

Externer Peer-Review des RTPCR-Tests zum Nachweis von SARS-CoV-2 zeigt 10 wesentliche wissenschaftliche Mängel auf molekularer und methodischer Ebene: Folgen für falsch positive Ergebnisse.

Pieter Borger^{1*}, Rajesh K. Malhotra², Michael Yeadon³, Clare Craig⁴, Kevin McKernan⁵
Klaus Steger⁶, Paul McSheehy⁷, Lidiya Angelova⁸, Fabio Franchi⁹, Thomas Binder¹⁰ Henrik Ullrich¹¹, Makoto Ohashi¹², Stefano Scoglio¹³, Marjolein Doesburg-van Kleffens¹⁴
Dorothea Gilbert¹⁵, Rainer J. Klement¹⁶, Ruth Schrufer¹⁷, Berber W. Pieksma¹⁸, Jan Bonte¹⁹, Bruno H. Dalle Carbonara²⁰, Kevin P. Corbett²¹, Ulrike Kämmerer²².

* Korrespondierender Autor

ABSTRACT

In der Veröffentlichung mit dem Titel "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR" (Eurosurveillance 25(8) 2020) stellen die Autoren einen diagnostischen Arbeitsablauf und ein RT-qPCR-Protokoll für den Nachweis und die Diagnose von 2019-nCoV (jetzt bekannt als SARS-CoV-2) vor, das sie als validiert und als *robuste Diagnosemethode für den Einsatz in Laboratorien des öffentlichen Gesundheitswesens* bezeichnen.

In Anbetracht der Konsequenzen, die sich aus dieser Veröffentlichung für die Gesellschaften weltweit ergeben, hat eine Gruppe unabhängiger Wissenschaftler die genannte Veröffentlichung Punkt für Punkt überprüft, und zwar

- 1) Alle Komponenten des vorgestellten Testdesigns wurden einer Gegenprüfung unterzogen,
- 2) die RT-qPCR-Protokoll-Empfehlungen wurden im Hinblick auf die gute Laborpraxis bewertet und 3) die Parameter wurden anhand der einschlägigen wissenschaftlichen Literatur auf diesem Gebiet überprüft.

Das veröffentlichte RT-qPCR-Protokoll zum Nachweis und zur Diagnose von 2019-nCoV und das Manuskript weisen zahlreiche technische und wissenschaftliche Fehler auf, darunter ein unzureichendes Primerdesign, ein problematisches und unzureichendes RT-qPCR-Protokoll und das Fehlen einer genauen Testvalidierung. Weder der vorgestellte Test noch das Manuskript selbst erfüllen die Anforderungen an eine akzeptable wissenschaftliche Veröffentlichung. Außerdem werden schwerwiegende Interessenkonflikte der Autoren nicht erwähnt. Schließlich deutet die sehr kurze Zeitspanne zwischen Einreichung und Annahme der Publikation (24 Stunden) darauf hin, dass hier entweder kein systematisches Peer-Review-Verfahren durchgeführt wurde oder dieses von problematisch schlechter Qualität ist.

Wir liefern zwingende Beweise für mehrere wissenschaftliche Unzulänglichkeiten, Fehler und

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Mängel. In Anbetracht der hier dargelegten wissenschaftlichen und methodischen Mängel sind wir zuversichtlich, dass der Redaktionsausschuss von Eurosurveillance keine andere Wahl hat, als die Veröffentlichung zurückzuziehen.

ZUSAMMENFASSENDE PRÜFUNGSBERICHT

In diesem Beitrag werden zahlreiche schwerwiegende Fehler im Corman-Drosten-Papier aufgezeigt, deren Bedeutung zu weltweiten Fehldiagnosen von Infektionen geführt hat, die SARS-CoV-2 zugeschrieben und mit der Krankheit COVID-19 in Verbindung gebracht werden. Wir sind mit strengen Abriegelungsmaßnahmen konfrontiert, die das Leben und die Lebensgrundlage vieler Menschen zerstört haben, den Zugang zu Bildung einschränken und diese

Die von Regierungen auf der ganzen Welt auferlegten Beschränkungen sind ein direkter Angriff auf die Grundrechte der Menschen und ihre persönlichen Freiheiten, was zu Kollateralschäden für ganze Volkswirtschaften auf globaler Ebene führt.

Es gibt zehn fatale Probleme mit dem Corman-Drosten-Papier, die wir in den folgenden Abschnitten skizzieren und näher erläutern werden.

Das erste und wichtigste Problem ist, dass das *neuartige* Coronavirus SARS-CoV-2 (in der Veröffentlichung als 2019-nCoV und im Februar 2020 von einem internationalen Konsortium von Virusexperten als SARS-CoV-2 bezeichnet) auf *in silico* (theoretischen) Sequenzen basiert, die von einem Labor in China geliefert wurden [1], da den Autoren zum damaligen Zeitpunkt weder Kontrollmaterial von infektiösem ("lebendem") oder inaktiviertem SARS-CoV-2 noch isolierte genomische RNA des Virus zur Verfügung stand. Bis heute wurde von der Autorenschaft keine Validierung auf der Basis von isolierten SARS-CoV-2-Viren oder deren Vollängen-RNA durchgeführt.

Corman et al. zufolge: "*Unser Ziel war es, eine robuste Diagnosemethode für den Einsatz in Labors des öffentlichen Gesundheitswesens zu entwickeln und einzusetzen, ohne dass Virusmaterial zur Verfügung steht.*" [1]

Das Hauptaugenmerk sollte dabei auf den beiden genannten Zielen liegen: a) *Entwicklung* und b) *Einsatz eines diagnostischen Tests für den Einsatz in Labors des öffentlichen Gesundheitswesens*. Diese Ziele können nicht erreicht werden, ohne dass tatsächlich Virusmaterial zur Verfügung steht (z. B. zur Bestimmung der infektiösen Viruslast). In jedem Fall kann bei einem Szenario dieser Größenordnung nur ein Protokoll mit maximaler Genauigkeit das verbindliche und vorrangige Ziel sein. Die Bestimmung der kritischen Viruslast ist eine Pflichtinformation, und es liegt in der Verantwortung der Gruppe von

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Christian Drosten, diese Experimente durchzuführen und die entscheidenden Daten zu liefern.

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Dennoch wurden diese In-silico-Sequenzen verwendet, um eine RT-PCR-Testmethode zur Identifizierung des besagten Virus zu entwickeln. Dieses Modell basierte auf der Annahme, dass das *neue* Virus dem SARS-CoV aus dem Jahr 2003 (im Folgenden SARS-CoV-1 genannt) sehr ähnlich ist, da es sich bei beiden um Beta-Coronaviren handelt.

Der PCR-Test wurde daher unter Verwendung der genomischen Sequenz von SARS-CoV-1 als Kontrollmaterial für die Sarbeco-Komponente entwickelt; dies wissen wir aus unserem persönlichen E-Mail-Verkehr mit [2], einem der Mitautoren der Corman-Drosten-Arbeit. Diese Methode zur Modellierung von SARS-CoV-2 wurde in der Arbeit von Corman-Drosten wie folgt beschrieben:

"die Entwicklung und Validierung eines diagnostischen Arbeitsablaufs für das 2019-nCoV-Screening und die spezifische Bestätigung, der in Ermangelung verfügbarer Virusisolate oder Originalproben von Patienten entwickelt wurde. Design und Validierung wurden durch die enge genetische Verwandtschaft mit dem SARS-CoV von 2003 ermöglicht und durch den Einsatz der synthetischen Nukleinsäuretechnologie unterstützt.

Kurz gesagt, ein Design, das sich lediglich auf nahe genetische Verwandte stützt, erfüllt nicht das Ziel eines "robusten diagnostischen Tests", da Kreuzreaktivität und damit falsch-positive Ergebnisse unvermeidlich sind.

Die Validierung erfolgte nur in Bezug auf (theoretische) In-silico-Sequenzen und im Labor und nicht, wie für die In-vitro-Diagnostik erforderlich, mit isolierter genomischer viraler RNA. An dieser Tatsache hat sich auch 10 Monate nach Einführung des Tests in die Routinediagnostik nichts geändert.

Es gibt zahlreiche weitere schwerwiegende wissenschaftliche Fehler in Bezug auf das biomolekulare Design der Primer, die PCR-Methode sowie die molekulare Validierung der im Corman-Drosten-Papier beschriebenen PCR-Produkte und -Methoden, die in den folgenden Kapiteln im Detail untersucht werden. Die Arbeit selbst weist bereits darauf hin, dass dieser Test auch unter kontrollierten Laborbedingungen eine große Anzahl falsch positiver Ergebnisse liefert, was ihn als zuverlässige Virus-Screening-Methode für ganze Populationen in einer laufenden Pandemie völlig ungeeignet macht. In Anbetracht der weitreichenden Folgen, einschließlich Quarantänemaßnahmen, Abriegelungen, Ausgangssperren und Auswirkungen auf das Bildungswesen usw., muss dieses Papier sofort zurückgezogen werden.

ENTWURF UND FEHLER in der RT-PCR

Die Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine wichtige biomolekulare Technologie zum schnellen Nachweis seltener RNA-Fragmente, die im Voraus bekannt sind. In einem ersten Schritt werden die in der Probe vorhandenen RNA-Moleküle revers transkribiert, um cDNA zu erhalten. Die cDNA wird dann in der Polymerase-Kettenreaktion mit Hilfe eines spezifischen Primerpaars und eines thermostabilen DNA-Polymerase-Enzyms amplifiziert. Die Technologie ist sehr empfindlich und ihre Nachweisgrenze liegt theoretisch bei 1 Molekül cDNA. Die Spezifität der PCR wird durch Fehler im biomolekularen Design stark beeinflusst.

