

## Revisionsbericht - Corman-Drosten et al., Eurosurveillance 2020

Öffentliche Version - Endgültiger Entwurf 7-3 - aktualisiert: 23.11.2020, Zeitstempel - 12:00

### **Wissenschaftlicher Beweisgrund für die Rücknahme der Publikation von Corman et al. (hier im Weiteren „Corman-Drosten-Paper“ genannt) aufgrund inhärenter Trugschlüsse, die den PCR-Test unbrauchbar machen.**

*Revisionsbericht eines internationalen Konsortiums von Experten und Forschern im Bereich der Biowissenschaften Retraction Request Group (RRG) Corman-Drosten-Paper*

#### **Kurzer Revisionsbericht**

Dieses Paper wird zahlreiche schwerwiegende Mängel des Corman-Drosten-Papers aufzeigen, deren Bedeutung weltweit zu Fehldiagnosen von Infektionen geführt hat, die SARS-CoV-2 zugeschrieben werden und mit der Krankheit COVID-19 in Verbindung gebracht werden. Wir sind mit strikten Lockdowns konfrontiert, die das Leben und die Lebensgrundlagen der Menschen zerstört haben, mit eingeschränktem Zugang zu Bildung, und diese von Regierungen auf der ganzen Welt auferlegten Einschränkungen sind ein direkter Angriff auf die Grundrechte der Menschen und ihre persönlichen Freiheiten, was zu Kollateralschäden für ganze Volkswirtschaften im globalen Umfang führt.

Mit dem Corman-Drosten-Paper sind zehn fatale Probleme verbunden, die wir in den folgenden Abschnitten skizzieren und näher erläutern werden.

Das erste und wichtigste Problem besteht darin, dass das neue Coronavirus SARS-CoV-2 (in der Publikation 2019-nCoV und im Februar 2020 von einem internationalen Konsortium von Virosexperten als SARS-CoV-2 bezeichnet) auf (theoretischen) in silico-Sequenzen basiert, die von einem Labor in China [1] geliefert wurden, weil den Autoren zu diesem Zeitpunkt weder Kontrollmaterial von infektiösem ("live") oder inaktiviertem SARS-CoV-2 noch isolierte genomische RNA des Virus zur Verfügung stand.

Laut Corman et al: „Unser Ziel war es, robuste diagnostische Methoden für den Einsatz in Laboren des öffentlichen Gesundheitswesens zu entwickeln und einzusetzen, ohne dass Virusmaterial zur Verfügung stand.“ [1]

Der Schwerpunkt sollte hier auf die beiden genannten Ziele gelegt werden: a) Entwicklung und b) Einsatz eines diagnostischen Tests zur Verwendung in Labors des öffentlichen Gesundheitswesens. Diese Ziele können nicht erreicht werden, wenn kein tatsächliches Virusmaterial zur Verfügung steht (z.B. zur Bestimmung der infektiösen Viruslast). In jedem Fall kann nur ein Protokoll mit maximaler Genauigkeit das verbindliche und primäre Ziel in einem Szenario dieser Größenordnung sein. Die Bestimmung der kritischen Viruslast ist eine obligatorische Information, und es liegt in der Verantwortung der Gruppe von Christian Drosten, diese Experimente durchzuführen und die entscheidenden Daten zu liefern.

Nichtsdestotrotz wurden diese in silico-Sequenzen verwendet, um eine RT-PCR-Testmethode zur Identifizierung des genannten Virus zu entwickeln. Dieses Modell basierte auf der Annahme, dass das neuartige Virus dem SARS-CoV aus dem Jahr 2003 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 als Kontrollmaterial für die Sarbeco-Komponente entwickelt. Wir wissen dies aufgrund unserer persönlichen E-Mail-Kommunikation mit Dr. Adam Meijer [17], einem der Co-Autoren des Corman-Drosten-Papers. Diese Methode zur Modellierung von SARS-CoV-2 wurde in dem Corman-Drosten-Paper wie folgt beschrieben:

*„die Einrichtung und Validierung eines diagnostischen Arbeitsablaufs für das 2019-nCoV-Screening und die spezifische Bestätigung, der in Abwesenheit verfügbarer Virusisolate oder Original-Patientenproben 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“.*

Wir können eindeutig den Schluss ziehen:

1. Die Validierung erfolgte nur innerhalb des Labors und nicht wie für die In-vitro-Diagnostik erforderlich. Genau diese Tatsache hat sich auch nach 10 Monaten Pandemie nicht geändert.
2. Ein Design, das sich lediglich auf enge genetische Verwandte stützt, erfüllt nicht das Ziel eines "robusten diagnostischen Tests", da Kreuzreaktivität (und damit falsch positive Ergebnisse) vorprogrammiert sind.

Es gibt zahlreiche weitere schwerwiegende wissenschaftliche Fehler hinsichtlich des biomolekularen Designs der Primer, der PCR-Methode sowie der molekularen Validierung der im Corman-Drosten-Paper beschriebenen PCR-Produkte und -Methoden, die in den folgenden Kapiteln im Detail untersucht werden. Das Paper selbst deutet bereits an, dass dieser Test selbst unter kontrollierten Laborbedingungen eine große Anzahl falsch positiver Ergebnisse erzeugt, was ihn als zuverlässige Virus-Screeningmethode für ganze Populationen in einer laufenden Pandemie völlig ungeeignet macht. Angesichts der weitreichenden Auswirkungen, einschließlich Quarantänemaßnahmen, Lockdowns, Ausgangssperren, Auswirkungen auf die Ausbildung usw., muss dieses Paper unverzüglich zurückgezogen werden.

## **Hintergrund und Fehler in der RT-PCR**

Die Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine wichtige biomolekulare Technologie zur schnellen Identifizierung seltener RNA-Moleküle. In einem ersten Schritt werden die in der Probe vorhandenen RNA-Moleküle umgekehrt transkribiert, um cDNA zu erhalten. Die cDNA wird dann in der Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung eines spezifischen Primerpaares und eines thermostabilen DNA-Polymerase-Enzyms amplifiziert. Die Technologie ist hochempfindlich und ihre Nachweisgrenze liegt theoretisch bei 1 Molekül cDNA. Die Spezifität der PCR wird durch biomolekulare Designfehler stark beeinflusst.

## **Was ist beim Design eines RT-PCR-Tests und des in der Corman-Drosten-Publikation beschriebenen quantitativen RT-qPCR-Tests wichtig?**

1. Die Primer und Probes:
  - a) Die Konzentration der Primer und Probes muss im optimalen Bereich (100-200 nM) liegen.
  - b) müssen für das Zielgen, das man verstärken will, spezifisch sein

c) müssen einen optimalen Prozentsatz des GC-Gehalts im Verhältnis zu den gesamten Stickstoffbasen aufweisen (mindestens 40%, maximal 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) Temperatur der DNA-Amplifikation (TaqPol-spezifisch)

c) T<sub>m</sub>; die Annealing-Temperatur (die Temperatur, bei der die Primer und Probes die Zielbindung/Lösung erreichen, darf 2°C pro Primerpaar nicht überschreiten). T<sub>m</sub> hängt stark vom GC-Gehalt der Primer ab

3. Die Anzahl der Amplifikationszyklen (weniger als 35; vorzugsweise 25-30 Zyklen); Im Falle des Virusnachweises werden bei >35 Zyklen nur Signale detektiert, die nicht mit dem infektiösen Virus korrelieren, wie es durch Isolierung in Zellkultur bestimmt wird [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 & den USA der Fall ist), beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass die Person tatsächlich infiziert ist, weniger als 3%; die Wahrscheinlichkeit, dass das Ergebnis ein falsch positives Ergebnis ist, liegt bei 97% [siehe 13].

