Bezug auf die Spezifität einher. Für einen "robusten diagnostischen Test" ist dies inakzeptabel. Daher hätte der Charité-Test vor der weltweiten Einführung neu konzipiert werden müssen.

Validierung der erzeugten Amplikons durch Sequenzierung ist obligatorisch

Die Bestimmung der absoluten Virusmenge in einer Patientenprobe, die notwendig ist, um den Ct-Wert mit der in der Zellkultur geschätzten infektiösen Viruslast zu korrelieren, erfordert eine quantitative PCR, die sich von der qualitativen PCR unterscheidet. Bei der qualitativen PCR wird

ein definiertes Amplikon erzeugt, das in der Regel durch eine größenabhängige Analyse in einem Agarosegel nachgewiesen wird und dann als Matrize für die Sequenzierungsanalyse verwendet werden kann. Bei der quantitativen PCR wird ein Ct-Wert erzeugt, der die Kinetik eines akkumulierten Fluoreszenzsignals darstellt, das mit dem Sondenabbau korreliert. Folglich ist bei diesem Verfahren keine Bestätigung der korrekten Amplifikation des Zielgens möglich. Insbesondere bei neu entwickelten Protokollen folgt auf die Amplifikation in der Regel eine Agarosegel- und Sequenzierungsanalyse, um die amplifizierte Sequenz zu bestätigen. Obwohl die WHO (19.03.2020; 08.01.2021; 20.01.2021) eine Ganz- oder zumindest Teilgenomsequenzierung empfiehlt, haben die Autoren des Charité-Protokolls diesen wichtigen Bestätigungsschritt, die Sanger-Sequenzierung, nicht vorgesehen.

Daher wurde die Spezifität der in ihrem Protokoll verwendeten Primer und Sonden, die für eine zuverlässige zielspezifische Amplifikation erforderlich wäre, nie hergestellt (Corman et al., 2020). Bemerkenswerterweise war bereits im April 2020 in der wissenschaftlichen Gemeinschaft bekannt, dass das Charité-Protokoll unter Spezifitätsproblemen "unbekannter Herkunft" litt (Konrad et al., 2020). Selbst unter standardisierten Laborbedingungen berichteten die Autoren des Charité-Protokolls (Corman et al., 2020) selbst, dass vier positive Proben nach einer erneuten Untersuchung negativ waren, was das klassische Beispiel für falsch-positive Ergebnisse oder zufällige Laborkontaminationen mit PCR-Produkten aufgrund von Handhabungsproblemen darstellt. Die Tatsache, dass die Autoren ihre falsch-positiven Ergebnisse mit "Handhabungsproblemen" erklärten, die sogar zu Beginn des Charité-Protokolls in einem Labor mit erfahrenem Personal auftraten, wirft ernsthafte Fragen über die Kontaminationsraten in großen staatlichen Labors sowie in neu eingerichteten kommerziellen Labors auf, die seit Beginn der sogenannten "Pandemie" unter Druck gesetzt wurden, viele PCR-Tests durchzuführen.

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

"Auf der Grundlage von Berechnungen mit Primer Express v3.0 (Applied Biosystems, Dreieich, Deutschland) wurden für den RdRp-Vorwärtsprimer 64 °C und für den RdRp-Rückwärtsprimer des Charité-Protokolls 51 °C als Annealing-Temperatur vorhergesagt. Dieser Temperaturunterschied kann zu einer geringeren PCR-Effizienz führen."

Trotz dieser Tatsachen kamen die Autoren zu folgendem Schluss:

"Die meisten der untersuchten RT-PCR-Assays für SARS-CoV-2 wiesen fünf RNA-Kopien pro Reaktion nach, was eine hohe Sensitivität und ihre Eignung für Screening-Zwecke weltweit widerspiegelt."

Diese Schlussfolgerung ist gültig, wenn man die PCR-Empfindlichkeit an sich betrachtet. Die gemeldete bemerkenswerte Empfindlichkeit deutet jedoch auf das Risiko hin, dass selbst kleine Reste einer früheren Infektion amplifiziert werden. Dies ist für ein diagnostisches Instrument, das auf positive und negative Personen testen soll, nicht geeignet. Die Folgen der daraus resultierenden Fehler können tödlich sein. Daher ist bei RT-PCR-Tests die Spezifität viel wichtiger (Klement & Bandyopadhyay, 2021). Hervorragende Spezifität für die anvisierten Gene in Kombination mit empfindlichen Ct-Werten (≤ 25) sind die notwendigen Merkmale für einen robusten und zuverlässigen PCR-Test.
Eine weitere bekannte diagnostische Herausforderung ist das Auftreten von Mutationen und neuen Virusvarianten. Ihr Vorhandensein erfordert eine regelmäßige Validierung und möglicherweise eine Neugestaltung der Primer, um potenzielle Primer-Proben-Fehlpaarungen zu vermeiden. Dies wurde von Osorio und Mitarbeitern demonstriert, die 1825 in der GISAID-Datenbank (März 2020) hinterlegte SARS-CoV-2-Genomsequenzen mit der Wuhan-Hu-1-Referenzsequenz (NC_045512)

abglichen. Anschließend annotierten sie in den Alignments die Bindungsstellen von 33 Oligonukleotiden, die von der WHO für die Verwendung in der RT-PCR freigegeben wurden, und stellten fest, dass etwa 79 % der analysierten Primer-Bindungssequenzen Mutationen in mindestens einem Zielgen aufwiesen (Osorio et al., 2020).
Darüber hinaus bestätigten unsere eigenen NGS-Daten, die zwischen Oktober 2020 und Januar 2021 in der Tschechischen Republik gewonnen wurden, dass die Validierung eines PCR-basierten Diagnosetests durch Sequenzierung zwingend erforderlich ist. Sie ist nicht nur in der Anfangsphase der Etablierung, sondern auch in der Folgezeit regelmäßig erforderlich. Die Notwendigkeit eines solchen Ansatzes wurde durch unsere NGS-Daten deutlich, die zeigten, dass jede der drei einzelnen Wellen, die im Oktober 2020, November 2020 und Dezember 2020/Januar 2021 in der Tschechischen Republik kulminierten, sich genomisch von der vorangegangenen Welle unterschied. Obwohl SARS-CoV-2 eine hohe Mutationsrate aufweist, konnten wir mit unserem 5'-UTR-Assay alle zirkulierenden Stämme, d. h. alpha, beta, gamma, delta und omicron, zuverlässig identifizieren.