Was ist bei der Entwicklung eines RT-PCR-Tests und des in der Corman-Drosten-Veröffentlichung beschriebenen quantitativen RT-qPCR-Tests wichtig?

1. Die Primer und Sonden:
 - a) die Konzentration der Primer und Sonden muss im optimalen Bereich liegen (100-200 nM)
 - b) muss spezifisch für das Zielgen sein, das Sie amplifizieren wollen
 - c) muss einen optimalen prozentualen Anteil an GC-Gehalt im Verhältnis zu den gesamten stickstoffhaltigen Basen aufweisen (mindestens 40%, höchstens 60%)
 - d) für die Virusdiagnostik müssen mindestens 3 Primerpaare 3 virale Gene nachweisen (vorzugsweise möglichst weit voneinander entfernt im viralen Genom)
2. Die Temperatur, bei der alle Reaktionen ablaufen:
 - a) DNA-Schmelztemperatur (>92°)
 - b) DNA-Amplifikationstemperatur (TaqPol-spezifisch)
 - c) T_m; die Annealing-Temperatur (die Temperatur, bei der die Primer und Sonden die Zielbindung/-ablösung erreichen, nicht mehr als 2°C pro Primerpaar).
T_m hängt stark vom GC-Gehalt der Primer ab
3. Die Anzahl der Amplifikationszyklen (weniger als 35; vorzugsweise 25-30 Zyklen);
beim Virusnachweis werden bei >35 Zyklen nur Signale erkannt, die nicht mit infektiösen Viren korrelieren, wie sie durch Isolierung in Zellkulturen bestimmt werden [siehe 2]; wenn jemand durch PCR als positiv getestet wird, wenn ein Schwellenwert von 35 Zyklen oder höher verwendet wird (wie es in den meisten Labors in Europa und den USA der Fall ist), beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass die

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

betreffende Person tatsächlich infiziert ist, weniger als 3 %, die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Ergebnis um ein falsches Positiv handelt, 97 %.

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

[geprüft in 3]

4. Molekularbiologische Validierung; amplifizierte PCR-Produkte müssen entweder durch Ausführen der Produkte in einem Gel mit einem DNA-Lineal oder durch direkte DNA-Sequenzierung validiert werden
5. Es sollten Positiv- und Negativkontrollen angegeben werden, um den spezifischen Virusnachweis zu bestätigen bzw. zu widerlegen.
6. Es sollte ein Standardarbeitsverfahren (SOP) zur Verfügung stehen, in dem die oben genannten Parameter eindeutig festgelegt sind, so dass alle Laboratorien in der Lage sind, genau die gleichen Testbedingungen einzurichten. Eine validierte, universelle SOP ist unerlässlich, da sie den Vergleich von Daten innerhalb und zwischen Ländern ermöglicht.

GERINGFÜGIGE BEDENKEN GEGEN DAS CORMAN-DROSTEN-PAPIER

1. In Tabelle 1 des Corman-Drosten-Papiers sind unterschiedliche Abkürzungen angegeben - "nM" ist angegeben, "nm" nicht. Was die korrekte Nomenklatur angeht, so bedeutet nm "Nanometer", daher sollte hier nM stehen.
2. Es ist allgemeiner Konsens, genetische Sequenzen immer in 5'-3'-Richtung zu schreiben, auch die umgekehrten Primer. Es ist höchst unüblich, ein Alignment mit umgekehrter komplementärer Schreibweise der Primer-Sequenz durchzuführen, wie es die Autoren in Abbildung 2 der Corman-Drosten-Arbeit getan haben. Hier wird außerdem eine Wobble-Base als "y" gekennzeichnet, ohne dass die Basen, für die das Y steht, beschrieben werden.
3. Zwei irreführende Fallstricke im Corman-Drosten-Papier sind, dass ihre Tabelle 1 weder T_m-Werte (Glühtemperaturwerte) noch GC-Werte (Anzahl der G- und C-Basen in den Sequenzen als %-Wert der Gesamtbasen) enthält.

HAUPTBEDENKEN GEGEN DAS CORMAN-DROSTEN-PAPIER

A) HINTERGRUND

Die Autoren erläutern den Hintergrund ihrer wissenschaftlichen Arbeit wie folgt: "*Der anhaltende Ausbruch des kürzlich aufgetretenen neuartigen Coronavirus (2019-nCoV) stellt eine Herausforderung für die Laboratorien des öffentlichen Gesundheitswesens dar, da Virusisolate nicht verfügbar sind, während sich die Anzeichen verdichten, dass der Ausbruch weiter verbreitet ist als ursprünglich angenommen und die internationale Verbreitung durch Reisende gibt es bereits*".

Laut BBC News [4] und Google Statistics [5] gab es am 21. Januar 2020 - dem Tag, an dem das Manuskript eingereicht wurde - weltweit 6 Todesfälle. Warum gingen die Autoren von einer Herausforderung für die Labore des öffentlichen Gesundheitswesens aus, obwohl es zu diesem Zeitpunkt keine stichhaltigen Beweise dafür gab, dass der Ausbruch weiter verbreitet war als ursprünglich angenommen?

Als Ziel erklärten die Autoren, eine robuste Diagnosemethode für den Einsatz in Laboratorien des öffentlichen Gesundheitswesens zu entwickeln und einzusetzen, ohne über Virusmaterial zu verfügen. Die vorliegende Studie zeigt die enorme Reaktionsfähigkeit, die durch die Koordinierung von akademischen und öffentlichen Laboratorien in nationalen und europäischen Forschungsnetzwerken erreicht werden kann".

B) Methoden und Ergebnisse

1. Primer- und Sondendesign

1a) Falsche Primer-Konzentrationen

Zuverlässige und genaue PCR-Testprotokolle werden normalerweise mit 100 nM bis 200 nM pro Primer erstellt [7]. In der Arbeit von Corman-Drosten wurden ungewöhnlich hohe und variierende Primerkonzentrationen für mehrere Primer beobachtet (Tabelle 1). Für die Primerpaare RdRp_SARSr-F und RdRp_SARSr- R werden 600 nM bzw. 800 nM beschrieben. Auch für die Primerpaare N_Sarbeco_F und N_Sarbeco_R werden 600 nM bzw. 800 nM angegeben [1]. Es sollte klar sein, dass diese Konzentrationen viel zu hoch sind, um für spezifische Amplifikationen von Zielgenen optimal zu sein. *Es gibt keinen spezifischen Grund*

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

für die Verwendung dieser extrem hohen

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Konzentrationen der Primer in diesem Protokoll. Vielmehr führen diese Konzentrationen zu einer erhöhten unspezifischen Bindung und PCR-Produktamplifikation.

Tabelle 1: Primer und Sonden (nach Corman-Drosten; fehlerhafte Primerkonzentrationen sind hervorgehoben)

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence ^a	Concentration ^b
RdRP gene	RdRp_SARsR-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARsR-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV. Use 100 nM per reaction and mix with P1
	RdRp_SARsR-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs. Use 100 nM per reaction and mix with P2
	RdRp_SARsR-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	Use 800 nM per reaction
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 400 nM per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 200 nM per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 400 nM per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Use 600 nM per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 200 nM per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 800 nM per reaction

^a W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C. FAM: 6-carboxyfluorescein; BBQ: blackberry quencher.
^b Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µL of a 10 µM primer stock solution per 25 µL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

1b) Nicht spezifizierte ("wackelige") Primer- und Sondensequenzen

Um reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es unerlässlich, die Primerpaare eindeutig zu definieren. In der Arbeit von Corman-Drosten wurden sechs nicht spezifizierte Positionen beobachtet, die mit den Buchstaben R, W, M und S gekennzeichnet sind (Tabelle 2). Der Buchstabe W bedeutet, dass an dieser Position entweder ein A oder ein T stehen kann; R bedeutet, dass dort entweder ein G oder ein A stehen kann; M bedeutet, dass an dieser Position entweder ein A oder ein C stehen kann; der Buchstabe S bedeutet, dass an dieser Position entweder ein G oder ein C stehen kann.

Diese hohe Anzahl von Varianten ist nicht nur ungewöhnlich, sondern auch sehr verwirrend für die Labors. Diese sechs nicht spezifizierten Positionen könnten leicht dazu führen, dass mehrere verschiedene alternative Primersequenzen entworfen werden, die sich nicht auf SARS-CoV-2 beziehen (2 verschiedene RdRp_SARsR_F-Primer + 8 verschiedene RdRp_SARsR_P1-Sonden + 4 verschiedene RdRp_SARsR_R). Die Designvariationen führen unweigerlich zu Ergebnissen, die nicht einmal mit SARS-CoV-2 in Verbindung stehen.

Daher ist die verwirrende, unspezifische Beschreibung im Corman-Drosten-Papier nicht als operationelles Standardprotokoll geeignet. Diese unbestimmten Positionen hätten eindeutig gestaltet werden müssen.

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Diese wackeligen Sequenzen haben in der Fachwelt bereits Besorgnis erregt und zu einem Leserbrief von Pillonel *et al.* [8] geführt, in dem auf eklatante Fehler in den beschriebenen Sequenzen hingewiesen wird. Diese Fehler sind auch in der Beilage von Corman *et al.* offensichtlich.