4. Molekularbiologische Validierungen; amplifizierte PCR-Produkte müssen validiert werden, indem man die Produkte entweder in einem Gel mit einem DNA-Linierer oder durch direkte DNA-Sequenzierung laufen lässt

5. Es sollten Positiv- und Negativkontrollen angegeben werden, um den spezifischen Virusnachweis zu bestätigen/zu widerlegen

6. Es sollte eine Standardarbeitsanweisung (Standard Operational Procedure, SOP) zur Verfügung stehen, die die oben genannten Parameter eindeutig spezifiziert, so dass alle Laboratorien in der Lage sind, exakt die gleichen Testbedingungen einzurichten. Eine validierte universelle SOP ist unerlässlich, da sie den Vergleich von Daten innerhalb und zwischen Ländern ermöglicht.

### **Kleinere Bedenken und Formalitäten innerhalb des Corman-Drosten-Papers**

1. In Tabelle 1 des Corman-Drosten-Papers sind verschiedene Abkürzungen angegeben - "nM" ist angegeben, "nm" nicht. Weiter in Bezug auf die korrekte Nomenklatur bedeutet "nm" "Nanometer", was für eine chemische Konzentration unsinnig ist.

2. Es ist der allgemeine Konsens, genetische Sequenzen immer in der 5'-3'-Richtung zu schreiben, einschließlich der Reverse-Primer. Es ist höchst ungewöhnlich, Alignments mit umgekehrter komplementärer Schreibweise der Primersequenz durchzuführen, wie es die Autoren in Abbildung 2 getan haben. Hier wird zusätzlich eine „Wackel“-Base als „y“ markiert, ohne Beschreibung der Basen, für die das Y steht.

3. Zwei irreführende Fallstricke des Corman-Drosten-Papers sind, dass ihre Tabelle 1 weder T<sub>m</sub>-Werte (Annealing-Temperaturwerte) noch GC-Werte (Anzahl von G und C in den Sequenzen als %-Wert der Gesamtbasen) enthält.

## Hauptbedenken gegen das Corman-Drosten-Paper

### A) Hintergrund

Die Autoren beschreiben den Hintergrund für ihre wissenschaftliche Arbeit folgendermaßen: *"Der anhaltende Ausbruch des vor kurzem aufgetauchten neuartigen Coronavirus (2019-nCoV) stellt eine Herausforderung für die Laboratorien des öffentlichen Gesundheitswesens dar, da Virusisolate nicht verfügbar sind, während es immer mehr Anzeichen dafür gibt, dass der Ausbruch weiter verbreitet ist als ursprünglich angenommen und die internationale Ausbreitung durch Reisende bereits stattfindet".*

Laut BBC News [15] & Google Statistics [19] 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 Laboratorien des öffentlichen Gesundheitswesens aus, obwohl es zu diesem Zeitpunkt keine substanziellen Beweise dafür gab, dass der Ausbruch weiter verbreitet war als ursprünglich angenommen?

### B) Methoden und Ergebnisse

#### 1. Primer-Entwurf

##### 1a) Falsche Primer-Konzentrationen

Zuverlässige und genaue PCR-Testprotokolle werden normalerweise unter Verwendung von 100 nM bis 200 nM pro Primer erstellt [18]. In der Arbeit von Corman-Drosten beobachten wir ungewöhnlich hohe und variierende Primerkonzentrationen für mehrere Primer (Tabelle 1). Für die Primerpaare RdRp\_SARSr-F und RdRp\_SARSr-R werden 600 nM bzw. 800 nM beschrieben. In ähnlicher Weise wird für die Primerpaare N\_Sarbeco\_F und N\_Sarbeco\_R 600 nM bzw. 800 nM empfohlen. Es sollte klar sein, dass diese Konzentrationen viel zu hoch sind, um für spezifische Amplifikationen von Zielgenen optimal zu sein. Es gibt keinen spezifizierten Grund, diese extrem hohen Konzentrationen von Primern in diesem Protokoll zu verwenden. Vielmehr führen diese Konzentrationen zu erhöhter unspezifischer Bindung und Amplifikation von PCR-Produkten.

*Tabelle 1: Primer und Probes (adaptiert von Corman-Drosten-Paper; fehlerhafte Primerkonzentrationen sind hervorgehoben)*

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence <sup>a</sup>	Concentration <sup>b</sup>
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

<sup>a</sup> W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C. FAM: 6-carboxyfluorescein; BBQ: blackberry quencher.  
<sup>b</sup> 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 („wacklige“) Primer- und Probes-Sequenzen

Um reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es unerlässlich, die Primerpaare eindeutig zu definieren. Im Corman-Drosten-Paper beobachteten wir sechs nicht spezifizierte Positionen, die durch die Buchstaben R, W, M und S gekennzeichnet sind (Tabelle 2). Der Buchstabe W bedeutet, dass es an dieser Position entweder ein A oder ein T geben kann; R bedeutet, dass es entweder ein G oder ein A geben kann; M bedeutet, dass die Position entweder ein A oder ein C sein kann; der Buchstabe S bedeutet, dass es an dieser Position entweder ein G oder ein C geben kann.

Diese hohe Anzahl von Varianten ist nicht nur ungewöhnlich, sie ist auch für Laboratorien höchst verwirrend. Diese sechs nicht spezifizierten Positionen könnten leicht 14 alternative Primersequenzen erzeugen, die sich nicht auf SARS-CoV-2 beziehen (2 verschiedene RdRp\_SARSr\_F-Primer + 8 verschiedene RdRp\_SARS\_P1-Probes + 4 verschiedene RdRp\_SARSr\_R). 14 mögliche Variationen würden zu Ergebnissen führen, die nicht einmal SARS-CoV-2-verwandt sind. Daher eignet sich die verwirrende unspezifische Beschreibung im Corman-Drosten-Paper nicht als operatives Standardprotokoll. Diese nicht näher spezifizierten Positionen hätten unmissverständlich formuliert werden müssen.

Diese wackeligen Sequenzen haben bereits zu einer Quelle der Besorgnis in der Praxis geführt und zu einem Leserbrief von Pillonel et al. [10] über eklatante Fehler in den beschriebenen Sequenzen geführt. Diese Fehler sind auch in der Beilage von Corman et al. offensichtlich.

*Tabelle 2: Primer und Probes (nach dem Corman-Drosten-Paper; unspezifizierte („wacklige“) Nukleotide in den Primern sind hervorgehoben)*

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence <sup>a</sup>	Concentration <sup>b</sup>
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.  
<sup>b</sup> 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-Paper 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. Das E-Gen hat 1 Unsicherheit in der Vorwärts-Primer-Probe, 2 Unsicherheiten in der Rückwärts-Primer-Probe und das RdRp-Gen hat 3 „Wackel“-Punkte an der zweiten RdRp-Primer-Probe.