Interessanterweise waren die in der Welle vom September 2020 gefundenen Mutationen in den direkt folgenden Wellen vom November 2020 und Dezember 2020 nicht vorhanden. Diese Diskrepanz wurde bei der Omicron-Variante deutlich, die Berichten zufolge keine direkte evolutionäre Verbindung zu einer der früheren SARS-CoV-2-Varianten aufweist (Sun et al., 2022; auch Perez et al., 2023 in dieser Zeitschrift). Dies ist mehr als merkwürdig, wenn man bedenkt, dass die Tschechische Republik alle Restriktionsmaßnahmen ergriffen hatte, nämlich Abriegelung, massive Reisebeschränkungen, soziale Distanzierung und Gesichtsmasken. Auf diese Weise verhielt sich das Gebiet der Tschechischen Republik wie eine genetisch begrenzte, isolierte Population, die eine derartige SARS-CoV-2-Vielfalt nicht unterstützen würde. Nachfolgende Wellen, die aus einem begrenzten Gebiet stammen, sollten nämlich alle aufeinanderfolgenden Mutationen ihrer Vorgänger tragen. Das Virus könnte im Laufe seiner Entwicklung weitere Mutationen erwerben, aber logischerweise kann es nicht auf magische Weise Mutationen auslöschen, die in früheren Wellen der gleichen Virusfolge aufgetreten sind. Noch merkwürdiger war die Tatsache, dass die beobachtete Diskrepanz zwischen den SARS-CoV-2-Stämmen vom September 2020 und vom November 2020 am deutlichsten war. Die merkwürdige Entwicklung bestand darin, dass die November-Welle 14 Mutationen "verlor", die in der unmittelbar vorangegangenen September-Welle vorhanden waren. Über diese ungewöhnlichen genomischen Merkmale der aufeinanderfolgenden SARS-CoV-2-"Wellen" kann nur spekuliert werden, doch aufgrund der verfügbaren Literatur über die reverse Genetik von RNA-Viren (Perez, 2017) und insbesondere darüber, wie leicht infektiöse Coronaviren genetisch manipuliert werden können (Cockrell et al., 2017; Muth et al., 2018), kann ein künstlicher oder vom Menschen verursachter Eingriff nicht ausgeschlossen werden.

Gute Laborpraxis erfordert ein Standardarbeitsverfahren (SOP)

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

Um Fehler zu vermeiden, die jeder Laboranalyse innewohnen, müssen die Nachweisverfahren immer von kompetenten Forschern sorgfältig konzipiert und mit einer zuverlässigen Standardarbeitsanweisung kombiniert werden. Der RT-PCR-Test ist nur dann als Diagnoseinstrument für den Virusnachweis geeignet, wenn er auf allen Ebenen standardisiert und kontrolliert wird. Eine SOP ist unabdingbar, wenn fehlerhafte Ergebnisse in einem vernünftigen Umfang ausgeschlossen werden sollen. Für den Nachweis von SARS-CoV-2 sollte die SOP ein anonymisiertes Panel von Testproben mit inaktiviertem Virusmaterial enthalten, das von einem externen Anbieter (d. h. einem Referenzlabor) zur Verfügung gestellt wird, sowie eine negative Probe und Proben mit eng verwandten Viren, um die Spezifität zu überprüfen (diese Proben müssen negativ bleiben). Idealerweise sollte die SOP auch eine Verdünnungsreihe mit inaktiviertem Virus enthalten, um die Empfindlichkeit des Tests zu bestimmen (wobei der Ct-Wert der infektiösen Viruslast entspricht). Im Rahmen einer weltweiten Pandemie können die geforderten Anforderungen nur erreicht werden, indem ein solches Verfahren experimentell auf seine weltweite Gültigkeit geprüft wird. Die letztgenannte Validitätsanforderung kann nur in einem so genannten Ringversuch erfüllt werden (Kasten 2).

Kasten 2: Interne Kontrollen für jeden RT-PCR-Lauf sollten umfassen:
- einen leeren Tupfer, um eine Kontamination während der Probenentnahme auszuschließen;
- eine RNA-Extraktionskontrolle, um eine korrekte RNA-Isolierung sicherzustellen;
- eine Negativkontrolle nur mit den Komponenten des Kits, um eine Kontamination durch die Produktion oder das klinische Kit auszuschließen;
- eine "wasserdichte" Kontrolle als interne Negativkontrolle;
- ein Referenzgen (z. B. humanes RNaseP) als interne Positivkontrolle;
- Positivkontrollen von inaktiviertem SARS-CoV-2, isoliert aus Zellkulturüberständen, um den Ct-Wert mit der Kopienzahl der replikationskompetenten infektiösen Viruslast zu korrelieren, z. B. durch Plaque-Assays (Mendoza et al., 2020). Dazu gehört (1) eine Konzentration, die der infektiösen Viruslast entspricht (107) mit einem Ct < 30 in allen amplifizierten Zielgenen und (2) eine Sonde, die einer nicht infektiösen Konzentration (z. B. 5x 105) entspricht, um den Ct-Wert zu definieren, ab dem die RT-PCR negative Ergebnisse liefert. Diese Positivkontrollen müssen einer Qualitätskontrolle unterzogen werden, da das Virus in der Zelllinie enthalten ist und möglicherweise keine neu auftretenden Viren widerspiegelt.
- Kreuzreaktivitätskontrolle (muss negativ bleiben), z. B. "normale saisonale Grippe"-Coronaviruslinien wie OC43 und 229E, die wie die SARS-CoV-2-Positivkontrollen bei einer Viruslast von 107 inaktiviert wurden. Idealerweise handelt es sich dabei um Sanger-Sequenz-geprüfte Ziel-Negativkontrollen von menschlichen Proben.

