



An den Präsidenten
des Südtiroler Landtages
Bozen

Al presidente
del Consiglio della Provincia autonoma di Bolzano
Bolzano

BESCHLUSSANTRAG

Nr. 216/25

.....

NOTWENDIGE AUSWEISUNG AUF PCR-TEST- ERGEBNIS VON CT-WERT UND IDENTIFIZIE- RUNG DES VERWENDETEN PCR-TEST-PRO- DUKTS

In den Jahren 2020 bis 2022 haben wir erlebt, wie ein „positives“ PCR-Test-Ergebnis unglaublich autoritäre menschenrechtswidrige Maßnahmen ausgelöst hat.

Dem Wildwuchs und dem Missbrauch der PCR-Methode (Polymerase-Chain-Reaktion) waren in vielen Ländern, darunter auch Italien/Südtirol keine Grenzen gesetzt.

Auf meine Frage in der aktuellen Fragestunde vom 8. Oktober 2024 hat Landesrat Hubert Messner sowohl mündlich, als auch dann mit dem „*Vermerk für Landesrat für Gesundheitsvorsorge und Gesundheit Dr. Hubert Messner*“ unter Punkt 7 (ad 7) schriftlich bestätigt, dass **der CT-Wert (Anzahl der Auswertungszyklen des entnommenen DNA-Materials) bei der schriftlichen Übermittlung des PCR-Test-Ergebnisses von den Südtiroler Laboren, sprich den Laboren des Südtiroler Sanitätsbetriebes nicht angeführt wird.**

Das bedeutet, dass weiterhin keinerlei Transparenz darüber vorliegt, ob von den Südtiroler Laboren der wissenschaftliche Standard bei der Anwendung der PCR-Tests eingehalten wird.

Aufgrund der **völlig missbräuchlichen Anwendung der PCR-Tests während der sog. Corona-Pandemie** (die zu einer enormen Schaffung falsch positiver Sars-Cov2-Fälle geführt hat), u.a. weil das sog. Corman-Drosten-PCR-Test-Protokoll Auswertungszyklen von 40 und mehr vorsah (siehe dazu das Gutachten einer internationalen

MOZIONE

N. 216/25

.....

L'ESITO DEL TEST PCR DEVE RIPORTARE IL VALORE CT E IL PRODOTTO UTILIZZATO PER EFFETTUARE IL TEST

Tra il 2020 e il 2022 abbiamo visto come il risultato "positivo" di un test PCR abbia fatto scaturire inaudite misure autoritarie con cui si sono anche violati i diritti umani.

In molti Paesi, tra cui anche l'Italia/Alto Adige, non è stato posto alcun freno al dilagare e all'abuso dei test PCR (reazione polimerasica a catena).

In risposta alla mia interrogazione su temi di attualità dell'8 ottobre 2024, l'assessore provinciale Hubert Messner ha confermato, sia verbalmente che poi per iscritto, con la "*Nota per l'assessore alla prevenzione sanitaria e alla salute, dott. Hubert Messner*" al punto 7 (ad 7), che **nella trasmissione scritta del risultato del test PCR da parte dei laboratori altoatesini, ovvero quelli dell'Azienda sanitaria dell'Alto Adige, non viene riportato il valore CT (numero di cicli di amplificazione del materiale DNA prelevato).**

Ciò significa che non è ancora assolutamente chiaro se nell'utilizzo dei test PCR i laboratori altoatesini rispettino gli standard scientifici.

Il **grandissimo abuso dei test PCR durante la cd. pandemia di Covid** (che ha portato a un enorme numero di casi di Sars-Cov2 riconducibili a falsi positivi), tra l'altro perché il cd. protocollo Corman-Drosten prevedeva 40 e più cicli di amplificazione (si veda il parere di un gruppo internazionale di scienziati che nell'autunno del 2020 ha chiesto il

Wissenschaftlergruppe, die im Herbst 2020 den Rückzug des Corman-Drosten-PCR-Test-Protokolls verlangt hat in Anlage Nr. 1, und das Gutachten von Univ.Prof.Dr. Ulrike Kämmerer, Würzburg, zu den PCR-Tests in Anlage Nr. 2), hat die WHO, wenn auch mit enormer Verspätung, in ihrem Bulletin die Benutzer der PCR-Tests u.a. darauf hingewiesen, dass eine hohe Anzahl der Auswertungszyklen, die notwendig ist, um überhaupt DNA-Material des Virus nachzuweisen, nicht auf einen aktives Virus schließen lässt, und grundsätzlich immer die klinische Symptomatik berücksichtigt werden muss.

Außerdem hat die WHO – aufgrund der internationalen massiven Proteste bei der Vorgehensweise der Labore und der Feststellung der sog. positiven SARS-CoV2-Fälle – wenngleich mit unverzeihlicher Verspätung, darauf hingewiesen, dass der CT-Wert, sprich die Anzahl der Auswertungszyklen, die notwendig war, um Virus-DNA-Material festzustellen, im Testergebnis von den Laboren angeführt werden muss.