Im Corman-Drosten-Paper heißt es „Bemerkenswert ist, dass der N-Gen-Assay ebenfalls gut funktionierte, aber keiner intensiven weiteren Validierung unterzogen wurde, da er etwas weniger sensitiv war.“

Der N-Gen-Prüfung wird weder in der WHO-Empfehlung (Abbildung 1) als obligatorischer und entscheidender dritter Bestätigungsschritt vorgeschlagen, noch wird er im Corman-Drosten-Paper als wichtige optionale Bestätigung „für einen routinemäßigen Arbeitsablauf“ (Tabelle 2) hervorgehoben.

Folglich hätte, wenn alle drei Gen-PCRs als Bestätigungstests einbezogen worden wären, dies zu einem fast ausreichenden Virus-RNA-Nachweis-Diagnostik-Werkzeug-Protokoll geführt. Nichtsdestotrotz würde das Protokoll unter Berücksichtigung aller anderen Konstruktionsfehler immer noch hinter jeder "guten Laborpraxis" zurückbleiben. Drei Bestätigungs-Assay-Schritte würden zumindest die Fehler und Unsicherheiten bei jedem „Fall“-Schritt in Bezug auf „Wackel“-Punkte minimieren, bis nichts mehr übrig bleibt.

Allerdings werden im Corman-Drosten-Paper und im entsprechenden offiziellen WHO-Protokoll nur zwei Gene für den Routineablauf angegeben. Daher wurden in fast allen Testverfahren weltweit nur 2 Primer-Matches anstelle von allen drei verwendet. Dieser leichtfertige Fehler macht das gesamte Testprotokoll unbrauchbar, wenn es darum geht, genaue Testergebnisse zu liefern, die in einer laufenden Pandemie von echter wissenschaftlicher Bedeutung sind.

Abbildung 1: Die N-Gen-Bestätigungsprüfung wird in der offiziellen WHO-Empfehlung des Drosten-Corman-Protokolls [8] nicht als notwendiger dritter Schritt hervorgehoben und auch in der Veröffentlichung von Eurosurveillance nicht als entscheidender Schritt für eine höhere Testgenauigkeit genannt.

## Hintergrund

Wir haben bekannte SARS- und SARS-verwandte Coronaviren (Fledermausviren aus unseren eigenen Studien sowie Literaturquellen) verwendet, um ein nicht redundantes Alignment zu generieren (Auszüge in Anhang). Wir haben diagnostische RT-PCR-Assay-Kandidaten vor der Veröffentlichung der ersten Sequenz von 2019-nCoV entwickelt. Nach der Sequenzfreigabe wurden die folgenden Assays basierend auf ihrer Übereinstimmung mit 2019-nCoV gemäß Inspektion von Sequenzalignment und anfänglicher Bewertung ausgewählt (1 und 2).

**Alle Assays können genomische SARS-CoV-RNA als positive Kontrolle verwenden. Synthetische Kontroll-RNA für die 2019CoV E-Gen-Assay ist über EVAg erhältlich. Die synthetische Kontrolle für 2019-nCoV RdRp wird voraussichtlich ab dem 21. Januar über EVAg verfügbar sein.**

**First-Line-Screening-Assay: E-Gen-Assay**  
**Bestätigungsassay: RdRp-Gen-Assay**

1c) Fehlerhafter GC-Gehalt (diskutiert in 2c, zusammen mit Annealing-Temperatur ( $T_m$ ))

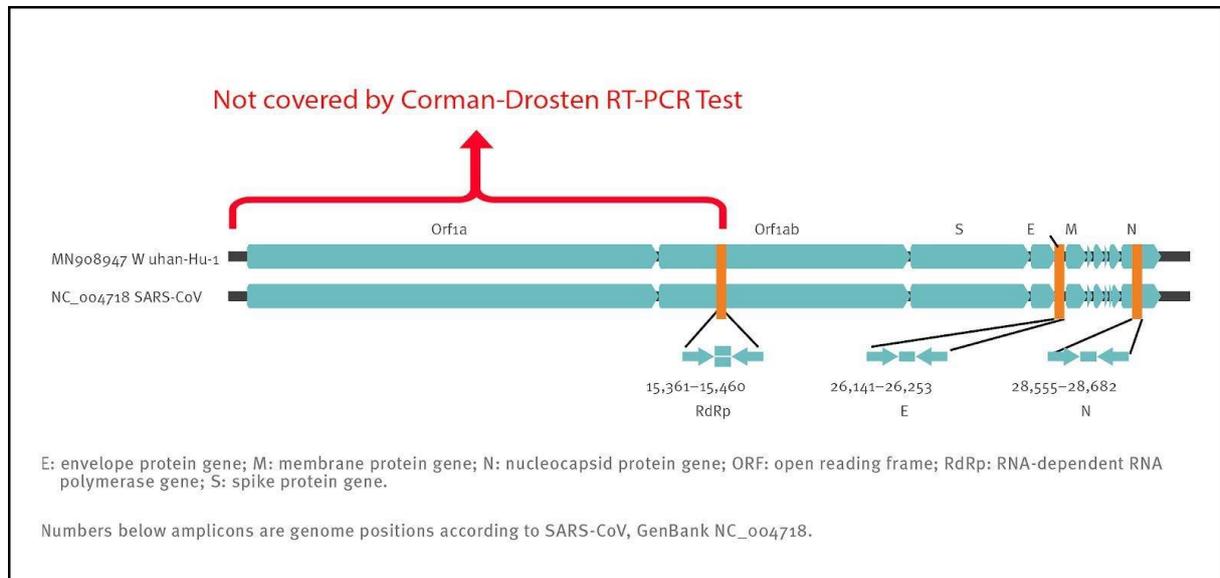
1d) Nachweis viraler Gene

Die RT-PCR wird für die Primärdiagnostik einer Infektion nicht empfohlen, da diese immer symptombezogen und ärztlich durchgeführt werden sollte. Sie kann jedoch zur Unterstützung der Differentialdiagnose des Arztes eingesetzt werden, wenn zwischen verschiedenen Infektionen der Lunge unterschieden werden muss (Grippe, Covid-19 und SARS haben sehr ähnliche Symptome). Für eine Bestätigungsdiaagnose eines spezifischen Virus müssen mindestens 3 Primerpaare eingesetzt werden, um 3 virusspezifische Gene nachzuweisen. Vorzugsweise sollten diese Gene möglichst weit voneinander entfernt im viralen Genom gefunden werden (entgegengesetzte Enden eingeschlossen).