Die Notwendigkeit einer SOP wurde durch Studien in Deutschland deutlich, die von Instand eV koordiniert wurden, einer Organisation, die Zertifikate für gute Laborpraxis vergibt. Der erste Ringversuch zur Validierung der RT-PCR der Charité, an dem 488 Labore teilnahmen, ergab erhebliche Probleme (Zeichhardt & Kammel, 2020). Bemerkenswert ist, dass während eines laufenden Ringversuchs drei von sieben Proben aus dem Blindpanel ausgeschlossen wurden, weil "dringende Bitten aus dem In- und Ausland vor Ablauf der verlängerten Einreichungsfrist, d.h. vor dem 28. April 2020, die Eigenschaften der zu untersuchenden Proben offenzulegen, damit die Laboratorien ihre Testmethode im Falle möglicher Fehlmessungen kurzfristig verbessern können". Das Eingreifen in ein Ringversuchsverfahren ist sehr ungewöhnlich, und der Bericht kann nicht als unabhängiges externes Validierungsverfahren der teilnehmenden Laboratorien angesehen werden. Ein zusätzliches Problem, selbst bei diesem kontrollierten Ringversuch mit bereits vorbereiteten Proben und reduziertem Testumfang, sind die in 24 Laboratorien aufgetretenen Probenverwechslungen, die interessanterweise immer dieselbe SARS-CoV-2-positive Sonde mit der Kontrollsonde, die das Erkältungscoronavirus HCoV229E enthält, betrafen (Zeichhardt & Kammel,

2020). Schließlich wurde festgestellt, dass der Nachweis der Zielgene in Bezug auf die Ct-Werte enorme Unterschiede zwischen den Labors aufwies. So lagen beispielsweise die Ct-Werte für dieselbe verdünnte Probe von SARS-CoV-2 (Probennummer 340061) zwischen 15-40 für das E-Gen, 20-40,7 für das N-Gen und 19,5-42,8 für das RdRp-Gen. Die stark unterschiedlichen Ct-Werte für die verschiedenen Gen-Targets, die auf demselben Target basieren, zeigen offensichtlich die unterschiedliche Empfindlichkeit der Targets und werden weitgehend vom anfänglichen Amplifikationserfolg beeinflusst. Da es sich bei der PCR um einen 2-logarithmischen Prozess handelt, steigt jedes kleine Anfangsproblem ebenfalls logarithmisch an. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, bei jeder PCR eine Kontrollstandardkurve mitzuführen, um die Ergebnisse zu bewerten. Zusammengenommen zeigen diese Daten eindrucksvoll den extremen Mangel an Teststandardisierung innerhalb der teilnehmenden, zertifizierten Labors. Da es keine weltweite (oder zumindest EU-weite oder USA-weite) SOP gibt, können wir uns nur vorstellen, welche enormen Unterschiede in den Labors entstehen, die "SARS-CoV-2-RNA" in echten Patientenproben nachweisen.

Schlussfolgerung

Die Verletzung von Grundsätzen guter wissenschaftlicher Praxis ermöglichte es Politikern, eine nicht evidenzbasierte Medizin auf ganze Bevölkerungsgruppen anzuwenden.

Das Charité-Protokoll stellt einen Verstoß gegen alle international anerkannten Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis dar (Kasten 3). Zunächst wurden die für die RT-PCR verwendeten Primer und Sonden an Testfirmen, d.h. Labor Berlin und Tib Molbiol, weitergegeben und als Light Mix Diagnostic Test Kits kommerziell verfügbar gemacht, d.h., LightMix® Modular SARS-CoV-2/COVID-19, RdRp; LightMix® Modular SARS-CoV- 2/COVID-19, E-gene; Tib Molbiol, Roché Diagnostics vor der wissenschaftlichen Veröffentlichung und ohne diese Tatsache und den damit verbundenen Interessenkonflikt in der wissenschaftlichen Veröffentlichung zu erwähnen. Zweitens wurde das Testprotokoll vor der Peer-Review und der Veröffentlichung in Eurosurveillance (Corman et al., 2020) als WHO-Leitlinie online veröffentlicht (WHO, 24. Januar 2021). Erst dann wurde es einer schnellen 24-Stunden-Peer-Review unterzogen, die im Nachhinein mit der bevorstehenden Pandemie begründet wurde. Dennoch gab es am 21. Januar 2020, dem Tag, an dem das Manuskript eingereicht wurde, weltweit nur sechs Todesfälle (Our World in Data). Außerdem war das Tib Molbiol LightMix Kit bereits eine Woche vor der Veröffentlichung des Charité-Protokolls in Slowenien erhältlich (Poljak et al., 2020). Zu diesem Zeitpunkt war in Europa noch kein einziger Fall von SARS-CoV-2 dokumentiert (Our World in Data). Drittens sind zwei der Autoren Mitglieder des Redaktionsausschusses von Eurosurveillance, ein weiterer ist Geschäftsführer von Tib Molbiol, während ein weiterer leitender Forscher bei GenExpress und wissenschaftlicher Berater von Tib Molbiol ist - keiner dieser potenziellen Interessenkonflikte wurde bei der Einreichung des Manuskripts offengelegt (Borger et al., 2020).