Siehe hierzu:

WHO Information Notice for IVD Users 2020/05 vom 13.01.2021 (Anlage Nr. 3), mit der die WHO die Labore auffordert, im Bericht über das PCR-Test-Ergebnis den CT-Wert anzuführen.

WHO Information Notice for IVD Users 2020/05

Nucleic acid testing (NAT) technologies that use polymerase chain reaction (PCR) for detection of SARS-CoV-2

20 January 2021 |Medical product alert |Geneva
|Reading time: 1 min (370 words)

Omissis

Actions to be taken by IVD users:

1. Please read carefully the IFU in its entirety.
2. Contact your local representative if there is any aspect of the IFU that is unclear to you.
3. Check the IFU for each incoming consignment to detect any changes to the IFU.
4. Provide the Ct value in the report to the requesting health care provider.

Die für die PCR-Testung autorisierten Südtiroler Labore entsprechen daher spätestens seit dem 31. Jänner 2021 nicht dem international

ritiro del protocollo Corman-Drosten, vedi allegato 1, e il parere sui test PCR della docente universitaria prof.ssa Ulrike Kämmerer di Würzburg, vedi allegato 2), **ha fatto sì che, seppur con enorme ritardo, l'OMS nel suo bollettino segnalasse, tra l'altro, a chi utilizzava i test PCR che un numero elevato di cicli di amplificazione, necessario per rilevare il DNA del virus, non indicava un virus attivo, e che fundamentalmente dovevano essere sempre considerati i sintomi clinici.**

Inoltre, a causa delle massicce proteste internazionali riguardanti le procedure dei laboratori e l'identificazione dei cd. casi positivi di SARS-CoV2, l'OMS ha comunicato, seppur con imperdonabile ritardo, che il valore CT, cioè il numero di cicli di amplificazione necessari per rilevare il materiale DNA del virus, deve essere indicato dai laboratori nei risultati dei test.

Vedi:

WHO Information Notice for IVD Users 2020/05 del 13 gennaio 2021 (allegato 3), con la quale l'OMS chiede ai laboratori di indicare il valore CT insieme al risultato dei test PCR.

WHO Information Notice for IVD Users 2020/05

Nucleic acid testing (NAT) technologies that use polymerase chain reaction (PCR) for detection of SARS-CoV-2

20 January 2021 |Medical product alert |Geneva
|Reading time: 1 min (370 words)

Omissis

Actions to be taken by IVD users:

1. Please read carefully the IFU in its entirety.
2. Contact your local representative if there is any aspect of the IFU that is unclear to you.
3. Check the IFU for each incoming consignment to detect any changes to the IFU.
4. Provide the Ct value in the report to the requesting health care provider.

Quindi, al più tardi a partire dal 31 gennaio 2021, nella comunicazione dei risultati dei test PCR i laboratori altoatesini autorizzati a effettuare tali

durch die WHO vorgegebenen Standard in der Ausweisung der PCR-Test-Ergebnisse.

Dass das Italienische Gesundheitsministerium, laut Aussage von Gesundheitslandesrat Hubert Messner, diesbezüglich angeblich nichts anweise, ist völlig unerheblich.

Für die wissenschaftlich korrekte und transparente Vorgehensweise der Südtiroler Labore bzw. der Labore des Südtiroler Sanitätsbetriebes ist die Autonome Provinz Bozen zuständig!

Da darüber hinaus **die diversen PCR-Test-Produkte unterschiedlich sind, da es bis dato keine Standardisierung gibt, ist es für die Nachvollziehbarkeit der Werthaltigkeit eines PCR-Test-Ergebnisses** (das u.U. zu einer Quarantänemaßnahme oder mit anderen Ergebnissen zu einem Lockdown, zur bedingten Marktzulassung nicht getesteter sog. „Impfstoffe“ führen kann etc., wie wir in den vergangenen Jahren erlebt haben, aber auch zum Hinweis auf eine angeblich sich anbahnende neue Pandemie) **neben der Ausweisung des CT-Wertes, auch notwendig, dass die Labore im Testergebnis, das jeweils zur Anwendung gebrachte PCR-Test-Produkt mit Handelsnamen und Produzenten anführen.**

Daher stelle ich folgenden Beschlussantrag:

**Der Südtiroler Landtag
verpflichtet
die Landesregierung**

dafür Sorge zu tragen, dass die Labore des Südtiroler Sanitätsbetriebes, sowie alle Labore, die PCR-Tests im Auftrage des Südtiroler Sanitätsbetriebes machen, den CT-Wert sowie den Handelsnamen und Produzenten des verwendeten PCR-Test-Produkts in der schriftlichen Testergebnisbestätigung ausweisen.

gez. Landtagsabgeordnete
Renate Holzeisen

Beim Generalsekretariat des Südtiroler Landtages
am 16.1.2025 eingegangen, Prot. Nr. 338/ci

test non rispettavano più lo standard internazionale dell'OMS.

È del tutto irrilevante che il Ministero della Salute italiano, come affermato dall'assessore alla sanità Hubert Messner, al riguardo non abbia dato alcuna indicazione.