Obwohl das Corman-Drosten-Paper 3 Primer beschreibt, decken diese Primer nur etwa die Hälfte des Virusgenoms ab. Selbst wenn wir also in einer Probe drei positive Signale erhalten (d.h. die drei Primerpaare ergeben 3 verschiedene Amplifikationsprodukte), ist dies kein Beweis für das Vorhandensein eines Virus. Ein besseres Primerdesign würde terminale Primer an beiden Enden des Virusgenoms haben. Dies liegt daran, dass das gesamte virale Genom abgedeckt wäre und drei positive Signale bei der Unterscheidung zwischen einem vollständigen (und damit potenziell infektiösen) Virus und fragmentierten viralen Genomen (ohne infektiöse Potenz) besser funktionieren würden. Um etwas von Bedeutung für die Infektiosität des Virus zu sagen, hätte das Orf1-Gen, das für das essentielle Replikase-Enzym der SARS-CoV-Viren kodiert, als Zielmolekül aufgenommen werden müssen. Die Positionierung der Targets in der Region des viralen Genoms, die am stärksten und variabelsten transkribiert wird, ist eine weitere Schwachstelle des Protokolls. Kim et al. zeigen eine hochvariable 3'-Expression von subgenomischer RNA in Sars-CoV-2 [11]. Diese RNAs werden als Signaturen für asymptomatische und nicht infektiöse Patienten aktiv überwacht [12].

Dies ist ein schwerer Designfehler, da der Test nicht zwischen dem gesamten Virus und viralen Fragmenten unterscheiden kann. Der Test kann nicht als Diagnostikum für SARS-Viren verwendet werden.

Abbildung 2: Relative Positionen von Amplikon-Targets auf dem SARS-Coronavirus und dem 2019 neuartigen Coronavirus-Genom. ORF: offener Leserahmen; RdRp: RNA-abhängige RNA-Polymerase. Zahlen unterhalb von Amplikon sind Genompositionen gemäß SARS-CoV, NC\_004718 [1];



## 2. Die Temperatur, bei der alle Reaktionen ablaufen

### 2a) DNA-Schmelztemperatur (>92°).

Ausreichend behandelt im Corman-Drosten-Paper.

### 2b) Temperatur der DNA-Amplifikation.

Adäquat behandelt im Corman-Drosten-Paper.

### 2c) Fehlerhafter GC-Gehalt und $T_m$

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 maximal 60% der Amplifikation betragen. Wie in Tabelle 3 angegeben, liegen drei der im Corman-Drosten-Paper beschriebenen Primer nicht innerhalb des normalen Bereichs für den GC-Gehalt. Zwei Primer (RdRp SARSr F und RdRp SARSr R) weisen einen ungewöhnlichen und sehr niedrigen GC-Wert von 28%-31% für alle möglichen Varianten von „Wackel“-Basen auf, während Primer E Sarbeco F einen GC-Wert von 34,6% aufweist (Tabelle 3 und zweites Feld von Tabelle 3).

Es ist zu beachten, dass der GC-Gehalt aufgrund seiner drei Wasserstoffbrückenbindungen in der Basenpaarung weitgehend die Bindung an sein spezifisches Ziel bestimmt. Je niedriger der GC-Gehalt des Primers, desto geringer ist also seine Bindungsfähigkeit an seine spezifische Zielgenesequenz (d.h. an das nachzuweisende Gen). Das heißt, damit eine Zielsequenz erkannt wird, müssen wir eine Temperatur wählen, die möglichst nahe an der tatsächlichen Annealing-Temperatur liegt (Best-Practice-Wert), damit sich der Primer nicht wieder ablöst, und gleichzeitig die Zielsequenz spezifisch auswählen.

Wenn der T<sub>m</sub>-Wert sehr niedrig ist, wie man bei allen wackeligen Varianten der RdRp-Reverse-Primer beobachtet, können die Primer unspezifisch an mehrere Ziele anbinden, was die Zuverlässigkeit des Tests weiter verringert. Die Annealing-Temperatur (T<sub>m</sub>) ist entscheidend und wesentlich für die Bewertung der Genauigkeit von qPCR-Protokollen. Beste Praxis: Beide Primer (vorwärts und rückwärts) sollten einen fast ähnlichen Wert haben, vorzugsweise den identischen Wert.

Wir haben die frei verfügbare Primerdesign-Software Primer-BLAST [9] verwendet, um die Best-Practice-Werte für alle im Corman-Drosten-Paper verwendeten Primer zu testen (Tabelle 3). Wir versuchten, einen T<sub>m</sub>-Wert von 60° C zu finden, während wir in ähnlicher Weise den höchstmöglichen GC%-Wert für alle Primer anstrebten. Ein maximaler T<sub>m</sub>-Unterschied von 2° C innerhalb der Primerpaare wurde als akzeptabel erachtet. Bei der Prüfung der im Corman-Drosten-Paper spezifizierten Primerpaare beobachteten wir für das Primerpaar1 (RdRp\_SARSr\_F und RdRp\_SARSr\_R) einen Unterschied von 10° C bezüglich der Annealing-Temperatur T<sub>m</sub>. Dies ist ein sehr schwerwiegender Fehler und macht das Protokoll als spezifisches Diagnosewerkzeug nutzlos.

Zusätzliche Tests zeigten, dass nur das Primerpaar zur Verstärkung des N-Gens (N\_Sarbeco\_F und N\_Sarbeco\_R) den adäquaten Standard für die Durchführung eines diagnostischen Tests erreicht, da es einen ausreichenden GC-Gehalt aufweist und die T<sub>m</sub>-Differenz zwischen den Primern (N\_Sarbeco\_F und N\_Sarbeco\_R) 1,85° C beträgt (unterhalb des entscheidenden Maximums von 2° C Differenz). Zusätzlicher Hinweis: Dies ist das Gen, das weder in den Virusproben (Tabelle 2) getestet noch als Bestätigungstest beschrieben wird. Zusätzlich zu den stark variablen Schmelztemperaturen und degenerierten Sequenzen in diesen Primern sind die dNTPs (0,4uM) 2x höher als für eine hochspezifische Amplifikation empfohlen. Der Reaktion wird zusätzlich Magnesiumsulfat zugesetzt. Dies kann in Kombination mit einer niedrigen Annealing-Temperatur zu unspezifischen Amplifikationen führen. Wenn zusätzliches Magnesium für die qPCR benötigt wird, sollte die Assay-Spezifität weiter untersucht werden.

Die hier beschriebenen Designfehler sind so schwerwiegend, dass eine spezifische Amplifikation von SARS-CoV2 nach dem Protokoll des Corman-Drosten-Papers höchst unwahrscheinlich ist.

*Tabelle 3: GC-Gehalt der Primer und Probes (adaptiert vom Corman-Drosten-Paper; Aberrationen von optimierten GC-Gehalten sind hervorgehoben. Das zweite Feld zeigt eine tabellarische Auflistung aller Primer-BLAST-Best-Practices-Werte für alle Primer und Probes, die im Corman-Drosten-Paper von Prof. Dr. Ulrike Kämmerer & 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_SARsF-F	GTGARATGGTCATGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARsF-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV.
	RdRp_SARsF-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Use 100 nM per reaction and mix with P1 Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs.
E gene	RdRp_SARsF-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	Use 800 nM per reaction
	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 400 nM per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 200 nM per reaction
N gene	E_Sarbeco_R	ATATTGAGCAGTACGCACACA	Use 400 nM per reaction
	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCAGCAATC	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	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	ATATTGAGCAGTACGCACACA	Minus	22	26381	26360	60.93	45.45	7.00	1.00	
N-Sarbeco_F	CACATTGGCACCAGCAATC	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_SARsF-F	GTGARATGGTCATGTGGCGG		22			63.74	59.09	4.00		
RdRp_SARsF-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	
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	
<b>Probes:</b>										
RdRp-SARsF-P2	CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC		25			64.89	56.00	6.00	5.00	
RdRp-SARsF-P1	CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC									
E-Sarbeco-P1	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG		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 Verstärkungszyklen

Es muss bemerkt werden, dass im Corman-Drosten-Paper 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 SOP basieren, einschließlich einer validierten und festgelegten Anzahl von PCR-Zyklen (Ct-Wert), bei denen eine Probe als positiv oder negativ eingestuft wird. Der maximale halbwegs zuverlässige Ct-Wert beträgt 30 Zyklen. Oberhalb eines Ct-Wertes von 35 Zyklen muss eine zunehmende Anzahl falsch positiver Ergebnisse berücksichtigt werden.