Tabelle 2: Primer und Sonden (nach Corman-Drosten; nicht spezifizierte ("Wobbly") Nukleotide in den Primern sind hervorgehoben)

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence ^a	Concentration ^b
RdRP gene	RdRp_SARsR-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARsR-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV. Use 100 nM per reaction and mix with P1
	RdRp_SARsR-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs. Use 100 nM per reaction and mix with P2
	RdRp_SARsR-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	Use 800 nM per reaction
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 400 nm per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 200 nm per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 400 nm per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Use 600 nm per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 200 nm per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 800 nm per reaction

W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C. FAM: 6-carboxyfluorescein; BBQ: blackberry quencher.
^b Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µL of a 10 µM primer stock solution per 25 µL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

Das WHO-Protokoll (Abbildung 1), das sich direkt aus dem Corman-Drosten-Papier ableitet, kommt zu dem Schluss, dass zur Bestätigung des Vorhandenseins von SARS-CoV-2 zwei Kontrollgene (das E- und das RdRp-Gen) im Assay identifiziert werden müssen. Es ist zu beachten, dass das RdRp-Gen eine unsichere Position ("wobbly") im Vorwärts-Primer (R=G/A), zwei unsichere Positionen im Rückwärts-Primer (R=G/A; S=G/C) und drei unsichere Positionen in der RdRp-Sonde (W=A/T; R=G/A; M=A/C) hat. Es können also zwei verschiedene Vorwärtsprimer, vier verschiedene Rückwärtsprimer und acht verschiedene Sonden für das RdRp-Gen synthetisiert werden. Insgesamt gibt es 64 mögliche Kombinationen von Primern und Sonden!

In dem Papier von Corman-Drosten wird außerdem ein drittes Gen genannt, das nach dem WHO-Protokoll nicht weiter validiert und für unnötig gehalten wurde: *"Bemerkenswert ist, dass der N-Gen-Assay ebenfalls gute Ergebnisse lieferte, aber nicht weiter intensiv validiert wurde, weil er etwas weniger empfindlich war."*

Dies war eine unglückliche Auslassung, da es am besten wäre, alle drei Gen-PCRs als

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Bestätigungsassays, und dies hätte zu einem nahezu ausreichenden Protokoll für ein diagnostisches Werkzeug zum Nachweis von Virus-RNA geführt. Drei bestätigende Assay-Schritte würden zumindest die Fehler und Unsicherheiten bei jedem einzelnen Schritt in Bezug auf "Wobbly"-Spots minimieren. (Nichtsdestotrotz würde das Protokoll immer noch nicht der "guten Laborpraxis" entsprechen, wenn man alle anderen Design-Fehler berücksichtigt).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird der N-Genestest bedauerlicherweise weder in der WHO-Empfehlung (Abbildung 1) als obligatorischer und entscheidender dritter Bestätigungsschritt vorgeschlagen, noch wird er im Corman-Drosten-Papier als wichtige optionale Bestätigung "für einen Routine-Arbeitsablauf" hervorgehoben (Tabelle 2).

Folglich wurden bei fast allen Testverfahren weltweit nur 2 Primer-Matches statt aller drei verwendet. Dieses Versehen macht das gesamte Testprotokoll unbrauchbar, wenn es darum geht, genaue Testergebnisse zu liefern, die in einer laufenden Pandemie wirklich von Bedeutung sind.

Background

We used known SARS- and SARS-related coronaviruses (bat viruses from our own studies as well as literature sources) to generate a non-redundant alignment (excerpts shown in Annex). We designed candidate diagnostic RT-PCR assays before release of the first sequence of 2019-nCoV. Upon sequence release, the following assays were selected based on their matching to 2019-nCoV as per inspection of the sequence alignment and initial evaluation (Figures 1 and 2).

All assays can use SARS-CoV genomic RNA as positive control. Synthetic control RNA for 2019-nCoV E gene assay is available via EVAg. Synthetic control for 2019-nCoV RdRp is expected to be available via EVAg from Jan 21st onward.

**First line screening assay: E gene assay
Confirmatory assay: RdRp gene assay**

Abbildung 1: Der N-Genestest wird weder in der offiziellen WHO Drosten-Corman-Protokoll-Empfehlung [8] als notwendiger dritter Schritt hervorgehoben, noch wird er in der Eurosurveillance-Publikation als entscheidender Schritt für eine höhere Test-Genauigkeit gefordert.

1c) Falscher GC-Gehalt (unter 2c erörtert, zusammen mit der Annealing-Temperatur

(T_m)) 1d) Nachweis von viralen Genen

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Die RT-PCR wird für die Primärdiagnostik von Infektionen nicht empfohlen. Deshalb ist der RT-PCR-Test

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

das in der klinischen Routine zum Nachweis von COVID-19 verwendet wird, ist aus rechtlichen Gründen nicht für die COVID-19-Diagnose geeignet.

"Kliniker müssen die verbesserte Genauigkeit und Geschwindigkeit der molekularen Diagnosetechniken für die Diagnose von Infektionen anerkennen, aber auch ihre Grenzen verstehen. Laborergebnisse sollten immer im Zusammenhang mit dem klinischen Bild des Patienten interpretiert werden, und für einen zuverlässigen Test müssen Ort, Qualität und Zeitpunkt der Probenentnahme angemessen sein.

Ergebnisse". [9]

Er kann jedoch dem Arzt bei der Differenzialdiagnose helfen, wenn er zwischen verschiedenen Infektionen der Lunge unterscheiden muss (Grippe, Covid-19 und SARS haben sehr ähnliche Symptome). Für eine bestätigende Diagnose eines bestimmten Virus müssen mindestens 3 spezifische Primerpaare zum Nachweis von 3 virusspezifischen Genen verwendet werden. Vorzugsweise sollten sich diese Zielgene in möglichst großem Abstand im viralen Genom befinden (einschließlich der entgegengesetzten Enden). Obwohl in der Arbeit von Corman-Drosten 3 Primer beschrieben werden, decken diese Primer nur etwa die Hälfte des Virusgenoms ab. Dies ist ein weiterer Faktor, der die Spezifität für den Nachweis von intakter COVID-19-Virus-RNA verringert und die Quote falsch positiver Testergebnisse erhöht.

Selbst wenn wir in einer Probe drei positive Signale erhalten (d. h. die drei Primerpaare ergeben drei verschiedene Amplifikationsprodukte), ist dies kein Beweis für das Vorhandensein eines Virus. Ein besseres Primerdesign würde terminale Primer an beiden Enden des viralen Genoms aufweisen. Dies liegt daran, dass das gesamte virale Genom abgedeckt wäre und drei positive Signale besser zwischen einem vollständigen (und damit potenziell infektiösen) Virus und fragmentierten viralen Genomen (ohne infektiöse Potenz) unterschieden werden können. Um auf die Infektiosität des Virus schließen zu können, hätte das Orf1-Gen, das für das essentielle Replikase-Enzym der Viren SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 kodiert, als Ziel aufgenommen werden müssen (Abbildung 2). Die Positionierung der Targets in der Region des viralen Genoms, die am stärksten und variabelsten transkribiert wird, ist ein weiterer Schwachpunkt des Protokolls.

Kim *et al.* zeigen eine hochvariable 3'-Expression von subgenomischer RNA in Sars-CoV-2 [23]. Diese RNAs werden aktiv als Signaturen für asymptomatische und nicht-infektiöse Patienten überwacht [10]. Es ist höchst fragwürdig, eine Population asymptomatischer

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Menschen mit qPCR-Primern zu screenen, die 6 Basenpaare Primer-Dimer am 3-Prime-Ende eines Primers aufweisen (Abbildung 3). Offenbar empfiehlt die WHO diese Primer. Wir testeten alle Wobble-Derivate von

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

dem Corman-Drosten-Papier mit dem Primer-Dimer-Webtool von ThermoFisher [11]. Der RdRp-Vorwärtsprimer hat 6bp 3-Prime-Homologie mit Sarbeco E Reverse. Bei hohen Primer-Konzentrationen reicht dies aus, um Ungenauigkeiten zu erzeugen.

Bemerkenswert: Es gibt eine perfekte Übereinstimmung eines der N-Primer mit einem klinischen Erreger (*Pantoea*), der bei immungeschwächten Patienten vorkommt. Der umgekehrte Primer trifft ebenfalls auf *Pantoea*, allerdings nicht in der gleichen Region (Abbildung 3).

Dies sind schwerwiegende Konstruktionsfehler, da der Test nicht zwischen dem ganzen Virus und viralen Fragmenten unterscheiden kann. Der Test kann nicht als Diagnose für SARS-CoV-2-Viren verwendet werden.