Die Vernachlässigung international anerkannter Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis führte zur Veröffentlichung eines stark fehlerhaften Labortests. In der Folge wurden positive RT-PCR-Ergebnisse mit "COVID-19-Fällen" gleichgesetzt, selbst wenn keine Krankheitssymptome vorlagen. Ein "Fall" impliziert jedoch Symptome und die Diagnose einer Krankheit, hier COVID-19, und nicht das Vorhandensein von (Teilen von) SARS-CoV-2. Auch aus wissenschaftlicher Sicht machten die täglichen Meldungen über so genannte "neue Fälle" oder "neue Infektionen" keinen Sinn, da weder feststand, ob sie "neu" waren, noch, dass sie "infektiös" waren. Die hohe Empfindlichkeit der PCR ermöglicht den Nachweis von Virusfragmenten jeglicher Herkunft, aber die PCR kann keine "Fälle" oder "Infektionen" diagnostizieren. Tatsächlich sind mehr als die Hälfte der positiven Testergebnisse wahrscheinlich nicht infektiös (Jaafar et al., 2021). Dennoch haben Regierungen auf der Grundlage eines äußerst fehlerhaften RT-PCR-Labortests Quarantänen über

gesunde Menschen verhängt und Abriegelungen vorgenommen, die der Bevölkerung und der Wirtschaft weltweit erheblichen Schaden zugefügt haben.
Als Folge der fehlenden Korrekturleseaktivität der Polymerase wird die Nukleotidmutationsrate von SARS-CoV-2 auf 8E-04 Substitutionen pro Stelle und Jahr geschätzt (The Open Science Prize, 2020). Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass neue genetische Variationen von SARS-CoV-2 sowohl die Empfindlichkeit als auch die Spezifität etablierter RT-PCR-Tests beeinträchtigen könnten. Dies ist um so wahrscheinlicher, als 8,5 % aller Mutationen (neue Nukleotidunterschiede) in SARS-CoV-2-Varianten weltweit nachweislich an bekannten PCR-Primern zugeordnet werden können (Penarrubia et al., 2020). Daher empfehlen wir eine kontinuierliche Überwachung der genomischen Variationen, um schnell reagieren zu können, falls ein neues Assay-Design erforderlich ist.

Aus Sicht der nationalen Gesundheitsbehörden sollten die Behörden daher eine ständige Überwachung von RT-PCR-positiven und -negativen, symptomatischen Personen durch Sanger-Sequenzierung fordern, um einen Rückgang der Sanger-positiven und Sanger-negativen Personen im Laufe der Zeit zu erkennen und so ein evolutionsbedingtes PCR-Escape zu verhindern. In diesem Fall sollten die offiziellen Fallzahlen auf der Grundlage des Verlusts an Sanger-positiven Personen nach unten und des Verlusts an Sanger-negativen Personen nach oben korrigiert werden (beides mit Konfidenzintervallen).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass positive Testergebnisse eine Mischung aus echten COVID-19-Fällen (d. h. Kontakt mit SARS-CoV- 2 mindestens 9 Tage vor dem Test, wahrscheinlich infektiös mit Symptomen einer Atemwegserkrankung), unechten Fällen (d. h. Kontakt mit dem Virus oder Virusfragmenten vor weniger als 9 Tagen, wahrscheinlich nicht infektiös, manchmal mit Symptomen) und falschen Fällen (gesund, sicher nicht infektiös) umfassen. Die Verteilung dieser drei Kategorien hängt von den Laborunterschieden, den verwendeten Kits, den Fähigkeiten der Techniker usw. ab. Wir raten daher dringend davon ab, die RT-PCR-Technologie zur Messung von "Fällen" oder "Infektionen" ohne eine angemessene und unabhängige "altmodische" ärztliche Diagnose einzusetzen. Wir kommen zu dem Schluss, dass die Anwendung dieser Technologie als Instrument für bevölkerungsweite Massentests die COVID-19-Pandemie unnötig verschlimmert und verlängert hat und bei ähnlichen zukünftigen Szenarien unterlassen werden sollte.

Mangelnde Transparenz war und ist ein allgegenwärtiger Begleiter der Krise

Kasten 3: Zu den international anerkannten Grundsätzen der guten wissenschaftlichen Praxis gehören:
- formale Aspekte, z. B. die gründliche Überprüfung der Forschungsergebnisse durch unabhängige Gutachter vor der Veröffentlichung und die Offenlegung jeglicher Art von Interessenkonflikten durch alle Mitautoren, wie z. B. Projektfinanzierung durch die pharmazeutische Industrie,
- Forschungsaspekte, z. B. die Durchführung eines gültigen Protokolls, einschließlich Positiv- und Negativkontrollen, sowie die Bestätigung der Ergebnisse und der Einsatz geeigneter und solider Techniken,
- Qualitätssicherung und die Festlegung von Standards. Letztere sind besonders wichtig bei der Entwicklung neuer Methoden oder diagnostischer Tests, insbesondere wenn ein Testergebnis

Am Ende mehr Schaden als Nutzen anrichten

In zwei Leitartikeln des BMJ wurde behauptet, dass Politiker und Regierungen während COVID-19 die Wissenschaft unterdrückten, um die kommerzielle Verfügbarkeit von Diagnostika und

Behandlungen zu beschleunigen (Abbasi, 2020; Jureidini & McHenry, 2022). Angesichts einer drohenden "Killervirus-Pandemie" kann die Veröffentlichung und Vermarktung eines suboptimalen RT-PCR-Tests zum Nachweis von SARS-CoV-2 zwar verteidigt werden, doch müssen alle Fehler und unangemessenen wissenschaftlichen Standards, die nach der Veröffentlichung entdeckt werden, unverzüglich gemeldet und korrigiert werden. Ein Antrag auf Rücknahme des Charité-Protokolls (Corman et al., 2020) auf der Grundlage von zehn formalen und technischen Bedenken wurde im November 2020 bei der Eurosurveillance-Redaktion eingereicht, scheint aber nie ernsthaft in Betracht gezogen worden zu sein (Borger et al., 2020). Der Antrag wurde in einer Online-Stellungnahme auf der Grundlage von fünf nicht veröffentlichten Sachverständigengutachten abgelehnt, obwohl auf keines der Bedenken angemessen eingegangen wurde (Editorial Note Eurosurveillance).