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

Zitiert nach Jaafar et al. 2020 [13]: „Bei einem Ct-Wert von 35, dem Wert, den wir für die Meldung eines positiven PCR-Ergebnisses verwendet haben, sind <3% der Kulturen positiv.“

Weiter zeigen wissenschaftliche Studien, dass nur nicht infektiöse (tote) Viren mit Ct-Werten von 35 nachgewiesen werden [2].

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 nach dem empfohlenen Corman-Drosten WHO-Protokoll durchführen (Abbildung 3), aber dann muss man auch einen angemessenen Ct-Wert einhalten (der 30

nicht überschreiten sollte). Aber ein analytisches Ergebnis mit einem Ct-Wert von 45 ist wissenschaftlich und diagnostisch absolut bedeutungslos (ein vernünftiger Ct-Wert sollte 30 nicht überschreiten). All dies sollte sehr klar kommuniziert werden. Es ist ein großer Fehler, dass das Corman-Drosten-Paper nicht den maximalen Ct-Wert erwähnt, bei dem eine Probe mehrdeutig als positives oder negatives Testergebnis betrachtet werden kann. Dieser wichtige Schwellenwert für den Zyklus wird auch in den bisherigen Folgebeiträgen nicht angegeben.

Abbildung 3: RT-PCR-Kit-Empfehlung im offiziellen Corman-Drosten WHO-Protokoll [8]. Es ist lediglich ein „Cycler“-Wert (Zyklen) ohne entsprechenden und wissenschaftlich sinnvollen Ct (Cutoff-Wert) zu finden. Dieser oder irgendein anderer Zykluswert ist im aktuellen Corman-Drosten-Paper nirgends zu finden.

3. Discriminatory assay		
<b>RdRp assay:</b>		
<b>MasterMix:</b>		
	<b>Per reaction</b>	
H <sub>2</sub> O (RNase free)	1.1 µl	
2x Reaction mix*	12.5 µl	
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	0.4 µl	
BSA (1 mg/ml)**	1 µl	
Primer RdRP_SARSr-F2 (10 µM stock solution)	1.5 µl	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
Primer RdRP_SARSr-R1 (10 µM stock solution)	2 µl	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
Probe RdRP_SARSr-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	
<p>* Thermo Fischer/Invitrogen: SuperScriptIII OneStep RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase  ** MgSO<sub>4</sub> (50 mM) [Sigma], This component is not provided with the OneStep RT-PCR kit  *** non-acetylated [Roche].</p>		
<b>Cycler:</b>		
55°C	10'	
94°C	3"	
94°C	15"	
58°C	30"	45x

#### 4. Molekularbiologische 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 von PCR-Produkten sollte durchgeführt werden, indem man entweder das PCR-Produkt in einem 1%igen Agarose-EtBr-Gel zusammen mit einem Größenindikator (DNA-Linierer oder DNA-Leiter) laufen lässt, so dass die Größe des Produkts abgeschätzt werden kann. Die Größe muss der berechneten Größe des Amplifikationsprodukts entsprechen. Noch besser ist es jedoch, das Amplifikationsprodukt zu sequenzieren. Letzteres gibt 100% Sicherheit über die Identität des Amplifikationsprodukts. Ohne molekulare Validierung kann man sich über die Identität der amplifizierten PCR-Produkte nicht sicher sein. In Anbetracht der oben beschriebenen schweren Designfehler können die amplifizierten PCR-Produkte alles sein.

Auch der Fall der kleinen Fragmente der qPCR (ca. 100bp) wird im Corman-Drosten-Paper nicht erwähnt: Es könnte entweder 1,5% Agarose-Gel oder sogar ein Acrylamid-Gel sein. Die Tatsache, dass diese PCR-Produkte nicht auf molekularer Ebene validiert wurden, ist ein weiterer schwerer Fehler des Corman-Drosten-Papers und macht ihr Protokoll als spezifisches diagnostisches Werkzeug nutzlos.

## 5. Positiv- und Negativkontrollen zur Bestätigung/Widerlegung des spezifischen Virusnachweises.

Die im Corman-Drosten-Paper 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 [1] geliefert wurden, da zum Zeitpunkt der Entwicklung des PCR-Tests kein Kontrollmaterial von infektiösem ("live") oder inaktiviertem SARS-CoV-2 für die Autoren zur Verfügung stand. Der PCR-Test wurde daher unter Verwendung der Sequenz des bekannten SARS-CoV als Kontrollmaterial für die Sarbeco-Komponente konzipiert (Dr. Meijer, Co-Autor Corman-Drosten-Paper in einem E-Mail-Austausch mit Dr. Peter Borger) [17].

Bei allen Personen, die positiv auf den RT-PCR-Test, wie im Corman-Drosten-Paper beschrieben, getestet werden, wird davon ausgegangen, dass sie positiv für SARS-CoV-2-Infektionen sind. Es gibt drei schwere Fehler in ihrer Annahme. Erstens: Ein positiver Test auf die im Corman-Drosten-Paper beschriebenen RNA-Moleküle kann nicht mit „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) gezeigt wurde, war der Corman-Drosten-Test nicht für den Nachweis des Virus in voller Länge, sondern nur für den Nachweis eines Fragments des Virus ausgelegt. Wir kamen bereits zu dem Schluss, dass dies den Test als diagnostischen Test für SARS-Virusinfektionen ungeeignet macht.

Zweitens, konnte keine wirklich spezifische Positivkontrolle - bei der es sich nur um die SARS-CoV-2-RNA handeln kann - zuverlässige Ergebnisse liefern.

Drittens heißt es im Corman-Drosten-Paper:

*„Um zu zeigen, dass mit den Tests auch andere fledermausassoziierte SARS-Viren nachgewiesen werden können, haben wir mit dem E-Gen-Assay sechs von Fledermäusen stammende Kotproben getestet, die von Drexler et al. [...] und Muth et al. [...] zur Verfügung standen. Diese viruspositiven Proben stammten von europäischen Nashornfledermäusen.*

*Der Nachweis dieser phylogenetischen Ausreißer innerhalb der SARS-verwandten CoV-Kategorie lässt vermuten, dass wahrscheinlich alle asiatischen Viren nachgewiesen werden. Dies würde theoretisch eine breite Sensitivität selbst im Falle mehrerer unabhängiger Akquisitionen von Virusvarianten aus einem Tierreservoir gewährleisten“.*

Diese Aussage zeigt, dass das im RT-PCR-Test verwendete E-Gen, wie im Corman-Drosten-Paper beschrieben, nicht spezifisch für SARS-CoV2 ist. Die E-Gen-Primer weisen auch ein breites Spektrum anderer SARS-Viren nach.