Il rispetto di procedure trasparenti e corrette dal punto di vista scientifico da parte dei laboratori altoatesini, ovvero dei laboratori della nostra Azienda sanitaria, è competenza della Provincia autonoma di Bolzano!

Per di più, poiché i vari prodotti per effettuare i test PCR sono diversi e non essendo ad oggi intervenuta una standardizzazione, per verificare la validità del risultato di un test PCR (che può comportare un provvedimento di quarantena o, con altri risultati, un lockdown, un'autorizzazione condizionata all'immissione in commercio di cd. "vaccini" non testati, ecc., come abbiamo visto negli ultimi anni, ma che può anche indicare una presunta nuova pandemia emergente), **è necessario che i laboratori, oltre a riportare il valore CT, indichino nel risultato del test PCR anche il prodotto utilizzato per effettuarlo, compresi il nome commerciale e il produttore.**

Pertanto, la sottoscritta sottopone al Consiglio la seguente mozione:

**Il Consiglio della Provincia
autonoma di Bolzano
impegna la Giunta provinciale**

a provvedere affinché i laboratori dell'Azienda sanitaria dell'Alto Adige e tutti i laboratori che eseguono test PCR per conto della stessa, riportino nella conferma scritta del risultato dei test il valore CT nonché il nome commerciale e il produttore del test utilizzato.

f.to consigliera provinciale
Renate Holzeisen

Pervenuta alla segreteria generale del Consiglio della Provincia autonoma di Bolzano in data 16/1/2025, n. prot. 338/MS/pa

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/346483715>

External peer review of the RTPCR test to detect SARS-CoV-2 reveals 10 major scientific flaws at the molecular and methodological level: consequences for false positive results

Preprint · November 2020

DOI: 10.5281/zenodo.4298004

CITATIONS

2

READS

203,917

22 authors, including:



Pieter Borger

W+W Research Association

119 PUBLICATIONS 2,656 CITATIONS

SEE PROFILE



Clare Elizabeth Honor Craig

23 PUBLICATIONS 230 CITATIONS

SEE PROFILE



Kevin McKernan

Medicinal Genomics

126 PUBLICATIONS 60,541 CITATIONS

SEE PROFILE



Klaus Steger

University of Giessen

264 PUBLICATIONS 10,275 CITATIONS

SEE PROFILE

External peer review of the RTPCR test to detect SARS-CoV-2 reveals 10 major scientific flaws at the molecular and methodological level: consequences for false positive results.

Pieter Borger ^{1*}, Rajesh K. Malhotra ², Michael Yeadon ³, Clare Craig ⁴, Kevin McKernan ⁵
Klaus Steger ⁶, Paul McSheehy ⁷, Lidiya Angelova ⁸, Fabio Franchi ⁹, Thomas Binder ¹⁰
Henrik Ullrich ¹¹, Makoto Ohashi ¹², Stefano Scoglio ¹³, Marjolein Doesburg-van Kleffens ¹⁴
Dorothea Gilbert ¹⁵, Rainer J. Klement ¹⁶, Ruth Schruefer ¹⁷, Berber W. Pieksma ¹⁸, Jan Bonte ¹⁹,
Bruno H. Dalle Carbonara ²⁰, Kevin P. Corbett ²¹, Ulrike Kämmerer ²².

* Corresponding author

ABSTRACT

In the publication entitled “Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR” (Eurosurveillance 25(8) 2020) the authors present a diagnostic workflow and RT-qPCR protocol for detection and diagnostics of 2019-nCoV (now known as SARS-CoV-2), which they claim to be validated, as well as being a *robust diagnostic methodology for use in public-health laboratory settings*.

In light of all the consequences resulting from this very publication for societies worldwide, a group of independent researchers performed a point-by-point review of the aforesaid publication in which 1) all components of the presented test design were cross checked, 2) the RT-qPCR protocol-recommendations were assessed w.r.t. good laboratory practice, and 3) parameters examined against relevant scientific literature covering the field.

The published RT-qPCR protocol for detection and diagnostics of 2019-nCoV and the manuscript suffer from numerous technical and scientific errors, including insufficient primer design, a problematic and insufficient RT-qPCR protocol, and the absence of an accurate test validation. Neither the presented test nor the manuscript itself fulfils the requirements for an acceptable scientific publication. Further, serious conflicts of interest of the authors are not mentioned. Finally, the very short timescale between submission and acceptance of the publication (24 hours) signifies that a systematic peer review process was either not performed here, or of problematic poor quality.

We provide compelling evidence of several scientific inadequacies, errors and flaws. Considering the scientific and methodological blemishes presented here, we are confident that the editorial board of Eurosurveillance has no other choice but to retract the publication.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

CONCISE REVIEW REPORT

This paper will show numerous serious flaws in the Corman-Drosten paper, the significance of which has led to worldwide misdiagnosis of infections attributed to SARS-CoV-2 and associated with the disease COVID-19. We are confronted with stringent lockdowns which have destroyed many people's lives and livelihoods, limited access to education and these imposed restrictions by governments around the world are a direct attack on people's basic rights and their personal freedoms, resulting in collateral damage for entire economies on a global scale.