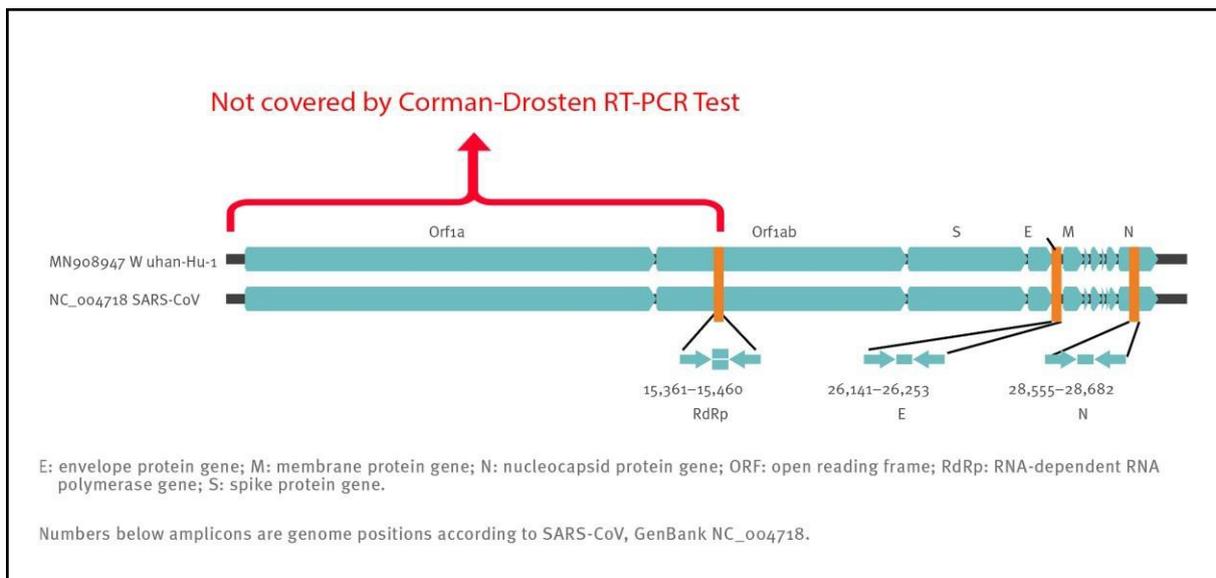


Abbildung 2: Relative Positionen der Amplikonziele auf dem SARS-CoV-1-Coronavirus und dem Genom des neuen Coronavirus 2019. ORF: offener Leserahmen; RdRp: RNA-abhängige RNA-Polymerase. Die Zahlen unter dem Amplikon sind Genompositionen nach SARS-CoV-1, NC_004718 [1];

Cross Primer Dimers:

Corman_RdRp_SARs_F1 with Corman_E_Sarbeco_R
Corman_RdRp_SARs_F1
5-gtgaatggtcatgtgtggcgg->
|||||
<-acacacgcatgacgacgttata-5

Corman_RdRp_SARs_F2 with Corman_E_Sarbeco_R
Corman_RdRp_SARs_F2
5-gtgagatggtcatgtgtggcgg->
|||||
<-acacacgcatgacgacgttata-5

> **Corman_N_Sarbeco_F**
CACATTGGCACCCGCAATC

Pantoea agglomerans strain ASB05 chromosome, complete genome
Sequence ID: [CP046722.1](#) Length: 4022781 Number of Matches: 2

Range 1: 2326019 to 2326037 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
38.2 bits(19)	2.2	19/19(100%)	0/19(0%)	Plus/Plus

Query 1 CACATTGGCACCCGCAATC 19
|||||
Sbjct 2326019 CACATTGGCACCCGCAATC 2326037

Abbildung 3: Ein Test mit dem Primer-Dimer-Webtool von Thermofischer zeigt, dass der RdRp-Vorwärtsprimer eine 6bp 3`Prime-Homologie mit Sarbeco E Reverse aufweist (linker Kasten). Ein weiterer Test zeigt, dass es eine perfekte Übereinstimmung für einen der N-Primer mit einem klinischen Erreger (*Pantoea*) gibt, der bei immungeschwächten Patienten gefunden wird (rechter Kasten).

2. Reaktionstemperaturen

2a) Schmelztemperatur der DNA (>92°).

In dem Corman-Drosten-Papier wird dies hinreichend behandelt.

2b) DNA-Amplifikationstemperatur.

In dem Corman-Drosten-Papier wird dies hinreichend behandelt.

2c) Falsche GC-Gehalte und Tm

Die Annealing-Temperatur bestimmt, bei welcher Temperatur sich der Primer an die Zielsequenz anlagert bzw. von ihr ablöst. Für eine effiziente und spezifische Amplifikation sollte der GC-Gehalt der Primer mindestens 40 % und höchstens 60 % der Amplifikation betragen. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, liegen drei der in der Arbeit von Corman-Drosten beschriebenen Primer nicht im normalen Bereich des GC-Gehalts. Zwei Primer (RdRp SARSr F und RdRp SARSr R) haben ungewöhnliche und sehr niedrige GC-Werte von 28%-31% für alle möglichen Varianten von Wobble-Basen, während der Primer E Sarbeco F einen GC-Wert von 34,6% hat (Tabelle 3 und zweites Feld von Tabelle 3).

Es ist zu beachten, dass der GC-Gehalt aufgrund der drei Wasserstoffbrücken bei der Basenpaarung die Bindung an das spezifische Zielgen weitgehend bestimmt. Je niedriger also der GC-Gehalt des Primers ist, desto geringer ist seine Bindungsfähigkeit an die spezifische Zielgenesequenz (d. h. das zu untersuchende Gen).

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

erkannt werden). Das bedeutet, dass wir für die Erkennung einer Zielsequenz eine Temperatur wählen müssen, die so nahe wie möglich an der tatsächlichen Annealing-Temperatur (Best-Practice-Wert) liegt, damit sich der Primer nicht wieder ablöst, während wir gleichzeitig die Zielsequenz gezielt auswählen.

Wenn der T_m-Wert sehr niedrig ist, wie bei allen Wobbly-Varianten der RdRp-Reverse-Primer beobachtet, können die Primer unspezifisch an mehrere Targets binden, was die Spezifität verringert und potenziell falsch positive Ergebnisse erhöht.

Die Glühtemperatur (T_m) ist ein entscheidender Faktor für die Bestimmung der Spezifität /Genauigkeit des qPCR-Verfahrens und wesentlich für die Bewertung der Genauigkeit von qPCR-Protokollen. Best-Practice-Empfehlung: Beide Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) sollten einen annähernd gleichen Wert haben, vorzugsweise den gleichen Wert.

Wir benutzten die frei verfügbare Primer-Design-Software Primer-BLAST [12, 25], um die Best-Practice-Werte für alle in der Corman-Drosten-Arbeit verwendeten Primer zu ermitteln (Tabelle 3). Wir versuchten, einen T_m-Wert von 60° C zu finden, während wir in ähnlicher Weise den höchstmöglichen GC%-Wert für alle Primer anstrebten. Eine maximale T_m-Differenz von 2° C innerhalb der Primerpaare wurde als akzeptabel angesehen. Beim Testen der im Corman-Drosten-Papier angegebenen Primer-Paare haben wir für Primer-Paar1 (RdRp_SARSr_F und RdRp_SARSr_R) einen Unterschied von 10° C in Bezug auf die Annealing-Temperatur T_m festgestellt. *Dies ist ein sehr schwerwiegender Fehler und macht das Protokoll als spezifisches Diagnoseinstrument unbrauchbar.*

Zusätzliche Tests zeigten, dass nur das Primerpaar, das für die Amplifikation des N-Gens (N_Sarbeco_F und N_Sarbeco_R) entwickelt wurde, den adäquaten Standard für einen diagnostischen Test erreicht, da es einen ausreichenden GC-Gehalt aufweist und die T_m-Differenz zwischen den Primern (N_Sarbeco_F und N_Sarbeco_R) 1,85° C beträgt (unter dem entscheidenden Maximum von 2° C Differenz). Wichtig ist, dass dies das Gen ist, das weder in den Virusproben (Tabelle 2) getestet noch als Bestätigungstest hervorgehoben wurde. Zusätzlich zu den stark variierenden Schmelztemperaturen und degenerierten Sequenzen in diesen Primern gibt es einen weiteren Faktor, der die Spezifität des Verfahrens beeinträchtigt: Die dNTPs (0,4uM) sind doppelt so hoch wie für eine hochspezifische Amplifikation empfohlen. Außerdem wird der Reaktion zusätzlich Magnesiumsulfat zugesetzt. Dieses Verfahren kann in Verbindung mit einer niedrigen Annealing-Temperatur zu unspezifischen Amplifikationen führen. Wenn zusätzliches

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Magnesium für die qPCR erforderlich ist, sollte die Spezifität des Assays genauer untersucht werden.

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Die hier beschriebenen Konstruktionsfehler sind so schwerwiegend, dass es höchst unwahrscheinlich ist, dass eine spezifische Amplifikation von SARS-CoV-2-Genmaterial mit dem Protokoll der Corman-Drosten-Studie möglich ist.

Tabelle 3: GC-Gehalt der Primer und Sonden (nach Corman-Drosten; Abweichungen vom optimierten GC-Gehalt sind hervorgehoben). Das zweite Panel zeigt eine tabellarische Auflistung aller Primer-BLAST-Best-Practice-Werte für alle Primer und Sonden, die in der Corman-Drosten-Studie von Prof. Dr. Ulrike Kämmerer und ihrem Team verwendet wurden

Normal ranges for GC%: 40 - 60%; normal ranges for TM: 55-65°; Best-practise for qPCR in our case: 60° for both primers (reverse & forward)

Assay/Use	Oligonucleotide	Sequence*	Concentration*
RdRp gene	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV.
	RdRp_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCACMGGTGATGC-BBQ	Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs. Use 100 nM per reaction and mix with P1
E gene	RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	Use 100 nM per reaction and mix with P2
	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 800 nM per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 400 nm per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 200 nm per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Use 600 nm per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 200 nm per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 800 nm per reaction

* W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C. FAM: 6-carboxyfluorescein; BBQ: blackberry quencher.
* Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µL of a 10 µM primer stock solution per 25 µL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