Das Genom des Coronavirus ist das größte aller RNA-Viren, die den Menschen infizieren, und sie alle haben eine sehr ähnliche molekulare Struktur. Dennoch haben SARS-CoV und SARS-CoV-2 zwei hochspezifische genetische Fingerabdrücke, die sie von den anderen Coronaviren unterscheiden. Erstens ist eine einzigartige Fingerabdruck-Sequenz (KTFPPTEPTEPKDKKKKK) im N-Protein von SARS-CoV und SARS-CoV2 vorhanden [3, 4, 5]. Zweitens enthalten sowohl SARS-CoV als auch SARSCoV2 das HE-Protein nicht, während alle anderen Coronaviren dieses Gen besitzen [3, 4, 5]. Um also ein SARS-CoV- und SARS-CoV2-PCR-Produkt spezifisch nachzuweisen, sollte die obige Region im N-Gen das Amplifizierungsziel sein. Ein zuverlässiger diagnostischer Test sollte sich auf diese spezifische Region im N-Gen konzentrieren. Die PCR für dieses N-Gen wurde vom Drosten-

Corman-Paper weder weiter validiert noch als Testgen empfohlen, weil sie mit der SARS-CoV-Originalprobe „nicht so empfindlich“ ist.

Darüber hinaus macht das Fehlen des HE-Gens sowohl bei SARS-CoV als auch bei SARS-CoV2 dieses Gen zur idealen Negativkontrolle zum Ausschluss anderer Coronaviren. Das Corman-Drosten-Paper enthält weder diese Negativkontrolle, noch enthält es andere Negativkontrollen. Der PCR-Test im Corman-Drosten-Paper enthält daher weder eine einzige Positivkontrolle noch eine Negativkontrolle, um das Vorhandensein anderer Coronaviren auszuschließen. Dies ist ein weiterer wesentlicher Konstruktionsfehler, der den Test für die Diagnose ungeeignet macht.

## **6. Die Standard-Arbeitsanweisung (SOP) ist nicht verfügbar.**

Es sollte eine Standardarbeitsanweisung (Standard Operational Procedure, SOP) zur Verfügung stehen, die die oben genannten Parameter eindeutig spezifiziert, so dass alle Laboratorien in der Lage sind, exakt die gleichen Testbedingungen einzurichten. Eine validierte universelle SOP ist unerlässlich, da sie einen Vergleich der Daten innerhalb der Länder und zwischen den Ländern ermöglicht. Es ist sehr wichtig, alle Primer-Parameter eindeutig zu spezifizieren. Dies ist nicht geschehen. Außerdem ist der Ct-Wert, der angibt, wann eine Probe als positiv oder negativ zu betrachten ist, nicht spezifiziert. Es wird auch nicht angegeben, wann eine Probe als mit SARS-CoV-Viren infiziert gilt. Wie oben gezeigt, kann der Test nicht zwischen Virus und Virusfragmenten unterscheiden, daher ist der Ct-Wert, der die Positivität anzeigt, wirklich wichtig. Dieser Ct-Wert hätte in der Standardarbeitsanweisung (SOP) beschrieben und online gestellt werden müssen, so dass alle Laboratorien, die diesen Test durchführen, exakt die gleichen Randbedingungen haben. Es weist auf eine fehlerhafte Wissenschaft hin, dass es eine solche SOP nicht gibt. Den Labors steht es somit frei, den Test so durchzuführen, wie sie es für angemessen halten, was zu einer enormen Variationsbreite führt. Die Laboratorien in ganz Europa stehen vor einer Menge Fragen. Welche Primer sollen sie bestellen? Welche Nukleotide sollen sie an den undefinierten Stellen eintragen? Welchen Tm-Wert sollen sie wählen? Wie viele PCR-Zyklen sollen sie durchführen? Und bei welchem Ct-Wert ist die Probe positiv? Und bei welchem Ct-Wert ist sie negativ? Und wie viele Gene sollen sie testen? Sollen alle Gene getestet werden? Oder nur das E und das RpRd-Gen, wie in Tabelle 2 des Corman-Drosten-Papers gezeigt? Oder auch das N-Gen? Und was ist ihre Negativkontrolle? Was ist ihre Positivkontrolle? Das Corman-Drosten-Paper ist so vage und fehlerhaft aufgebaut, dass man in Dutzende verschiedene Richtungen gehen kann. Nichts ist standardisiert, es gibt keine SOP, es ist ein Rätsel. Dies ist eine außerordentlich fehlerhafte Wissenschaft.

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

Der im Corman-Drosten-Paper 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" erzeugt. Die Definition von "falsch positiv" ist eine negative Probe, die zunächst ein positives Ergebnis erzielt, aber nach erneuter Prüfung mit demselben Test negativ ist. Falsch-positive Proben sind fehlerhaft positive Testergebnisse, d.h. negative Proben, die positiv getestet werden. Und dies ist in der Tat das, was man im Corman-Drosten-Paper findet. Auf Seite 6 des Manuskript-PDFs zeigen die Autoren, dass selbst unter gut kontrollierten Laborbedingungen ein beträchtlicher Prozentsatz falsch-positiver Ergebnisse mit diesem Test erzeugt wird:

*„In vier einzelnen Testreaktionen zeigte sich eine schwache anfängliche Reaktivität, die jedoch bei erneuten Tests mit demselben Assay negativ war. Diese Signale waren nicht mit einem bestimmten Virus assoziiert, und für jedes Virus, bei dem eine anfänglich positive Reaktivität auftrat, gab es andere Proben, die dasselbe Virus in einer höheren Konzentration enthielten, aber nicht positiv getestet wurden. Angesichts der Ergebnisse der oben beschriebenen umfassenden technischen Qualifikation wurde der Schluss gezogen, dass diese anfängliche Reaktivität nicht auf die chemische Instabilität der Real-Time-PCR-Proben und höchstwahrscheinlich auf Probleme bei der Handhabung zurückzuführen war, die durch die rasche Einführung neuer diagnostischer Tests und Kontrollen während dieser Evaluierungsstudie verursacht wurden.“ [1]*

Der erste Satz dieses Auszugs ist ein klarer Beweis dafür, dass der im Corman-Drosten-Paper beschriebene PCR-Test falsch positive Ergebnisse erzeugt. Selbst unter den gut kontrollierten Bedingungen des hochmodernen Charité-Labors sind vier von 310 Primärtests per Definition falsch positiv. Vier negative Proben wurden zunächst positiv getestet und waren dann bei einem erneuten Test negativ. Dies ist das klassische Beispiel für ein Falsch-Positiv! In diesem Fall identifizieren die Autoren sie nicht als falsch positiv, was intellektuell unehrlich ist.

Eine weitere verräterische Beobachtung im obigen Auszug ist, dass die Autoren die falsch positiven Ergebnisse als "Umgang mit Problemen, die durch die rasche Einführung neuer diagnostischer Tests verursacht werden", wegerklären. Stellen Sie sich die Labors vor, die den Test ohne alle notwendigen Informationen einführen müssen, die normalerweise in einer SOP beschrieben werden.