There are ten fatal problems with the Corman-Drosten paper which we will outline and explain in greater detail in the following sections.

The first and major issue is that the *novel* Coronavirus SARS-CoV-2 (in the publication named 2019-nCoV and in February 2020 named SARS-CoV-2 by an international consortium of virus experts) is based on *in silico* (theoretical) sequences, supplied by a laboratory in China [1], because at the time neither control material of infectious ("live") or inactivated SARS-CoV-2 nor isolated genomic RNA of the virus was available to the authors. To date no validation has been performed by the authorship based on isolated SARS-CoV-2 viruses or full length RNA thereof.

According to Corman et al.: "*We aimed to develop and deploy robust diagnostic methodology for use in public health laboratory settings without having virus material available.*" [1]

The focus here should be placed upon the two stated aims: a) *development* and b) *deployment* of a *diagnostic test for use in public health laboratory settings*. These aims are not achievable without having any actual virus material available (e.g. for determining the infectious viral load). In any case, only a protocol with maximal accuracy can be the mandatory and primary goal in any scenario-outcome of this magnitude. Critical viral load determination is mandatory information, and it is in Christian Drosten's group responsibility to perform these experiments and provide the crucial data.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Nevertheless these *in silico* sequences were used to develop a RT-PCR test methodology to identify the aforesaid virus. This model was based on the assumption that the *novel* virus is very similar to SARS-CoV from 2003 (Hereafter named SARS-CoV-1) as both are beta-coronaviruses.

The PCR test was therefore designed using the genomic sequence of SARS-CoV-1 as a control material for the Sarbeco component; we know this from our personal email-communication with [2] one of the co-authors of the Corman-Drosten paper. This method to model SARS-CoV-2 was described in the Corman-Drosten paper as follows:

“the establishment and validation of a diagnostic workflow for 2019-nCoV screening and specific confirmation, designed in absence of available virus isolates or original patient specimens. Design and validation were enabled by the close genetic relatedness to the 2003 SARS-CoV, and aided by the use of synthetic nucleic acid technology.”

In short, a design relying merely on close genetic relatives does not fulfill the aim for a “robust diagnostic test” as cross reactivity and therefore false-positive results will inevitably occur.

Validation was only done in regards to *in silico* (theoretical) sequences and within the laboratory-setting, and not as required for in-vitro diagnostics with isolated genomic viral RNA. This very fact hasn't changed even after 10 months of introduction of the test into routine diagnostics.

There are numerous other severe scientific errors regarding the biomolecular design of the primers, the PCR method, as well as the molecular validation of the PCR products and methods described in the Corman-Drosten paper which are examined in detail in the following chapters. The paper itself already signifies that a large number of false positive results are generated by this test, even under controlled laboratory conditions, making it completely unsuitable as a reliable virus screening method for entire populations in an ongoing pandemic. Given the far-reaching implications, including quarantine measures, lockdowns, curfews and impacts on education etc., this paper must be immediately retracted.

DESIGN AND ERRORS in RT-PCR

The Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) is an important biomolecular technology to rapidly detect rare RNA fragments, which are known in advance. In the first step, RNA molecules present in the sample are reverse transcribed to yield cDNA. The cDNA is then amplified in the polymerase chain reaction using a specific primer pair and a thermostable DNA polymerase enzyme. The technology is highly sensitive and its detection limit is theoretically 1 molecule of cDNA. The specificity of the PCR is highly influenced by biomolecular design errors.

What is important when designing an RT-PCR Test and the quantitative RT-qPCR test described in the Corman-Drosten publication?

1. The primers and probes:
 - a) the concentration of primers and probes must be of optimal range (100-200 nM)
 - b) must be specific to the target-gene you want to amplify
 - c) must have an optimal percentage of GC content relative to the total nitrogenous bases (minimum 40%, maximum 60%)
 - d) for virus diagnostics at least 3 primer pairs must detect 3 viral genes (preferably as far apart as possible in the viral genome)
2. The temperature at which all reactions take place:
 - a) DNA melting temperature (>92°)
 - b) DNA amplification temperature (TaqPol specific)
 - c) T_m; the annealing temperature (the temperature at which the primers and probes reach the target binding/detachment, not to exceed 2°C per primer pair).
T_m heavily depends on GC content of the primers
3. The number of amplification cycles (less than 35; preferably 25-30 cycles); In case of virus detection, >35 cycles only detects signals which do not correlate with infectious virus as determined by isolation in cell culture [reviewed in 2]; if someone is tested by PCR as positive when a threshold of 35 cycles or higher is used (as is the case in most laboratories in Europe & the US), the probability that said person is actually infected is less than 3%, the probability that said result is a false positive is 97%

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

[reviewed in 3]

4. Molecular biological validations; amplified PCR products must be validated either by running the products in a gel with a DNA ruler, or by direct DNA sequencing
5. Positive and negative controls should be specified to confirm/refute specific virus detection
6. There should be a Standard Operational Procedure (SOP) available, which unequivocally specifies the above parameters, so that all laboratories are able to set up the exact same test conditions. To have a validated universal SOP is essential, because it enables the comparison of data within and between countries.