Primer pairs	Sequence (5'-3')	GC Template strand	TM Length	Search in MN908947 (first full genome from Wuhan, 12.01.2020)						
				Start	Stop	Tm	GC%	Self 5' complementarity	Self 3' complementarity	Product length (bp)
E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Plus	26	26269	26294	58.29	34.62	8.00	8.00	113
E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Minus	22	26381	26360	60.93	45.45	7.00	1.00	
N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Plus	19	28706	28724	60.15	57.89	4.00	0.00	128
N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Minus	20	28833	28814	58.00	55.00	3.00	1.00	
RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGGCGG		22			63.74	59.09	4.00		to be added in next version
RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA		25			53.56	28.00	7.00		
If R= G and S= G	GTGARATGGTCATGTGGCGG CAGATGTTAAAGACACTATTAGCATA		22 26			63.74 55.22	59.09 30.77	4.00 7.00	1.00 5.00	not found in the Sequence
If R= G and S= C	GTGARATGGTCATGTGGCGG CAGATGTTAAACACACTATTAGCATA		22 26			63.74 55.68	59.09 30.77	4.00 7.00	1.00 2.00	
If R= A and S= G	GTGAATGGTCATGTGGCGG CAAATGTTAAAGACACTATTAGCATA		22 26			62.58 54.23	54.55 26.92	4.00 7.00	1.00 5.00	
If R= A and S= C	GTGAATGGTCATGTGGCGG CAAATGTTAAACACACTATTAGCATA		22 26			62.58 54.69	54.55 26.92	4.00 7.00	1.00 2.00	
Probes:										
RdRp-SARSr-P2	CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC		25			64.89	56.00	6.00	5.00	
RdRp-SARSr-P1	CCAGGTGGWACRTCACMGGTGATGC									
E_Sarbeco-P1	ACACTAGCCATCCTACTGCGCTTCG		26			66.78	53.85	4.00	2.00	
N_Sarbeco-P	ACTTCTCAAGGAACAACATTGCCA		25			63.15	44.00	8.00	3.00	

3. Die Anzahl der Amplifikationszyklen

Es ist anzumerken, dass im Corman-Drosten-Papier nirgendwo erwähnt wird, dass ein Test positiv oder negativ ist, oder was ein positives oder negatives Ergebnis definiert. Diese Arten von virologischen Diagnostiktests müssen auf einer Standardarbeitsanweisung beruhen, die eine validierte und festgelegte Anzahl von PCR-Zyklen (Ct-Wert) enthält, nach denen eine Probe als positiv oder negativ eingestuft wird. Der maximale, einigermaßen zuverlässige Ct-Wert liegt bei 30 Zyklen. Ab einem Ct-Wert von 35 Zyklen muss mit einer rasch ansteigenden Zahl von falsch-positiven Ergebnissen gerechnet werden.

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

PCR-Daten, die nach einem Ct-Wert von 35 Zyklen als positiv bewertet werden, sind völlig unzuverlässig.

Zitiert werden Jaafar *et al.* 2020 [3]: "*Bei Ct = 35, dem Wert, den wir für die Meldung eines positiven PCR-Ergebnisses verwendet haben,*

<3% der Kulturen sind positiv." Mit anderen Worten: Bei diesen hohen Ct-Werten ist keine erfolgreiche Virusisolierung von SARS-CoV-2 gelungen.

Außerdem zeigen wissenschaftliche Studien, dass nur nicht-infektiöse (tote) Viren mit Ct-Werten von 35 nachgewiesen werden [22].

Zwischen 30 und 35 gibt es eine Grauzone, in der ein positiver Test nicht mit Sicherheit festgestellt werden kann. Dieser Bereich sollte ausgeschlossen werden. Natürlich könnte man 45 PCR-Zyklen durchführen, wie im Corman-Drosten WHO-Protokoll empfohlen (Abbildung 4), aber dann muss man auch einen vernünftigen Ct-Wert definieren (der 30 nicht überschreiten sollte). Ein Analyseergebnis mit einem Ct-Wert von 45 ist jedoch wissenschaftlich und diagnostisch absolut bedeutungslos (ein vernünftiger Ct-Wert sollte 30 nicht überschreiten). All dies sollte sehr deutlich kommuniziert werden. *Es ist ein erheblicher Fehler, dass in dem Corman-Drosten-Papier der maximale Ct-Wert, bei dem eine Probe eindeutig als positives oder negatives Testergebnis gewertet werden kann, nicht erwähnt wird. Dieser wichtige Zyklusgrenzwert wird auch in den bisherigen Folgeanträgen nicht genannt.*

3. Discriminatory assay

RdRp assay:

MasterMix:	Per reaction	
H ₂ O (RNase free)	1.1 µl	
2x Reaction mix*	12.5 µl	
MgSO ₄ (50mM)	0.4 µl	
BSA (1 mg/ml)**	1 µl	
Primer RdRP_SARs-F2 (10 µM stock solution)	1.5 µl	GTGARATGGTCATGTGTGGCCG
Primer RdRP_SARs-R1 (10 µM stock solution)	2 µl	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
Probe RdRP_SARs-P2 (10 µM stock solution)	0.5 µl	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ
SSIII/Taq EnzymeMix*	1 µl	
Total reaction mix	20 µl	
Template RNA, add	5 µl	
Total volume	25 µl	

* Thermo Fischer/Invitrogen: SuperScriptIII OneStep RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase
** MgSO₄ (50 mM) [Sigma], This component is not provided with the OneStep RT-PCR kit
*** non-acetylated [Roche].

Cycler:
55°C 10'
94°C 3'
94°C 15"
58°C 30" 45x

Abbildung 4: RT-PCR Kit Empfehlung im offiziellen Corman-Drosten WHO-Protokoll [8]. Es findet sich lediglich ein "Cycler"-Wert (Zyklen) ohne entsprechenden und wissenschaftlich sinnvollen Ct (Cutoff-Wert). Dieser oder ein anderer Cycler-Wert ist im eigentlichen Corman-Drosten-Papier nirgends zu finden.

4. Biomolekulare Validierungen

Um festzustellen, ob es sich bei den amplifizierten Produkten tatsächlich um SARS-CoV-2-Gene handelt, ist eine biomolekulare Validierung der amplifizierten PCR-Produkte unerlässlich. Für einen diagnostischen Test ist diese Validierung ein absolutes Muss.

Die Validierung der PCR-Produkte sollte entweder durch Ausführen des PCR-Produkts in einem 1%igen Agarose-EtBr-Gel zusammen mit einem Größenindikator (DNA-Lineal oder DNA-Leiter) erfolgen, damit die Größe des Produkts geschätzt werden kann. Die Größe muss mit der berechneten Größe des Amplifikationsprodukts übereinstimmen. Noch besser ist es jedoch, das Amplifikationsprodukt zu sequenzieren. Letzteres gibt 100%ige Gewissheit über die Identität des Amplifikationsprodukts. Ohne molekulare Validierung kann man sich der Identität der amplifizierten PCR-Produkte nicht sicher sein. In Anbetracht der oben beschriebenen schweren Designfehler können die amplifizierten PCR-Produkte alles Mögliche sein.

Ebenfalls nicht erwähnt wird in dem Corman-Drosten-Papier der Fall von kleinen Fragmenten der qPCR (etwa 100bp): Es könnte sich entweder um ein 1,5%iges Agarosegel oder sogar um ein Acrylamidgel handeln.

Die Tatsache, dass diese PCR-Produkte nicht auf molekularer Ebene validiert wurden, ist ein weiterer auffälliger Fehler des Protokolls, der jeden darauf basierenden Test als spezifisches Diagnoseinstrument zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus unbrauchbar macht.

5. Positiv- und Negativkontrollen zur Bestätigung bzw. Ablehnung des spezifischen Virusnachweises.

Die in der Arbeit von Corman und Drosten beschriebene unbestätigte Annahme ist, dass SARS-CoV-2 das einzige Virus aus der Gruppe der SARS-ähnlichen Beta-Coronaviren ist, das derzeit Infektionen beim Menschen verursacht. Die Sequenzen, auf denen ihre PCR-Methode basiert, sind *in silico*-Sequenzen, die von einem Labor in China zur Verfügung gestellt wurden [23], da den Autoren zum Zeitpunkt der Entwicklung des PCR-Tests kein Kontrollmaterial von infektiösem ("lebendem") oder inaktiviertem SARS-CoV-2 zur Verfügung stand. Der PCR-Test wurde daher unter Verwendung der Sequenz des bekannten SARS-CoV-1 als Kontrollmaterial für die Sarbeco-Komponente entwickelt (Dr. Meijer, Co-

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Autor des Corman-Drosten-Papiers in einem E-Mail-Austausch mit Dr. Peter Borger) [2].

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Bei allen Personen, die mit dem RT-PCR-Test positiv getestet werden, wie im Corman-Drosten-Papier beschrieben, wird davon ausgegangen, dass sie positiv für SARS-CoV-2-Infektionen sind. Diese Annahme weist drei gravierende Mängel auf. Erstens: Ein positiver Test auf die in der Corman-Drosten-Studie beschriebenen RNA-Moleküle Drosten-Papier kann nicht mit einer "Infektion mit einem Virus" gleichgesetzt werden. Ein positiver RT-PCR-Test zeigt lediglich das Vorhandensein von viralen RNA-Molekülen an. Wie unter Punkt 1d (oben) dargelegt, wurde der Corman-Drosten-Test nicht für den Nachweis des Virus in voller Länge konzipiert, sondern nur für ein Fragment des Virus. Wir sind bereits zu dem Schluss gekommen, dass der Test daher als diagnostischer Test für SARS-Virusinfektionen ungeeignet ist.

Zweitens, und das ist von großer Bedeutung, wurde die Funktionalität des veröffentlichten RT-PCR-Tests nicht mit einer Positivkontrolle (isolierte SARS-CoV-2-RNA) nachgewiesen, die einen wesentlichen wissenschaftlichen Goldstandard darstellt.