## **8. Das Corman-Drosten-Paper wurde offensichtlich nicht von Fachkollegen begutachtet**

„Vor der formellen Veröffentlichung in einer wissenschaftlichen Zeitschrift werden wissenschaftliche und medizinische Artikel traditionell durch „Peer Review“ zertifiziert. Dabei lassen sich die Herausgeber der Zeitschrift von verschiedenen Experten - sogenannten „Gutachtern“ - beraten, die das Paper bewertet haben und möglicherweise Schwachstellen in den Annahmen, Methoden und Schlussfolgerungen erkennen. In der Regel veröffentlicht eine Zeitschrift einen Artikel erst dann, wenn sich die Herausgeber davon überzeugt haben, dass die Autoren auf die Bedenken der Gutachter eingegangen sind und dass die vorgelegten Daten die in dem Paper gezogenen Schlussfolgerungen unterstützen.“

Das Corman-Drosten-Paper wurde am 21. Januar 2020 bei Eurosurveillance eingereicht und am 22. Januar 2020 zur Veröffentlichung angenommen. Am 23. Januar 2020 war das Paper online. Am 13. Januar 2020 wurde die Version 1-0 des Protokolls auf der offiziellen Website der WHO [16] veröffentlicht, die am 17. Januar 2020 als Dokumentversion 2-1 [8] aktualisiert wurde, noch bevor das Corman-Drosten-Paper am 23. Januar bei Eurosurveillance veröffentlicht wurde.

Dies wirft ernsthafte Fragen über den von Eurosurveillance durchgeführten Peer-Review-Prozess auf. Wurde dieses Paper überhaupt einem Peer-Review unterzogen?

Normalerweise ist ein Peer-Review-Verfahren ein zeitaufwändiger Prozess, da mindestens zwei Experten aus der Praxis das eingereichte Paper kritisch lesen und kommentieren müssen. Unseres Erachtens wurde dieses Paper nicht durch ein Peer-Review-Verfahren begutachtet. Vierundzwanzig Stunden reichen einfach nicht aus, um ein gründliches Peer-Review durchzuführen. Unsere Schlussfolgerung wird unterstützt durch die Tatsache, dass wir eine enorme Anzahl von sehr schwerwiegenden Designfehlern gefunden haben, die den

PCR-Test als Diagnostikum für das SARS-CoV-2-Virus völlig ungeeignet machen. Jeder Molekularbiologe, der mit dem RT-PCR-Design vertraut ist, hätte die schwerwiegenden Fehler, die im Corman-Drosten-Paper enthalten sind, vor dem eigentlichen Überprüfungsprozess leicht beobachtet. Wir baten Eurosurveillance am 26. Oktober 2020 darum, uns eine Kopie des Peer-Review-Berichts zukommen zu lassen. Bis heute haben wir diesen Bericht nicht erhalten und mit einem Schreiben vom 18. November 2020 hat das ECDC als Herausgeber von Eurosurveillance es aus vielen fragwürdigen Gründen abgelehnt, die Berichte offenzulegen.

## **9. Schlechte Verfahrensweise von Eurosurveillance: die Autoren sind die Herausgeber**

Ein letzter Punkt ist von großer Bedeutung. Es stellt sich heraus, dass zwei Autoren des Corman-Drosten-Papers, Christian Drosten und Chantal Reusken, auch Mitglieder des Editorial Board dieser Zeitschrift sind [7]. Es besteht also ein schwerwiegender Interessenkonflikt, der unseren Verdacht verstärkt, dass das Paper nicht von Fachkollegen begutachtet wurde. Unserer Meinung nach war die rasche Veröffentlichung einfach deshalb möglich, weil die Autoren auch Mitglied des Redaktionsausschusses von Eurosurveillance waren. Dies ist eine sehr anstößige und zweifelhafte Wissenschaftspolitik.

## **10. Schlussbemerkung: Das Corman-Drosten-Paper muss zurückgezogen werden**

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

1. Es gibt keinen spezifizierten Grund, diese extrem hohen Konzentrationen von Primern in diesem Protokoll zu verwenden. Die beschriebenen Konzentrationen führen zu erhöhten unspezifischen Bindungen und PCR-Produktamplifikationen, wodurch der Test als spezifisches diagnostisches Werkzeug zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet ist.
2. Sechs unspezifizierte „wackelige“ Positionen führen zu einer enormen Variabilität in der realen Laborimplementierung des Testdesigns; die verwirrende unspezifische Beschreibung im Corman-Drosten-Paper eignet sich nicht als operatives Standardprotokoll, wodurch der Test als spezifisches diagnostisches Werkzeug zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet ist.
3. Der Test kann nicht zwischen dem gesamten Virus und viralen Fragmenten unterscheiden. Daher kann der Test nicht als Diagnostikum für intakte (infektiöse) Viren verwendet werden, was den Test als spezifisches Diagnostikum zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet macht.
4. Eine Differenz von  $10^{\circ}$  C in Bezug auf die Annealing-Temperatur  $T_m$  für Primerpaar1 (RdRp\_SARSr\_F und RdRp\_SARSr\_R) ist ein sehr schwerwiegender Fehler und macht den Test als spezifisches Diagnose-Instrument zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet.
5. Ein schwerer Fehler ist das Auslassen des Ct-Wertes, wenn eine Probe als positiv und negativ betrachtet wird. Dieser Ct-Wert findet sich auch nicht in Folgeanträgen, so dass der Test als spezifisches diagnostisches Werkzeug zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet ist.

6. Die PCR-Produkte sind auf molekularer Ebene nicht validiert worden. Diese Tatsache macht das Protokoll als spezifisches Diagnostikum unbrauchbar und den Test als spezifisches Diagnostikum zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet.
7. Der PCR-Test enthält weder eine einzigartige Positivkontrolle zur Bewertung seiner Spezifität für SARS-CoV-2 noch eine Negativkontrolle zum Ausschluss anderer Coronaviren, was den Test als spezifisches Diagnoseinstrument zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet macht.
8. Das Corman-Drosten-Paper ist so vage und fehlerhaft in seinem Design und seiner Methode, dass man in Dutzende von verschiedenen Richtungen gehen kann; nichts ist standardisiert, es gibt keine SOP, es ist ein Puzzle; dies ist eine sehr schädliche Wissenschaft, die den Test als spezifisches Diagnoseinstrument zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet macht.
9. Höchstwahrscheinlich wurde das Corman-Drosten-Paper nicht von Fachkollegen begutachtet, was den Test als spezifisches Diagnoseinstrument zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet macht.
10. Wir stellen bei mindestens vier Autoren schwerwiegende Interessenkonflikte fest, zusätzlich zu der Tatsache, dass zwei der Autoren des Corman-Drosten-Papers (Christian Drosten und Chantal Reusken) auch Mitglied im Editorial Board von Eurosurveillance sind; ein Interessenkonflikt wurde am 29. Juli 2020 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 Originalversion nicht deklariert wurde (und in der PubMed-Version immer noch fehlt); TIB-Molbiol ist die Firma, die "die erste" war, die PCR-Kits (Light Mix) auf der Grundlage des im Corman-Drosten-Manuskript veröffentlichten Protokolls hergestellt hat, und nach eigenen Angaben diese PCR-Testkits bereits vor der Einreichung der Publikation verteilt hat [14]; ferner haben Victor Corman & Christian Drosten ihre zweite Zugehörigkeit nicht erwähnt: das kommerzielle Testlabor "Labor Berlin", beide sind dort für die Virusdiagnostik zuständig [20] und die Firma arbeitet im Bereich der Real-Time PCR-Tests.