MINOR CONCERNS WITH THE CORMAN-DROSTEN PAPER

1. In Table 1 of the Corman-Drosten paper, different abbreviations are stated - "nM" is specified, "nm" isn't. Further in regards to correct nomenclature, nm means "nanometer" therefore nm should read nM here.
2. It is the general consensus to write genetic sequences always in the 5'-3' direction, including the reverse primers. It is highly unusual to do alignment with reverse complementary writing of the primer sequence as the authors did in figure 2 of the Corman-Drosten paper. Here, in addition, a wobble base is marked as "y" without description of the bases the Y stands for.
3. Two misleading pitfalls in the Corman-Drosten paper are that their Table 1 does not include T_m-values (annealing-temperature values), neither does it show GC-values (number of G and C in the sequences as %-value of total bases).

MAJOR CONCERNS WITH THE CORMAN-DROSTEN PAPER

A) BACKGROUND

The authors introduce the background for their scientific work as: *“The ongoing outbreak of the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) poses a challenge for public health laboratories as virus isolates are unavailable while there is growing evidence that the outbreak is more widespread than initially thought, and international spread through travelers does already occur”*.

According to BBC News [4] and Google Statistics [5] there were 6 deaths world-wide on January 21st 2020 - the day when the manuscript was submitted. Why did the authors assume a challenge for public health laboratories while there was no substantial evidence at that time to indicate that the outbreak was more widespread than initially thought?

As an aim the authors declared to develop and deploy robust diagnostic methodology for use in public health laboratory settings without having virus material available. Further, they acknowledge that *“The present study demonstrates the enormous response capacity achieved through coordination of academic and public laboratories in national and European research networks.”*

B) Methods and Results

1. Primer & Probe Design

1a) Erroneous primer concentrations

Reliable and accurate PCR-test protocols are normally designed using between 100 nM and 200 nM per primer [7]. In the Corman-Drosten paper, we observe unusually high and varying primer concentrations for several primers (table 1). For the RdRp_SARSr-F and RdRp_SARSr-R primer pairs, 600 nM and 800 nM are described, respectively. Similarly, for the N_Sarbeco_F and N_Sarbeco_R primer set, they advise 600 nM and 800 nM, respectively [1]. It should be clear that these concentrations are far too high to be optimal for specific amplifications of target genes. *There exists no specified reason to use these extremely high*

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

concentrations of primers in this protocol. Rather, these concentrations lead to increased unspecific binding and PCR product amplification.

Table 1: Primers and probes (adapted from Corman-Drosten paper; erroneous primer concentrations are highlighted)

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence ^a	Concentration ^b
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. 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	CARATGTAAASACACTATTAGCATA	Use 800 nM per reaction
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 400 nM per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 200 nM per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 400 nM per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGAATC	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) Unspecified (“Wobbly”) primer and probe sequences

To obtain reproducible and comparable results, it is essential to distinctively define the primer pairs. In the Corman-Drosten paper we observed six unspecified positions, indicated by the letters R, W, M and S (Table 2). The letter W means that at this position there can be either an A or a T; R signifies there can be either a G or an A; M indicates that the position may either be an A or a C; the letter S indicates there can be either a G or a C on this position.

This high number of variants not only is unusual, but it also is highly confusing for laboratories. These six unspecified positions could easily result in the design of several different alternative primer sequences which do not relate to SARS-CoV-2 (2 distinct RdRp_SARsR_F primers + 8 distinct RdRp_SARS_P1 probes + 4 distinct RdRp_SARsR_R). The design variations will inevitably lead to results that are not even SARS-CoV-2 related. Therefore, the confusing unspecific description in the Corman-Drosten paper is not suitable as a Standard Operational Protocol. These unspecified positions should have been designed unequivocally.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

These wobbly sequences have already created a source of concern in the field and resulted in a Letter to the Editor authored by Pillonel *et al.* [8] regarding blatant errors in the described sequences. These errors are self-evident in the Corman *et al.* supplement as well.

Table 2: Primers and probes (adapted from Corman-Drosten paper; unspecified (“Wobbly”) nucleotides in the primers are highlighted)

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-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.
^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.

The WHO-protocol (Figure 1), which directly derives from the Corman-Drosten paper, concludes that in order to confirm the presence of SARS-CoV-2, two control genes (the E- and the RdRp-genes) must be identified in the assay. It should be noted, that the RdPd-gene has one uncertain position (“wobbly”) in the forward-primer (R=G/A), two uncertain positions in the reverse-primer (R=G/A; S=G/C) and it has three uncertain positions in the RdRp-probe (W=A/T; R=G/A; M=A/C). So, two different forward primers, four different reverse primers, and eight distinct probes can be synthesized for the RdPd-gene. Together, there are 64 possible combinations of primers and probes!