Drittens heißt es im Corman-Drosten-Papier:

"Um zu zeigen, dass die Assays auch andere fledermausassoziierte SARS-Viren nachweisen können, haben wir mit dem E-Gen-Assay sechs Fledermaus-Kotproben getestet, die von Drexler et al. [...] und Muth et al. [...] zur Verfügung gestellt wurden. Diese viruspositiven Proben stammten von europäischen rhinolophiden Fledermäusen. Der Nachweis dieser phylogenetischen Ausreißer innerhalb der SARS-verwandten CoV-Klade lässt darauf schließen, dass alle asiatischen Viren wahrscheinlich nachgewiesen werden. Dies würde theoretisch eine breite Sensitivität gewährleisten, selbst im Falle einer mehrfachen unabhängigen Aufnahme von Virusvarianten aus einem tierischen Reservoir."

Diese Aussage zeigt, dass das im RT-PCR-Test verwendete E-Gen, wie in der Corman-Drosten-Arbeit beschrieben, nicht spezifisch für SARS-CoV-2 ist. Die E-Gen-Primer weisen auch ein breites Spektrum anderer SARS-Viren nach.

Das Genom der Coronaviren ist das größte aller RNA-Viren, die den Menschen infizieren, und sie haben alle eine sehr ähnliche Molekularstruktur. Dennoch haben SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 zwei sehr spezifische genetische Fingerabdrücke, die sie von den anderen Coronaviren unterscheiden. Erstens ist eine einzigartige Fingerprint-Sequenz (KTFPPTEPKKDKKKK) im N-Protein von SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 vorhanden [13,14,15]. Zweitens enthalten sowohl SARS-CoV-1 als auch SARS-CoV-2 das HE-Protein nicht, während alle anderen Coronaviren dieses Gen besitzen [13, 14]. Um also ein SARS-CoV-1- und SARS-CoV-2-PCR-Produkt spezifisch nachzuweisen, hätte die oben genannte Region im N-Gen als Amplifikationsziel

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

gewählt werden müssen. Ein zuverlässiger diagnostischer Test sollte sich auf diese spezifische Region im N-Gen als Bestätigungstest konzentrieren. Die PCR für dieses N-Gen wurde in dem Drosten-Corman-Papier nicht weiter validiert und auch nicht als Testgen empfohlen, und zwar aus folgenden Gründen

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

mit der ursprünglichen SARS-CoV-Sonde "nicht so empfindlich" sind [1].

Außerdem macht das Fehlen des HE-Gens sowohl bei SARS-CoV-1 als auch bei SARS-CoV-2 dieses Gen zur idealen Negativkontrolle für den Ausschluss anderer Coronaviren. Das Corman-Drosten-Papier enthält diese Negativkontrolle nicht und auch keine anderen Negativkontrollen. Der PCR-Test im Corman-Drosten-Papier enthält daher weder eine eindeutige Positivkontrolle noch eine Negativkontrolle, um das Vorhandensein anderer Coronaviren auszuschließen. Dies ist ein weiterer großer Konstruktionsfehler, der den Test als ungeeignet für die Diagnose einstuft.

6. Standard Operating Procedure (SOP) ist nicht verfügbar

Es sollte ein Standardarbeitsverfahren (SOP) zur Verfügung stehen, in dem die oben genannten Parameter eindeutig festgelegt sind, damit alle Laboratorien in der Lage sind, die gleichen Testbedingungen einzurichten. Eine validierte universelle SOP ist unerlässlich, da sie den Datenvergleich innerhalb und zwischen Ländern erleichtert. Es ist sehr wichtig, alle Primerparameter eindeutig zu spezifizieren. Wir stellen fest, dass dies noch nicht geschehen ist. Außerdem ist der Ct-Wert, der angibt, wann eine Probe als positiv oder negativ zu bewerten ist, nicht angegeben. Es wird auch nicht angegeben, wann eine Probe als mit SARS-CoV-Viren infiziert gilt. Wie oben gezeigt, kann der Test nicht zwischen Viren und Virusfragmenten unterscheiden, so dass der Ct-Wert, der die Positivität anzeigt, von entscheidender Bedeutung ist. Dieser Ct-Wert hätte in der Standardarbeitsanweisung (SOP) festgelegt und online gestellt werden müssen, damit alle Labors, die diesen Test durchführen, genau die gleichen Randbedingungen haben. Dass es keine solche Standardarbeitsanweisung gibt, deutet auf eine mangelhafte Wissenschaft hin. Die Laboratorien sind somit frei, den Test so durchzuführen, wie sie es für richtig halten, was zu einer enormen Variationsbreite führt. Labors in ganz Europa stehen vor einer Vielzahl von Fragen: Welche Primer sollen bestellt werden? Welche Nukleotide sollen die undefinierten Stellen ausfüllen? Welcher Tm-Wert soll gewählt werden? Wie viele PCR-Zyklen sollen durchgeführt werden? Bei welchem Ct-Wert ist die Probe positiv? Und wann ist sie negativ? Und wie viele Gene sollen getestet werden? Sollen alle Gene getestet werden oder nur das E- und das RpRd-Gen, wie in Tabelle 2 des Corman-Drosten-Papiers angegeben? Sollte auch das N-Gen getestet werden? Und was ist die Negativkontrolle? Was ist die Positivkontrolle? Das beschriebene Protokoll ist leider sehr vage und fehlerhaft, so dass man in Dutzende von verschiedenen Richtungen gehen kann. Es scheint weder eine Standardisierung noch eine

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

SOP zu geben, so dass es nicht klar ist, wie dieser Test durchgeführt werden kann.

7. Folgen der unter 1-5 beschriebenen Fehler: falsch positive Ergebnisse.

Der in der Arbeit von Corman-Drosten beschriebene RT-PCR-Test enthält so viele molekularbiologische Designfehler (siehe 1-5), dass es nicht möglich ist, eindeutige Ergebnisse zu erhalten. Es ist unvermeidlich, dass dieser Test eine enorme Anzahl so genannter "falsch positiver" Ergebnisse liefert. Falsch positiv ist eine negative Probe, die zunächst ein positives Ergebnis liefert, sich aber bei einer erneuten Untersuchung mit demselben Test als negativ erweist. Falsch positive Testergebnisse sind falsch positive Testergebnisse, d. h. negative Proben, die positiv getestet werden. Und genau das findet sich in dem Corman-Drosten-Papier. Auf Seite 6 des PDF-Manuskripts zeigen die Autoren, dass selbst unter gut kontrollierten Laborbedingungen ein erheblicher Prozentsatz falsch positiver Ergebnisse mit diesem Test erzeugt wird:

"Bei vier einzelnen Testreaktionen wurde eine schwache anfängliche Reaktivität festgestellt, die jedoch bei einer erneuten Untersuchung mit demselben Assay negativ war. Diese Signale wurden nicht mit einem bestimmten Virus in Verbindung gebracht, und für jedes Virus, bei dem eine anfängliche positive Reaktivität auftrat, gab es andere Proben, die das gleiche Virus in einer höheren Konzentration enthielten, aber nicht positiv getestet wurden. In Anbetracht der Ergebnisse der oben beschriebenen umfassenden technischen Qualifizierung wurde der Schluss gezogen, dass diese anfängliche Reaktivität nicht auf die chemische Instabilität der Echtzeit-PCR-Sonden zurückzuführen war, sondern höchstwahrscheinlich auf Probleme bei der Handhabung, die durch die schnelle Einführung neuer diagnostische Tests und Kontrollen während dieser Evaluierungsstudie". [1]

Der erste Satz dieses Auszugs ist ein klarer Beweis dafür, dass der in der Corman-Drosten-Arbeit beschriebene PCR-Test falsch-positive Ergebnisse liefert. Selbst unter den gut kontrollierten Bedingungen des modernen Charité-Labors sind 4 von 310 Primärtests falsch positiv pro Definition. Vier negative Proben wurden zunächst positiv getestet und waren dann bei einer erneuten Untersuchung negativ. Dies ist das klassische Beispiel für ein falsches Positiv. In diesem Fall weisen die Autoren sie nicht als falsch positiv aus, was intellektuell unredlich ist. Eine weitere verräterische Beobachtung in dem obigen Auszug ist, dass die Autoren die falsch-positiven Ergebnisse als "Handhabungsprobleme, die durch die schnelle Einführung neuer diagnostischer Tests verursacht werden", erklären. Stellen Sie sich die Laboratorien vor, die den Test einführen müssen, ohne alle notwendigen Informationen zu haben, die

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

normalerweise in einer Standardarbeitsanweisung beschrieben sind.

8. Das Corman-Drosten-Papier wurde nicht von Fachleuten überprüft

Vor der offiziellen Veröffentlichung in einer Fachzeitschrift werden wissenschaftliche und medizinische Artikel

traditionell durch "Peer Review" zertifiziert. Bei diesem Verfahren nehmen die Redakteure der Zeitschrift den Rat verschiedener Experten ("Gutachter") entgegen, die die Arbeit bewertet haben und möglicherweise Schwachstellen in den Annahmen, Methoden und Schlussfolgerungen aufzeigen. In der Regel veröffentlicht eine Zeitschrift einen Artikel erst dann, wenn die Herausgeber überzeugt sind, dass die Autoren die Bedenken der Gutachter ausgeräumt haben und dass die vorgelegten Daten die in der Arbeit gezogenen Schlussfolgerungen stützen." Dieser Prozess wird auch für Eurosurveillance beschrieben [16].