Darüber hinaus wurde ein Addendum mit 20 von Fachkollegen überprüften, veröffentlichten Arbeiten, die diese Bedenken untermauern, nicht einmal erwähnt. Die anschließende Aufforderung, die Peer-Review-Berichte der fünf Peer-Review-Gutachter offenzulegen, wurde von der Eurosurveillance-Redaktion abgelehnt und verstieß damit gegen zentrale wissenschaftliche Standards, die ein transparentes Peer-Review-Verfahren garantieren, um einen ehrlichen wissenschaftlichen Dialog zu ermöglichen. Warum man sich nicht entschlossen hat, die wissenschaftliche Gemeinschaft über denkbare Mängel und Fallstricke des Charité-Protokolls zu informieren, bleibt rätselhaft.
Schließlich mangelt es den Entscheidungsprozessen der WHO an Transparenz. 12 Jahre nach der Schweinegrippe ist immer noch unklar, warum die WHO die Definition einer Pandemie geändert hat. Nach der alten Definition wäre es gar nicht möglich gewesen, COVID-19 zu einer Pandemie zu erklären. Unverständlich ist auch, warum die WHO nicht sofort eine englische Version des vom CCDC entwickelten RT-PCR-Tests veröffentlicht hat, sondern einen anderen europäischen Test.
Eine weitere unbeantwortete Frage ist:
Warum hat die WHO nicht sofort über die Bedeutung des Ct-Wertes und die Interpretation der RT-PCR-Testergebnisse berichtet, als die PCR-Technologie als "Goldstandard" für den Nachweis von SARS-CoV-2 eingeführt wurde? Warum hat sie dies erst ein ganzes Jahr nach Ausbruch der Pandemie getan (WHO, 20. Januar 2021)?
Warum haben einflussreiche Wissenschaftler wie Marion Koopmanns und Anthony Fauci nicht auf den Missbrauch der PCR als so genanntem "Goldstandard" für den Nachweis "infektiöser" Personen aufmerksam gemacht, obwohl sie es besser wissen müssten, wie sie in Interviews und Podcasts gezeigt haben (siehe Kasten 1)? Wenn der Mangel an Transparenz nicht auf wissenschaftliche Unkenntnis zurückzuführen ist, was wir für eine vernünftige Schlussfolgerung halten, scheint es sich um eine unerwünschte Einmischung der Politik in die Wissenschaft und die medizinische Praxis zu handeln. Sollte dies der Fall sein, so wäre dies beunruhigend. Zumindest die Wissenschaft selbst muss um jeden Preis frei bleiben von politischen Ideologien, von Dogmen und von finanziellen Interessen.

Danksagung

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

Beiträge der Autoren

UK, SP, PB, KS: Studienaufbau. SP: NGS-Analyse. RJK, RL, KS: Entwurf der Überprüfung. Alle Autoren waren an der Durchsicht der Literatur und dem Verfassen des Manuskripts beteiligt.

Finanzierung

RL wurde im Rahmen des Forschungs- und Innovationsprogramms Horizont 2020 der Europäischen Union unter der Vertragsnummer 883441 im Projekt STAMINA (Demonstration intelligenter Entscheidungshilfen für die Vorhersage und das Management von Pandemiekrisen innerhalb und über die Grenzen Europas hinweg) gefördert. Keiner der anderen Autoren hat angegeben, dass er für diese Forschungsarbeit einen Zuschuss von einer öffentlichen, kommerziellen oder gemeinnützigen Einrichtung erhalten hat.

Erklärung über konkurrierende Interessen

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

Referenzen

Abbasi, K. (2020). COVID-19: politisation, ´corruption´ and suppression of science. British Medical Journal 71m4425. https://www.bmj.com/content/371/bmj.m4425/

Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S. et al. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. Nature Medicine 26:1033–1036. https://doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5

Anantharajah, A., Helaers, R., Defour, J.P., Olive, N., Kabera, F., Croonen, L. et al. (2021). How to choose the right real-time RT-PCR primer sets for the SARS-CoV-2 genome detection? Journal of Viological Methods 295:114197. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114197Baldassarre, A., Paolini, A., Bruno, S.P., Felli, C., Tozzi, A.E. & Masotti, A. (2020). Potential use of noncoding RNAs and innovative therapeutic strategies to target the 5'-UTR of SARS-CoV-2. Epigenomics 12:1349-1361. https://doi.org/10.2217/epi-2020-0162.

Basile K., Maddocks, S., Kok, J. & Dwyer, D.E. (2020.) Accuracy amidst ambiguity: false positive SARS-CoV-2 nucleic acid tests when COVID-19 prevalence is low. Pathology 52:809-811. https://doi.org/10.1016/j.pathol.2020.09.009.

Berczuk, A.C., Salvatore, S.P., Seshan, S.V., Patel, S.S., Bussel, J.B., Mostyka, M. et al. (2020). COVID-19 pulmonary pathology: a multi-institutional autopsy cohort from Italy and New York City. Modern Pathology 33:2156-2168. https://doi.org/10.1038/s41379-020-00661-1.

Borger, P., Malhotra, B.R., Yeadon, M. et al. (2020). External peer review of the RTPCR test to detect SARS-CoV-2 reveals 10 major scientific flaws at the molecular and methodological level: consequences for false positive results. https://web.archive.org/web/20220122062141/https://cormandrostenreview.com/report/. [Original link https://cormandrostenreview.com/report no longer available].

Braun, J., Loyal, L., Frentsch, M. et al. (2020). SARS-CoV-2-reactive T-cells in healthy donors and patients with COVID-19. Nature 587:270–274. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9.