The Corman-Drosten paper further identifies a third gene which, according to the WHO protocol, was not further validated and deemed unnecessary: *“Of note, the N gene assay also performed well but was not subjected to intensive further validation because it was slightly less sensitive.”*

This was an unfortunate omission as it would be best to use all three gene PCRs as

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

confirmatory assays, and this would have resulted in an almost sufficient virus RNA detection diagnostic tool protocol. Three confirmatory assay-steps would at least minimize-out errors & uncertainties at every fold-step in regards to “Wobbly”-spots. (Nonetheless, the protocol would still fall short of any “good laboratory practice”, when factoring in all the other design-errors).

As it stands, the N gene assay is regrettably neither proposed in the WHO-recommendation (Figure 1) as a mandatory and crucial third confirmatory step, nor is it emphasized in the Corman-Drosten paper as important optional reassurance “for a routine workflow” (Table 2).

Consequently, in nearly all test procedures worldwide, merely 2 primer-matches were used instead of all three. This oversight renders the entire test-protocol useless with regards to delivering accurate test-results of real significance in an ongoing pandemic.

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

Figure 1: The N-Genes confirmatory-assay is neither emphasized as necessary third step in the official WHO Drosten-Corman protocol-recommendation [8] nor is it required as a crucial step for higher test-accuracy in the Eurosurveillance publication.

1c) Erroneous GC-content (discussed in 2c, together with annealing temperature (T_m))

1d) Detection of viral genes

RT-PCR is not recommended for primary diagnostics of infection. This is why the RT-PCR Test

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

used in clinical routine for detection of COVID-19 is not indicated for COVID-19 diagnosis on a regulatory basis.

“Clinicians need to recognize the enhanced accuracy and speed of the molecular diagnostic techniques for the diagnosis of infections, but also to understand their limitations. Laboratory results should always be interpreted in the context of the clinical presentation of the patient, and appropriate site, quality, and timing of specimen collection are required for reliable test results”. [9]

However, it may be used to help the physician’s differential diagnosis when he or she has to discriminate between different infections of the lung (Flu, Covid-19 and SARS have very similar symptoms). For a confirmative diagnosis of a specific virus, at least 3 specific primer pairs must be applied to detect 3 virus-specific genes. Preferably, these target genes should be located with the greatest distance possible in the viral genome (opposite ends included). Although the Corman-Drosten paper describes 3 primers, these primers only cover roughly half of the virus’ genome. This is another factor that decreases specificity for detection of intact COVID-19 virus RNA and increases the quote of false positive test results.

Therefore, even if we obtain three positive signals (i.e. the three primer pairs give 3 different amplification products) in a sample, this does not prove the presence of a virus. A better primer design would have terminal primers on both ends of the viral genome. This is because the whole viral genome would be covered and three positive signals can better discriminate between a complete (and thus potentially infectious) virus and fragmented viral genomes (without infectious potency). In order to infer anything of significance about the infectivity of the virus, the Orf1 gene, which encodes the essential replicase enzyme of SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 viruses, should have been included as a target (Figure 2). The positioning of the targets in the region of the viral genome that is most heavily and variably transcribed is another weakness of the protocol.

Kim *et al.* demonstrate a highly variable 3’ expression of subgenomic RNA in Sars-CoV-2 [23]. These RNAs are actively monitored as signatures for asymptomatic and non-infectious patients [10]. It is highly questionable to screen a population of asymptomatic people with qPCR primers that have 6 base pairs primer-dimer on the 3 prime end of a primer (Figure 3). Apparently the WHO recommends these primers. We tested all the wobble derivatives from

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

the Corman-Drosten paper with ThermoFisher's primer dimer web tool [11]. The RdRp forward primer has 6bp 3prime homology with Sarbeco E Reverse. At high primer concentrations this is enough to create inaccuracies.

Of note: There is a perfect match of one of the N primers to a clinical pathogen (*Pantoea*), found in immuno-compromised patients. The reverse primer hits *Pantoea* as well but not in the same region (Figure 3).

These are severe design errors, since the test cannot discriminate between the whole virus and viral fragments. The test cannot be used as a diagnostic for SARS-CoV-2 viruses.