**Angesichts mehrerer schwerwiegender Designfehler, die den Test als diagnostisches Instrument zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet machen, sowie eines zweifelhaften Peer-Review-Prozesses sind wir zuversichtlich, dass die Redaktion von Eurosurveillance keine andere Wahl hat, als das Corman-Drosten-Paper in Bezug auf die wissenschaftliche Integrität zurückzuziehen.**

## **Literaturhinweise**

[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. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

[2] Tom Jefferson, Elizabeth Spencer, Jon Brassey, Carl Heneghan Viral cultures for COVID-19 infectivity assessment. Systematic review.

Systematic review doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.04.20167932>;  
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.08.04.20167932v4>

[3] Marra MA, Steven JMJ, Caroline RA, Robert AH, Angela BW et al. (2003) Science. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. Science 300(5624): 1399-1404.

[4] Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947>

[5] Borger P. A SARS-like Coronavirus was expected but nothing was done to be prepared. 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](https://www.researchgate.net/publication/341120750_A_SARS-like_Coronavirus_was_Expected_but_nothing_was_done_to_be_Prepared) ; archive: <https://archive.is/i76Hu>

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

[8] Official WHO-recommendation for the Corman / Drosten RT-qPCR-protocol, which directly derives from the Eurosurveillance-publication, document-version 2-1, published on 17th January 2020: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2)

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

[10] Trestan Pillonel et al, Letter to the editor: SARS-CoV-2 detection by real-time RT-PCR: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7268274/>

[11] Kim et al., The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420304062>

[12] Wolfel et al., Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x>

[13] Jafaar et al., Correlation Between 3790 Quantitative Polymerase Chain Reaction–Positives Samples and Positive Cell Cultures, Including 1941 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Isolates

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

[14] Instructions For Use LightMix SarbecoV E-gene plus EAV Control, TIB-Molbiol & Roche Molecular Solutions, January 11th 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) Archive, timestamp - January 11th 2020: <https://archive.is/Vulo5>; archive: <https://bit.ly/3fm9bXH>

[15] BBC, January 21st 2020: <https://www.bbc.com/news/world-asia-china-51185836>; archive: <https://archive.is/0qRmZ>

[16] Official recommendation of the Corman-Drosten protocol & manuscript by the WHO, published on January 13th 2020 as version 1.0 of the document: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf>; archive: <https://bit.ly/3m3jXVH>

[17] E-Mail-Kommunikation zwischen Dr. Peter Borger & Dr. Adam Meijer: Link wird in der Endfassung hinzugefügt

[18] Bemerkung von Ulrike: „Literatur aus unserem Gutachten“, wird demnächst als Referenz in der Endfassung hinzugefügt

[19] Google Analytics - COVID19-deaths worldwide: <https://bit.ly/3fndemJ>; archive: <https://archive.is/PpqEE>

[20] Christian Drosten & Victor Corman, verantwortlich für Virusdiagnostik im Labor Berlin: <https://www.laborberlin.com/fachbereiche/virologie/>; archive: [archive.is/CDEUG](https://archive.is/CDEUG)

[21] Raoul Brief an den Herausgeber, Link wird demnächst hinzugefügt

Weitere Literatur:

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

[https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsJ/JoHM\\_S5\\_2020\\_Studienprotokoll\\_CORONA\\_MONITORING\\_lokal.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsJ/JoHM_S5_2020_Studienprotokoll_CORONA_MONITORING_lokal.pdf?__blob=publicationFile)

et al.

Temporäre Position der Autoren & zertifizierte Konsortien-Liste:

Zuletzt aktualisiert: 23.11.2020 - 12:00

Hauptautor 1: Dr. Pieter Borger (MSc, PhD), Facharzt für Molekulargenetik, W+W Research Associate, Lörrach, Deutschland Hauptautor

2: Prof. Dr. Ulrike Kämmerer, Fachärztin für Virologie / Immunologie / Humanbiologie / Zellbiologie, Universitätsklinikum Würzburg, Deutschland

Co-Autorschaft: Dr. Michael Yeadon BSc(Hons) Biochem Tox U Surrey, PhD Pharmakologie U Surrey. Geschäftsführender Direktor, Yeadon Consulting Lt, ehemaliger Pfizer Chief Scientist, Vereinigtes Königreich

Dr. Clare Craig MA, (Cantab) BM BCh (Oxon), FRCPath, Vereinigtes Königreich

Kevin Mckernan, BS Emory University, Chief Scientific Officer, Gründer von Medical Genomics, konstruierte die Sequenzierungspipeline am WIBR/MIT für das Humangenomprojekt, erfand und entwickelte den SOLiD-Sequencer, gründete Patente im Zusammenhang mit PCR, DNA-Isolierung und Sequenzierung, USA

Prof. Dr. Klaus Steger, Leitender medizinischer Experte für das Andrologisch-Urologische Forschungs-Laboratorium Gießen, Deutschland

Prof. Dr. Lidiya Angelova, MSc in Biologie, PhD in Mikrobiologie, Ehemalige Forscherin am National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Maryland, USA

Prof. Dr. med. Henrik Ullrich, Facharzt für Diagnostische Radiologie, Leitender Arzt am Zentrum für Radiologie der Collm Klinik Oschatz, Deutschland

Prof. Dr. Makoto Ohashi, Professor emeritus, PhD in Mikrobiologie und Immunologie, Tokushima Universität, Japan

Thomas Binder, Internist und Kardiologe (FMH), Schweiz

Dr. Stefano Scoglio, B.Sc. Ph.D., Mikrobiologe, Ernährungswissenschaftler, Italien

Dr. M. Doesburg-van Kleffens, (MSc, PhD), Spezialist für Labormedizin (klinische Chemie), Maasziekenhuis Pantein, Beugen, Niederlande

Dr. Paul McSheehy (BSc, PhD), Biochemiker & Industriepharmakologe, Lörrach, Deutschland

Dr. med. Jan Bonte (GJ), Facharzt für Neurologie, Niederlande Dr. Dorothea Gilbert (MSc, PhD), Chemie / Organische Chemie, Dänemark Dra.Berber W. Pieksma, Allgemeinmediziner, Niederlande

Dr. Reint van Veen (PhD), Chemiker, Berater, ehemals Radiochemie und analytische Chemie im Ministerium für öffentliche Arbeiten, Niederlande

**Ko-Autorenschaft, Tabellen & Abbildungen** - Änderungen, ergänzende Hinweise,

Ergänzungen: Rajesh Malhotra (Künstler alias: **Bobby Rajesh Malhotra**), Digital Artist, Ehemaliger 3D-Künstler / Wissenschaftliche Visualisierungen am CeMM - Zentrum für Molekulare Medizin der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, Universität für angewandte Kunst - Abteilung für Digitale Kunst Wien