Bruce, E.A., Mills, M.G., Sampoleo, R., Perchetti, G.A., Huang, M.L., Despres, H.W. et al. (2022). Predicting infectivity: comparing four PCR-based assays to detect culturable SARS-CoV-2 in clinical samples. EMBO Molecular Medicine 14:e15290. https://doi.org/10.15252/emmm.202115290.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M. et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry 55:611-22. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797.

Bustin, S. & Nolan, T. (2017). Talking the talk, but not walking the walk: RTqPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research. European Journal of Clinical Investigation 47:756-774. https://doi.org/10.1111/eci.12801.

Case, J.B., Bailey, A.L., Kim, A.S., Chen, R.E. & Diamond, M.S. (2020). Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2. Virology 548:39–48. https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.05.015.

CDC (2019a). Interim Guidance for SARS-CoV-2 Testing in non-healthcare workplaces. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/community/organizations/testing-non-healthcare- workplaces.html.

CDC (2019b). Interim guidance for antigen testing for SARS-CoV-2. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019- ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#previous.

CDC (2021c). 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel. For emergency use only. Instructions for use. https://www.fda.gov/media/134922/download.

Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J. & Peiris, M. (2020). Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. British Medical Journal 371:m3862. https://doi.org/10.1136/bmj.m3862.

Cevik, M., Tate, M., Lloyd, O., Maraolo, A.E., Schafers, J. & Ho, A. (2021). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. Lancet Microbe 2:e13-e22. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30172-5.

Chan, J.F.W., Yip, C.C.Y., To, K.K.W., Tang, T.H.C., Wong, S.C.Y., Leung, K.H. et al. (2020). Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology 58;e00310-20. https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20.

China CDC. (2020). Laboratory testing for COVID-19. [http://wjw.wuhan.gov.cn/front/web/showDetail/2019123108989 now supposed to be available athttps://en.chinacdc.cn/special/COVID19_Response/discoveries_guidelines/202205/t20220516_259215.htmlwa s but the link to the PowerPoint does not seem to go anywhere; later changed to http://www.chinacdc.cn/en/COVID19/202003/P020200323390321297894.pdf, but neither of those links works at the time of this writing. Therefore, we have made the pdf file available as a separate document at https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v3i1.74].

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol- chloroform extraction. Analytical Biochemistry 162:156-159. https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999.

Cockrell, A.S., 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, pp59-81, Humana Press.

Cohen, A.N., Kessel, B. & Milgroom, M.G. (2020). Diagnosing SARS-CoV-2 infection: the danger of over-reliance on positive test results. medRxiv Preprint. https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20080911.

Corman, V.M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D.K.W., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M.L., Mulders, D.G.J.C., Haagmans, B.L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M.P.G4 & Drosten, C. (2020). Detection of 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. 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). The species Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nature Microbiology 5:536–544. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z. Preprint from February 11, 2020: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.07.937862v1.

Doshi, P. (2010). More changing webpages at WHO. Rapid Respons to: WHO is accused of "crying wolf" over swine flu pandemic. British Medical Journal 340:c1904. https://doi.org/10.1136/bmj.c1904.

Editorial Note Eurosurveillance. (3 Dec 2020). https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560- 7917.ES.2020.25.48.2012031.

EVAg Portal. https://www.european-virus-archive.com/evag-portal?portal_search=SARS-CoV- 20272&advanced_ictv_tax_search.

Fauci, A. (30 Dec 2021). https://www.youtube.com/watch?v=bAICMQ1D5F8.

Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. & Griffin, D.E. (2001). Fields Virology, 4, edition, Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia.

Finn, K. & Lucey, B. (2021). Misdiagnosis of SARS-CoV-2: a critical review of the influence of sampling and clinical detection methods. Medical Sciences 9:36. https://doi.org/10.3390/medsci9020036.

Hedges, K. & Lasco, G. (2021). Medical populism and COVID-19 testing. Open Anthropology Research 1:73-86. https://doi.org/10.1515/opan-2020-0109.

Jaafar, R., Aherfi, S., Wurtz, N., Grimaldier, C., Hoang, T.V., Colson, P. et al. (2021). Correlation between 3790 quantitative polymerase chain reaction-positive samples and positive cell cultures, including 1941 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolates. Clinical Infectious Diseases 72:e921. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491.

Jefferson, T., Spencer, E.A., Brassey, J. & Heneghan, C. (2020) Viral cultures for COVID-19 infectious potential assessment - a systematic review. Clinical Infectious Diseases 3:ciaa1764. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1764.

Jiang, S., Shi, Z., Shu, Y., Song, J., Gao, G.F., Tan, W. & Guo, D. (2020). A distinct name is needed for the new coronavirus. The Lancet 395:949. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30419-0.

Jureidini, J. & McHenry, L.B. (2022). The illusion of evidence-based medicine. British Medical Journal 376:o702. https://doi.org/10.1136/bmj.o702.Kanji, J.N., Zelyas, N., MacDonald, C., Pabbaraju, K., Khan, M.N., Prasad, A. et al. (2021). False negative rate of COVID-19 PCR testing: a discordant testing analysis. Virology Journal 18:13. https://doi.org/10.1186/s12985- 021-01489-0.

Klement, R.J. & Bandyopadhyay, P.S. (2021). The epistemology of a positive SARS-CoV-2 test. Acta Biotheoretica 69:359-375. https://doi.org/10.1007/s10441-020-09393-w.

Kohmer, N., Rabenau, H.F., Hoehl, S., Kortenbusch, M., Ciesek, S. & Berger, A. (2021). Comparative analysis of point-of-care, high-throughput and laboratory-developed SARS-CoV-2 nucleic acid amplification tests (NATs). Journal of Virological Methods 291:114102. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114102.