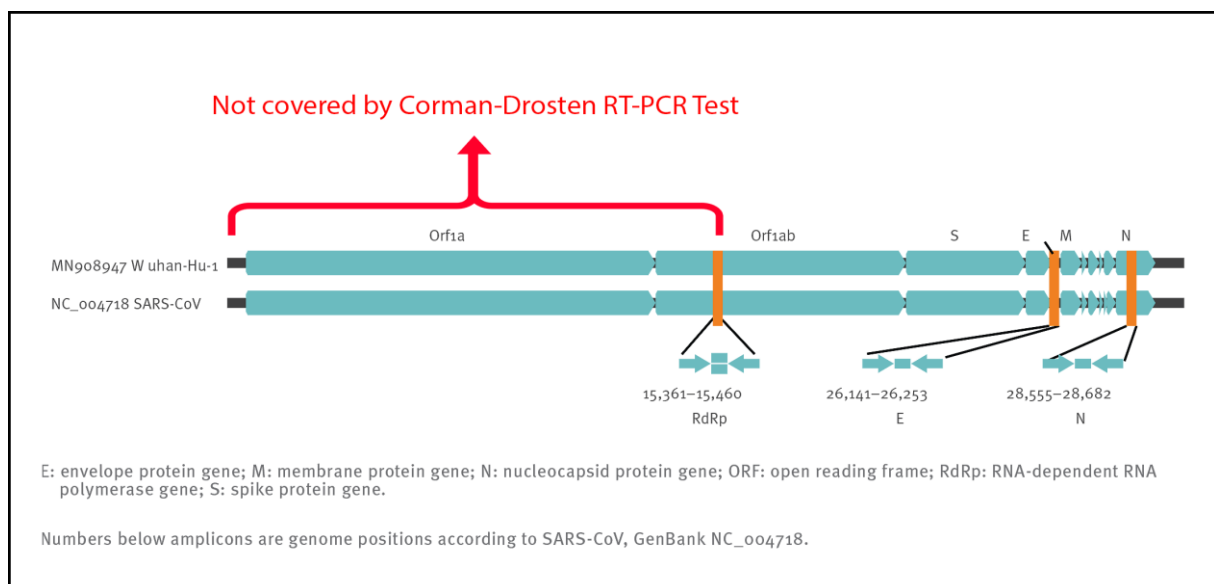


Figure 2: Relative positions of amplicon targets on the SARS-CoV-1 coronavirus and the 2019 novel coronavirus genome. ORF: open reading frame; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase. Numbers below amplicon are genome positions according to SARS-CoV-1, NC_004718 [1];

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		

Figure 3: A test with Thermofischer’s primer dimer web tool reveals that the RdRp forward primer has a 6bp 3’ prime homology with Sarbeco E Reverse (left box). Another test reveals that there is a perfect match for one of the N-primers to a clinical pathogen (*Pantoea*) found in immuno-compromised patients (right box).

2. Reaction temperatures

2a) DNA melting temperature (>92°).

Adequately addressed in the Corman-Drosten paper.

2b) DNA amplification temperature.

Adequately addressed in the Corman-Drosten paper.

2c) Erroneous GC-contents and Tm

The annealing-temperature determines at which temperature the primer attaches/detaches from the target sequence. For an efficient and specific amplification, GC content of primers should meet a minimum of 40% and a maximum of 60% amplification. As indicated in table 3, three of the primers described in the Corman-Drosten paper are not within the normal range for GC-content. Two primers (RdRp_SARSr_F and RdRp_SARSr_R) have unusual and very low GC-values of 28%-31% for all possible variants of wobble bases, whereas primer E_Sarbeco_F has a GC-value of 34.6% (Table 3 and second panel of Table 3).

It should be noted that the GC-content largely determines the binding to its specific target due to its three hydrogen bonds in base pairing. Thus, the lower the GC-content of the primer, the lower its binding-capability to its specific target gene sequence (i.e. the gene to

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

be detected). This means for a target-sequence to be recognized we have to choose a temperature which is as close as possible to the actual annealing-temperature (best practise-value) for the primer not to detach again, while at the same time specifically selecting the target sequence.

If the T_m -value is very low, as observed for all wobbly-variants of the RdRp reverse primers, the primers can bind non-specifically to several targets, decreasing specificity and increasing potential false positive results.

The annealing temperature (T_m) is a crucial factor for the determination of the specificity /accuracy of the qPCR procedure and essential for evaluating the accuracy of qPCR-protocols. Best-practice recommendation: Both primers (forward and reverse) should have an almost similar value, preferably the identical value.