Das Corman-Drosten-Papier wurde am 21. Januar 2020 bei Eurosurveillance eingereicht und am 22. Januar 2020 zur Veröffentlichung angenommen. Am 23. Januar 2020 war das Papier online. Am 13. Januar 2020 wurde die Version 1-0 des Protokolls auf der offiziellen WHO-Website [17] veröffentlicht, die am 17. Januar 2020 als Dokumentversion 2-1 [18] aktualisiert wurde, noch bevor das Corman-Drosten-Papier am 23. Januar bei Eurosurveillance veröffentlicht wurde.

Normalerweise ist ein Peer-Review ein zeitaufwändiger Prozess, da mindestens zwei Experten aus dem Fachgebiet die eingereichte Arbeit kritisch lesen und kommentieren müssen. Unserer Meinung nach wurde diese Arbeit nicht von Fachleuten begutachtet. Vierundzwanzig Stunden reichen einfach nicht aus, um ein gründliches Peer-Review durchzuführen. Unsere Schlussfolgerung wird durch die Tatsache gestützt, dass wir eine enorme Anzahl sehr schwerwiegender Konstruktionsfehler gefunden haben, die den PCR-Test als Diagnoseinstrument zum Nachweis des SARS-CoV-2-Virus völlig ungeeignet machen. Jeder Molekularbiologe, der mit dem Design von RT-PCR vertraut ist, hätte die schwerwiegenden Fehler im Corman-Drosten-Papier schon vor dem eigentlichen Begutachtungsprozess leicht erkennen können. Wir haben Eurosurveillance am 26. Oktober 2020 gebeten, uns eine Kopie des Peer-Review-Berichts zukommen zu lassen. Bis heute haben wir diesen Bericht nicht erhalten, und in einem Schreiben vom 18. November 2020 lehnte das ECDC als Gastgeber für Eurosurveillance den Zugang ab, ohne eine stichhaltige wissenschaftliche Begründung für seine Entscheidung zu liefern. Im Gegenteil, sie schreiben, dass "die Offenlegung den Zweck wissenschaftlicher Untersuchungen untergraben würde". [24].

9. Autoren als Redakteure

Ein letzter Punkt ist von großer Bedeutung. Es stellt sich heraus, dass zwei Autoren des Corman-Drosten-Papiers, Christian Drosten und Chantal Reusken, auch Mitglieder des Redaktionsausschusses dieser Zeitschrift sind [19]. Es besteht also ein schwerer Interessenkonflikt, der den Verdacht erhärtet

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

dass das Papier nicht von Fachkollegen geprüft wurde. Es hat den Anschein, dass die schnelle Veröffentlichung nur deshalb möglich war, weil die Autoren auch dem Redaktionsausschuss von Eurosurveillance angehörten. Diese Praxis wird als Beeinträchtigung der wissenschaftlichen Integrität eingestuft.

ZUSAMMENFASSENDE AUFLISTUNG DER IN DEM PAPIER FESTGESTELLTEN FEHLER

Das Corman-Drosten-Papier enthält die folgenden spezifischen Fehler:

1. Es gibt keinen spezifizierten Grund für die Verwendung dieser extrem hohen Konzentrationen von Primern in diesem Protokoll. Die beschriebenen Konzentrationen führen zu erhöhten unspezifischen Bindungen und PCR-Produktamplifikationen, wodurch der Test als spezifisches Diagnoseinstrument zum Nachweis des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet ist.
2. Sechs nicht spezifizierte wackelige Positionen führen zu einer enormen Variabilität in den realen Laboranwendungen dieses Tests; die verwirrende unspezifische Beschreibung im Corman-Drosten-Papier eignet sich nicht als Standard-Arbeitsprotokoll und macht den Test als spezifisches Diagnoseinstrument zum Nachweis des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet.
3. Der Test kann nicht zwischen dem ganzen Virus und viralen Fragmenten unterscheiden. Daher kann der Test nicht als Diagnostikum für intakte (infektiöse) Viren verwendet werden, so dass er sich nicht als spezifisches Diagnoseinstrument zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus eignet und keine Rückschlüsse auf das Vorliegen einer Infektion zulässt.
4. Ein Unterschied von 10° C in Bezug auf die Annealing-Temperatur T_m für Primerpaar1 (RdRp_SARSr_F und RdRp_SARSr_R) macht den Test auch als spezifisches Diagnoseinstrument zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet.
5. Ein schwerwiegender Fehler ist das Fehlen eines Ct-Werts, bei dem eine Probe als positiv und negativ gilt. Dieser Ct-Wert findet sich auch nicht in den Folgeanträgen, so dass der Test nicht als spezifisches Diagnoseinstrument zum Nachweis des SARS-CoV-2-Virus geeignet ist.

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

6. Die PCR-Produkte wurden nicht auf molekularer Ebene validiert. Diese Tatsache macht das Protokoll als spezifisches Diagnoseinstrument zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus unbrauchbar.
7. Der PCR-Test enthält weder eine eindeutige Positivkontrolle, um seine Spezifität für SARS-CoV-2 zu bewerten, noch eine Negativkontrolle, um das Vorhandensein anderer Coronaviren auszuschließen, so dass der Test als spezifisches Diagnoseinstrument zum Nachweis des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet ist.
8. Das Testdesign im Corman-Drosten-Papier ist so vage und mangelhaft, dass man in Dutzende von verschiedenen Richtungen gehen kann; nichts ist standardisiert und es gibt keine SOP. Dies stellt die wissenschaftliche Gültigkeit des Tests stark in Frage und macht ihn als spezifisches Diagnoseinstrument zum Nachweis des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet.
9. Höchstwahrscheinlich wurde die Arbeit von Corman und Drosten nicht von Fachkollegen überprüft, so dass der Test nicht als spezifisches Diagnoseinstrument zum Nachweis des SARS-CoV-2-Virus geeignet ist.
10. Wir stellen bei mindestens vier Autoren schwerwiegende Interessenkonflikte fest, zusätzlich zu der Tatsache, dass zwei der Autoren des Corman-Drosten-Papiers (Christian Drosten und Chantal Reusken) Mitglieder des Redaktionsausschusses von Eurosurveillance sind. Am 29. Juli 2020 wurde ein Interessenkonflikt hinzugefügt (Olfert Landt ist CEO von TIB-Molbiol; Marco Kaiser ist Senior Researcher bei GenExpress und dient als wissenschaftlicher Berater für TIB-Molbiol), der in der ursprünglichen Version nicht angegeben war (und in der PubMed-Version immer noch fehlt); TIB-Molbiol ist das Unternehmen, das "als erstes" PCR-Kits (Light Mix) auf der Grundlage des im Corman-Drosten-Manuskript veröffentlichten Protokolls herstellte, und nach eigenen Angaben vertrieb es diese PCR-Testkits, bevor die Publikation überhaupt eingereicht wurde [20]; außerdem versäumten Victor Corman & Christian Drosten, ihre zweite Zugehörigkeit zu nennen: das kommerzielle Testlabor "Labor Berlin". Beide sind dort für die Virusdiagnostik zuständig [21] und das Unternehmen ist im Bereich der Echtzeit-PCR-Tests tätig.

SCHLUSSFOLGERUNG

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Bei unserer erneuten Prüfung des Testprotokolls zum Nachweis von SARS-CoV-2, das im Corman-Drosten-Papier beschrieben wird, haben wir Fehler und inhärente Irrtümer festgestellt, die den SARS-CoV-2-PCR-Test unbrauchbar machen.

Die Entscheidung darüber, welche Testprotokolle veröffentlicht und allgemein zugänglich gemacht werden, liegt in den Händen von Eurosurveillance. Eine Entscheidung, die offensichtlichen Fehler im Corman-Drosten-Papier anzuerkennen, hat den Vorteil, dass menschliche Kosten und menschliches Leid in Zukunft erheblich minimiert werden. Ist es nicht im besten Interesse von Eurosurveillance, dieses Papier zurückzuziehen? Unsere Schlussfolgerung ist klar. In Anbetracht der hier beschriebenen enormen Mängel und Fehler bei der Gestaltung des PCR-Protokolls kommen wir zu dem Schluss: Im Rahmen der wissenschaftlichen Integrität und Verantwortung bleibt keine große Wahl.

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Referenzen

[1] Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Nachweis des neuartigen Coronavirus 2019 (2019-nCoV) durch Echtzeit-RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

[2] E-Mail-Kommunikation zwischen Dr. Peter Borger und Dr. Adam Meijer:
Ergänzendes Material

[3] Jafaar *et al.*, Korrelation zwischen 3790 quantitativen Polymerase-Kettenreaktions-positiven Proben und positiven Zellkulturen, darunter 1941 Coronavirus-2-Isolate des Schweren Akuten Respiratorischen Syndroms

<https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa1491/5912603>

[4] BBC, 21. Januar 2020: <https://www.bbc.com/news/world-asia-china-51185836>;

Archiv: <https://archive.is/0qRmZ>

[5] Google Analytics - COVID19-Todesfälle weltweit: <https://bit.ly/3fndemJ>;

Archiv: <https://archive.is/PpqEE>

[6] Labortests für COVID-19 Emergency Response Technical Centre, NIVD unter China
CDC 15. März 2020:

<http://www.chinacdc.cn/en/COVID19/202003/P020200323390321297894.pdf>

[7] Real-Time PCR-Handbuch Life Technologies

(<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>)

Nolan T, Huggett J, Sanchez E. Leitfaden für die gute Praxis bei der Anwendung der quantitativen PCR (qPCR) Erste Ausgabe 2013

[8] Trestan Pillonel *et al*, Brief an den Herausgeber: SARS-CoV-2-Nachweis durch

Echtzeit-RT-PCR: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7268274/>

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

[9] Kurkela, Satu, und David WG Brown. "Molekular-diagnostische Techniken". *Medicine* 38.10 (2009): 535-540.