Koopmans, M. (26 Nov 2020). https://www.youtube.com/watch?v=flsF7trvq2c.

Konrad, R., Eberle, U., Dangel, A., Treis, B., Berger, A., Bengs, K. et al. (2020). Rapid establishment of laboratory diagnostics for the novel coronavirus SARS-CoV-2 in Bavaria, Germany, February 2020. Eurosurveillance 25:pii=2000173. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000173.

Layfield, L.J., Camp, S., Bowers, K. & Miller, D.C. (2021). SARS-CoV-2 detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction testing: analysis of false positive results and recommendations for quality control measures. Pathology Research Practice 225:153579. https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153579.

Lee, S.H. (2021). qPCR is not PCR just as a straightjacket is not a jacket - the truth revealed by SARS-CoV-2 false- positive test results. Research Infotext 02:230–278. https://researchinfotext.com/article-details/qPCR-is-not- PCR-Just-as-a-Straightjacket-is-not-a-Jacket-the-Truth-Revealed-by-SARS-CoV-2-False-Positive-Test-Results.

Lee, S.H. (2022). Evidence-based evaluation of PCR diagnostics for SARS-CoV-2 and the Omicron variants by gold- standard Sanger sequencing. Science Public Health Policy & the Law 4:144-189. https://www.publichealthpolicyjournal.com/about-7.

Liu, D.X., Liang, J.Q. & Fung, T.S. (2021). Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). Encyclopedia Virology, pp428–440. 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). Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. Lancet 395:565–574. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

Lyons-Weiler, J. (2021). Balance of risk in COVID-19 reveals the extreme cost of false positives. International Journal of Vaccine Theory Practice and Research 1:209–222. https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v1i2.15.

Mendoza, E.J., Manguiat, K., Wood, H. & Drebot, M. (2020). Two detailed plaque assay protocols for the quantification of infectious SARS-CoV-2. Current Protocols in Microbiology 57:ecpmc105. https://doi.org/10.1002/cpmc.105.

Miao, Z., Tidu, A., Eriani, G. & Martin, F. (2021). Secondary structure of the SARS-CoV-2 5'-UTR. RNA Biology 18:447-456. https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1814556.

Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Moghbeli, S.M., Rahimirad, S., Alanazi, I.O., Shehri, Z.S.A. & Ebrahimie, E.A. (2021). Transcription regulatory sequence in the 5′ untranslated region of SARS-CoV-2 is vital for virus replication with an altered evolutionary pattern against human inhibitory microRNAs. Cells 10:319. https://doi.org/10.3390/cells10020319.

Muenchhoff, M., Mairhofer, H., Nitschko, H., Grzimek-Koschewa, N., Hoffmann, D., Berger, A. et al. (2020). Multicentre comparison of quantitative PCR-based assays to detect SARS-CoV-2, Germany, March 2020. Eurosurveillance 5:pii=2001057. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.24.2001057.

Mullis, K.B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. Annales de Biologie Clinique 48:579-582. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2288446/.Muth, D., Corman, V.M., Roth, H. et al. (2018). Attenuation of replication by a 29 nucleotide deletion in SARS- coronavirus acquired during the early stages of human-to-human transmission. Scientific Reports 8:15177. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33487-8.

National Centre for Infectious Diseases and the Chapter of Infectious Disease Physicians, Academy of Medicine, Singapore. (23 May 2020). Available online: https://www.ncid.sg/Documents/Period %20of%20Infectivity%20Position%20Statementv2.pdf.

New York Times. (22 Jan 2007). https://www.nytimes.com/2007/01/22/health/22whoop.html. NIH. BEI Resources Repository. https://www.niaid.nih.gov/research/bei-resources-repository.

Okba, N.M.A., Müller, M.A., Li, W., Wang, C., Geurtsvan-Kessel. C,H, Corman, V.M. et al. (2020) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease patients. Emerging Infectious Diseases 26:1478-1488. https://doi.org/10.3201/eid2607.200841.

Ong, S.W.X., Chia, T. & Young, B.E. (2022). SARS-CoV-2 variants of concern and vaccine escape, from alpha to omicron and beyond. Expert Review of Respiratory Medicine 16. https://doi.org/10.1080/17476348.2022.2057299.

Osorio, N.S. & Correia-Neves, M. (2020). Implication of SARS-CoV-2 evolution in the sensitivity of RT-qPCR diagnostic assays. Lancet Infectious Diseases 28:166-167. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30435-7.

Our World in Data. 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). Estimate false-negative RT-PCR rates for SARS-CoV-2. A systematic review and meta-analysis. European Journal of Clinical Investigation 52:e13706. https://doi.org/10.1111/eci.13706.

Penarrubia, L., Ruiz, M., Porco, R., Rao, S.N., Juanola-Falgarona, M., Manissero, D., López-Fontanals, M & Pareja, J. (2020). Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. International Journal of Infectious Diseases 97:225-229. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.027.

Perez, D.R. (2017). Reverse Genetics of RNA Viruses: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology 1602. Humana Press. ISBN: 978-1-4939-6964-7. https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4939-6964-7.pdf

Perez, J.C., Moret-Chalmin, C., & Montagnier, L. (2023). Emergence of a new Creutzfeldt-Jakob Disease: 26 cases of the human version of Mad-Cow Disease, a few days after a COVID-19 injection. 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, K.F., Sagadin, M., Uršič, T., et al. (2020). Clinical evaluation of the Cobas SARS-CoV-2 test and a diagnostic platform switch during 48 hours in the midst of the COVID-19 pandemic. Journal of Clinical Microbiology 58:e00599-20. https://doi.org/10.1128/JCM.00599-20.

Puhach, O., Meyer, B. & Eckerle, I. (2022). SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. Nature Reviews Microbiology 21:147–161. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w.

Ren, L.L., Wang, Y.M., Wu, Z.Q., Xiang, Z.C., Guo, L., Xu, T. et al. (2020). Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. Chinese Medical Journal 133:1015–1024. https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000722.

Reusken, C., Broberg, E.K., Haagmans, B., Meijer, A., Corman, V.M., Papa, A. et al. (2020). Laboratory readiness and response for novel coronavirus (2019-nCoV) in expert laboratories in 30 EU/EEA countries, January 2020. Eurosurveillance 25:2000082. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000082.

Reuters. (31 Dec 2019). https://www.reuters.com/article/us-china-health-pneumonia-idUSKBN1YZ0GP.Risi, G. F., Bloom, M. E., Hoe, N. P., Arminio, T., Carlson, P., Powers, T., Feldmann, H., & Wilson, D. (2010).

Preparing a Community Hospital to Manage Work-related Exposures to Infectious Agents in Bio Safety Level 3 and 4 Laboratories. Emerging Infectious Diseases, *16*(3), 373–378. https://doi.org/10.3201/eid1603.091485

Skittrall, J.P., Wilson, M., Smielewska, A.A., Parmar, S., Fortune, M.D., Sparkes, D., Curran, M.D., Zhang, H. & Jalal,

H. (2020). Specificity and positive predictive value of SARS-CoV-2 nucleic acid amplification testing in a low prevalence setting. Clinical Microbiology & Infection 14:S1198-743X(20)30614-5. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.10.003

Stang, A., Robers, J., Schonert, B., Jöckel, K.H., Spelsberg, A., Keil, U. & Cullen, P. (2021). The performance of the SARS-CoV-2 RT-PCR test as a tool for detecting SARS-CoV-2 infection in the population. Journal of Infection 83:237-279. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.05.022

Struyf, T., Deeks, J.J., Dinnes, J., Takwoingi, Y., Davenport, C., Leeflang, M.M. et al. (2020). Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19 disease. Cochrane Database Systematic Reviews 7:CD013665. https://doi.org/10.1002/14651858.CD013665.

Sun, Y., Lin, W., Dong, W. & Xu, J. (2022). Origin and evolutionary analysis of the SARS-CoV-2 Omicron variat.

Journal of Biosafety and Biosecurity 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. (2a020). Notes from the field: a novel coronavirus genome identified in a cluster of pneumonia cases — Wuhan, China 2019−2020. China CDC Weekly 2:61-62. https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.017.

Tao, Y., Yue, Y., Qiu, G., Ji, Z., Spillman, M., Gai, Z. et al. (2022). Comparison of analytical sensitivity and efficiency for SARS-CoV-2 primer sets by TaqMan-based and SYBR Green-based RT-qPCR.

Applied Microbiology and Biotechnology 106:2207-2218. https://doi.org/10.1007/s00253-022-11822-4.

Tib Molbiol. Instructions for use. LightMix® Modular Wuhan CoV RdRP-gene. Cat.-No. 53-0777-96. https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_53-0777_96_Wuhan-R-gene_V200204_09155376001%20%282%29.pdf.

The Open Science Prize, Nextstrain: Real-time tracking of pathogen evolution. Genomic epidemiology of novel coronavirus. 2020. https://nextstrain.org/ncov.

Verna, R., Alallon, W., Murakami, M., Hayward, C.P.M., Harrath, A.H., Alwasel, S.H. et al. (2021). Analytical performance of COVID-19 detection methods (RT-PCR): scientific and societal concerns. Life 11:660-676. https://doi.org/10.3390/life11070660.

Wernike, K., Keller, M., Conraths, F.J., Mettenleiter, T.C., Groschup, M.H. & Beer, M. (2020). Pitfalls in SARS-CoV-2 PCR diagnostics. Transboundary & Emerging Diseases 14:10.1111/tbed.13684. https://doi.org/10.1111/tbed.13684.

WHO. (2003) Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS). [Original link https://www.who.int/csr/sars/en/WHOconsensus.pdf has been transferred to https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70863/WHO_CDS_CSR_GAR_2003.11_eng.pdf].

WHO. (13 Jan 2020). https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay- v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf ?sfvrsn=d381fc88_2.

WHO. (30 Jan 2020). https://www.paho.org/en/news/30-1-2020-who-declares-public-health-emergency-novel- coronavirus.

WHO. (28 Feb 2020). https://www.who.int/publications/i/item/report-of-the-who-china-joint-mission-on- coronavirus-disease-2019-(COVID-19).

WHO. (2 Mar 2020). Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331329/WHO-COVID-19-laboratory-2020.4- eng.pdf ?sequence=1&isAllowed=y.

WHO. (11 Mar 2020). https://www.paho.org/en/news/11-3-2020-who-characterizes-COVID-19-pandemic.

WHO. (16 Mar 2020). https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-COVID-19---------16-march-2020.

WHO. (19 Mar 2020). Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases. https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501.

WHO. (8 Jan 2021). Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health. https://www.who.int/publications/i/item/9789240018440.

WHO. (20 Jan 2021). Information Notice for Users 2020/05: Nucleic acid testing (NAT) technologies that use polymerase chain reaction (PCR) for detection of SARS-CoV-2. https://www.who.int/news/item/20-01-2021- who-information-notice-for-ivd-users-2020-05.

WHO. (24 Jan 2021) https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf. [Original link https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf has been removed, as on 24 Jan 2021, WHO summarized individual protocols in one pdf-file with the original Charité protocol from 17 Jan 2020 located at pages 60-72].

Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M.A. et al. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with Covid-2019. Nature 581:465–469. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x.

Yang, D. & Leibowitz, J.L. (2015). The structure and functions of coronavirus genomic 3´and 5´ ends. Virus Research 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. & Zwirglmaier, K. (2022). In vitro evaluation of the effect of mutations in primer binding sites on detection of SARS-CoV-2 by RT-qPCR. Journal of Virological Methods 299:114352. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114352.

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J. et al. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. New England Journal of Medicine 382:727-733. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017.