[10] Wolfel *et al.*, Virologische Beurteilung von hospitalisierten Patienten mit COVID-2019 <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x>

[11] Thermofischer Primer Dimer Web Tool:
<https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>

[12] Primer-BLAST, NCBI - National Center for Biotechnology Information:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

[13] Marra MA, Steven JM, Caroline RA, Robert AH, Angela BW et al. (2003) *Science*. Die Genomsequenz des SARS-assoziierten Coronavirus. *Science* 300(5624): 1399-1404.

[14] Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom Coronavirus 2 Isolat Wuhan-Hu-1, vollständiges Genom: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN908947>

[15] Borger P. Ein SARS-ähnliches Coronavirus wurde erwartet, aber es wurde nichts getan, um darauf vorbereitet zu sein. *Am J Biomed Sci Res* 2020.

<https://biomedgrid.com/pdf/AJBSR.MS.ID.001312.pdf>
https://www.researchgate.net/publication/341120750_A_SARS-like_Coronavirus_was_Expected_but_nothing_was_done_to_be_Prepared; Archiv:
<https://archive.is/i76Hu>

[16] Eurosurveillance paper evaluation / review process:
<https://www.eurosurveillance.org/evaluation>

[17] Offizielle Empfehlung des Corman-Drosten-Protokolls & Manuskripts durch die WHO, veröffentlicht am 13. Januar 2020 als Version 1.0 des Dokuments:

<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf>; Archiv: <https://bit.ly/3m3jXVH>

[18] Offizielle WHO-Empfehlung für das Corman / Drosten RT-qPCR-Protokoll, das sich direkt aus der Eurosurveillance-Publikation, Dokument-Version 2-1, ableitet, veröffentlicht am

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

17. Januar 2020: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2

[19] Eurosurveillance Editorial Board, 2020: <https://www.eurosurveillance.org/upload/site-assets/imgs/2020-09-Editorial%20Board%20PDF.pdf>; Archiv: <https://bit.ly/2TqXBjX>

[20] Gebrauchsanweisung LightMix SarbecoV E-gene plus EAV-Kontrolle, TIB-Molbiol & Roche Molecular Solutions, 11. Januar 2020:

[https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_40-0776_96_Sarbeco-E-gene_V200204_09164154001\(1\).pdf](https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_40-0776_96_Sarbeco-E-gene_V200204_09164154001(1).pdf)

Archiv, Zeitstempel - 11. Januar 2020: <https://archive.is/Vulo5>; Archiv: <https://bit.ly/3fm9bXH>

[21] Christian Drosten & Victor Corman, verantwortlich für die Virendiagnostik im Labor Berlin: <https://www.laborberlin.com/fachbereiche/virologie/>; Archiv: archive.is/CDEUG

[22] Tom Jefferson, Elizabeth Spencer, Jon Brassey, Carl Heneghan Virenkulturen zur Bewertung der COVID-19-Infektiosität. Systematische Überprüfung. Systematic review doi:

<https://doi.org/10.1101/2020.08.04.20167932>;

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.08.04.20167932v4>

[23] Kim *et al.*, The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420304062>

[24] Antwort des ECDC an Dr. Peter Borger, 18. November 2020: Ergänzendes Material

[25] Prof. Dr. Ulrike Kämmerer & Team, Übersicht & Primer-BLAST-Tabelle:

Ergänzendes Material

Zusätzliche Literatur:

Beschreibung RT-PCR RKI Deutschland, auf Seite 10 dieses Links:

https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBE_Downloads/JoHM_S5_2020_Studienprotokoll_CORONA_MONITORING_lokal.pdf?blob=publicationFile

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Zugehörigkeit des Autors:

- 1) **Dr. Pieter Borger** (MSc, PhD), Molekulargenetik, W+W Research Associate, Lörrach, Deutschland,
- 2) Rajesh Kumar Malhotra (Artist Alias: **Bobby Rajesh Malhotra**), Ehemaliger 3D Artist / Wissenschaftliche Visualisierungen am CeMM - Zentrum für Molekulare Medizin der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (2019-2020), Universität für angewandte Kunst - Abteilung für Digitale Kunst Wien, Österreich
- 3) **Dr. Michael Yeadon** BSs(Hons) Biochem Tox U Surrey, PhD Pharmakologie U Surrey. Geschäftsführender Direktor, Yeadon Consulting Ltd, ehemaliger leitender Wissenschaftler von Pfizer, Vereinigtes Königreich,
- 4) **Dr. Clare Craig** MA, (Cantab) BM, BCh (Oxon), FRCPath, Vereinigtes Königreich
- 5) **Kevin McKernan**, BS Emory University, Chief Scientific Officer, Gründer von Medical Genomics, entwickelte die Sequenzierungspipeline am WIBR/MIT für das Humangenomprojekt, erfand und entwickelte den SOLiD-Sequenzierer, erhielt Patente in Bezug auf PCR, DNA-Isolierung und Sequenzierung, USA
- 6) **Prof. Dr. Klaus Steger**, Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Molekulare Andrologie, Biomedizinisches Forschungszentrum der Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland
- 7) **Dr. Paul McSheehy** (BSc, PhD), Biochemiker und Industrie-Pharmakologe, Lörrach, Deutschland
- 8) **Dr. Lidiya Angelova**, MSc in Biologie, PhD in Mikrobiologie, ehemalige Forscherin am National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Maryland, USA
- 9) **Dr. Fabio Franchi**, ehemaliger Dirigente Medico (M.D.) in einer Abteilung für Infektionskrankheiten, spezialisiert auf "Infektionskrankheiten" und "Hygiene und Präventivmedizin", Società Scientifica per il Principio di Precauzione (SSPP), Italien
- 10) **Dr. med. Thomas Binder**, Internist und Kardiologe (FMH), Schweiz
- 11) **Prof. Dr. med. Henrik Ullrich**, Facharzt für Diagnostische Radiologie, Chefarzt am Zentrum für Radiologie des Collm Oschatz-Krankenhauses, Deutschland
- 12) **Prof. Dr. Makoto Ohashi**, emeritierter Professor, PhD in Mikrobiologie und Immunologie, Tokushima Universität, Japan
- 13) **Dr. Stefano Scoglio**, B.Sc. Ph.D., Mikrobiologe, Ernährungswissenschaftler, Italien
- 14) **Dr. Marjolein Doesburg-van Kleffens** (MSc, PhD), Fachärztin für Labormedizin (klinische Chemie), Maasziekenhuis Pantein, Beugen, Niederlande
- 15) **Dr. Dorothea Gilbert** (MSc, PhD), PhD Umweltchemie und Toxikologie. DGI Beratungsdienste, Oslo, Norwegen

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

- 16) **Dr. Rainer J. Klement**, PhD. Abteilung für Strahlenonkologie, Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt, Deutschland
- 17) **Dr. Ruth Schrufer**, PhD, Humangenetik/Immunologie, München, Deutschland,
- 18) **Dr. Berber W. Pieksma**, Allgemeinmediziner, die Niederlande
- 19) **Dr. med. Jan Bonte** (GJ), Beratender Neurologe, die Niederlande
- 20) Dr. Bruno H. Dalle Carbonare (Molekularbiologe), IP-Spezialist, BDC Basel, Schweiz
- 21) **Dr. Kevin P. Corbett**, MSc Nursing (Kings College London) PhD (London South Bank) Sozialwissenschaften (Science & Technology Studies) London, England, UK
- 22) **Prof. Dr. Ulrike Kämmerer**, Fachärztin für Virologie / Immunologie / Humanbiologie / Zellbiologie, Universitätsklinikum Würzburg, Deutschland

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Beiträge des Autors:

PB: Planung und Durchführung der Analysen und Untersuchungen, Konzeption des Manuskripts. RKM: Planung und Durchführung der Forschung, Konzeption der Abbildungen und des Manuskripts. MY: Durchführung der Analysen und Recherchen.

KMcK: Durchführung der Analysen und Forschungsarbeiten, Konzeption des Manuskripts. KS: Führte die Analysen und Recherchen durch.

PMcS: Korrekturlesen der Analysen und

Recherchen. LA: Korrekturlesen der Analysen und Recherchen.

FF: Korrekturlesen der Analysen und

Recherchen. TB: Korrekturlesen der

Analysen und Recherchen. HU:

Korrekturlesen der Analysen und

Recherchen. MO: Korrekturlesen der

Analysen und Recherchen. SS:

Korrekturlesen der Analysen und

Recherchen.

MDvK: Korrekturlesen der Analysen und

Recherchen. DG: Korrekturlesen der Analysen

und Recherchen.

RJK: Korrekturlesen der Analysen und Recherchen.

RS: Korrekturlesen der Analysen und Forschungsarbeiten sowie des

Manuskripts. BWK: Korrekturlesen der Analysen und Recherchen.

RvV: Korrekturlesen der Analysen und

Recherchen. JB: Korrekturlesen der Analysen

und Recherchen. KC: Korrekturlesen der

Analysen und Recherchen.

UK: Planung und Durchführung der Analysen und Forschungsarbeiten, Konzeption des Manuskripts.

Danksagung:

Prüfbericht - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Wir danken Saji N. Hameed (Environmental Informatics, University of Aizu, Tsuruga, Ikki-machi, Aizuwakamatsu-shi, Fukushima, Japan) und Howard R. Steen (MA Chem. Eng. Cantab (1969-'73), ehemaliger Forschungsleiter, UK) für das Korrekturlesen unseres Manuskripts.