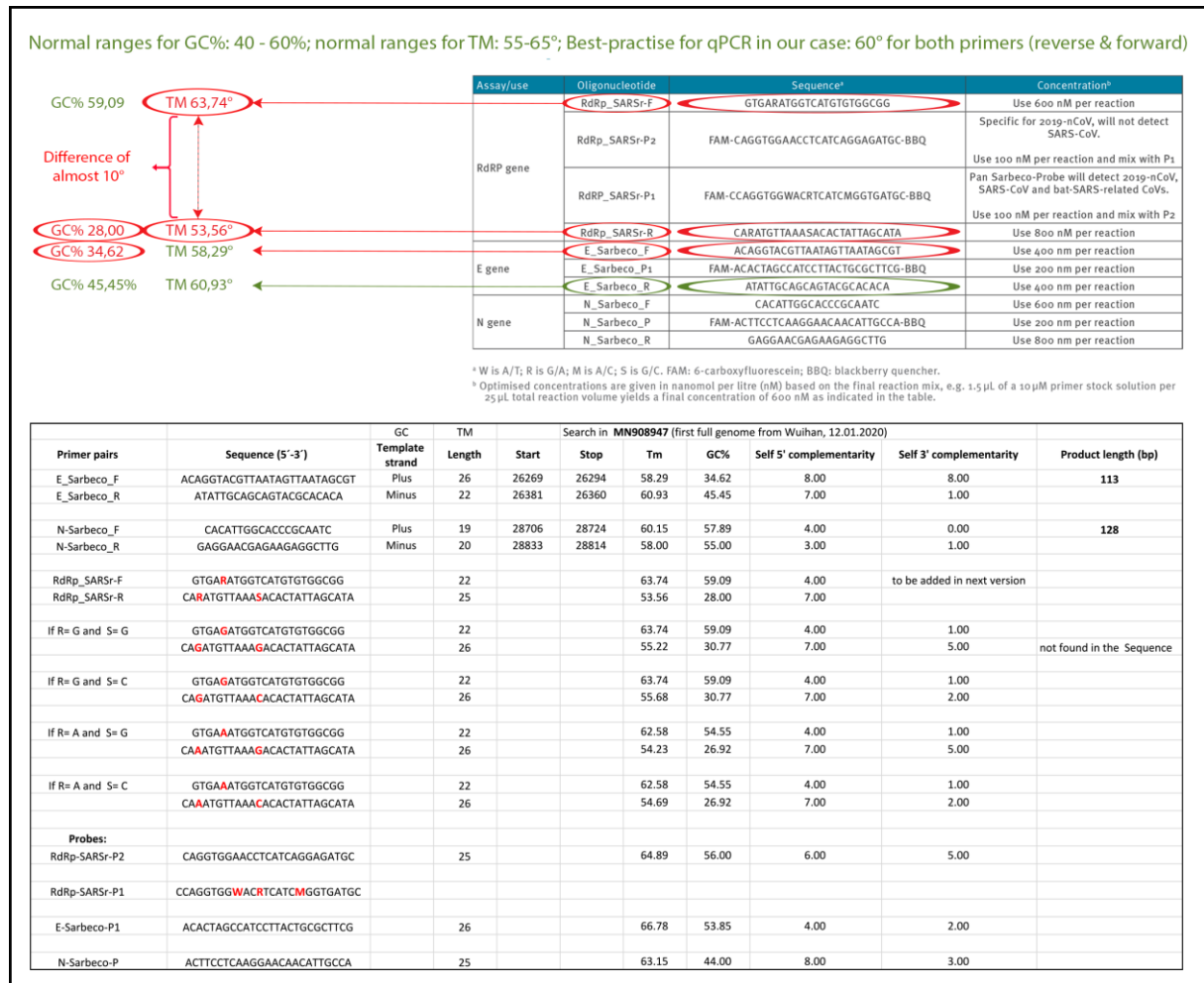
We used the freely available primer design software Primer-BLAST [12, 25] to evaluate the best-practise values for all primers used in the Corman-Drosten paper (Table 3). We attempted to find a T_m -value of 60° C, while similarly seeking the highest possible GC%-value for all primers. A maximal T_m difference of 2° C within primer pairs was considered acceptable. Testing the primer pairs specified in the Corman-Drosten paper, we observed a difference of 10° C with respect to the annealing temperature T_m for primer pair1 (RdRp_SARSr_F and RdRp_SARSr_R). *This is a very serious error and makes the protocol useless as a specific diagnostic tool.*

Additional testing demonstrated that only the primer pair designed to amplify the N-gene (N_Sarbeco_F and N_Sarbeco_R) reached the adequate standard to operate in a diagnostic test, since it has a sufficient GC-content and the T_m difference between the primers (N_Sarbeco_F and N_Sarbeco_R) is 1.85° C (below the crucial maximum of 2° C difference). Importantly, this is the gene which was neither tested in the virus samples (Table 2) nor emphasized as a confirmatory test. In addition to highly variable melting temperatures and degenerate sequences in these primers, there is another factor impacting specificity of the procedure: the dNTPs (0.4uM) are 2x higher than recommended for a highly specific amplification. There is additional magnesium sulphate added to the reaction as well. This procedure combined with a low annealing temperature can create non-specific amplifications. When additional magnesium is required for qPCR, specificity of the assay should be further scrutinized.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

The design errors described here are so severe that it is highly unlikely that specific amplification of SARS-CoV-2 genetic material will occur using the protocol of the Corman-Drosten paper.

Table 3: GC-content of the primers and probes (adapted from Corman-Drosten paper; aberrations from optimized GC-contents are highlighted. Second Panel shows a table-listing of all Primer-BLAST best practices values for all primers and probes used in the Corman-Drosten paper by Prof. Dr. Ulrike Kämmerer & her team



3. The number of amplification cycles

It should be noted that there is no mention anywhere in the Corman-Drosten paper of a test being positive or negative, or indeed what defines a positive or negative result. These types of virological diagnostic tests must be based on a SOP, including a validated and fixed number of PCR cycles (Ct value) after which a sample is deemed positive or negative. The maximum reasonably reliable Ct value is 30 cycles. Above a Ct of 35 cycles, rapidly increasing numbers of false positives must be expected.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

PCR data evaluated as positive after a Ct value of 35 cycles are completely unreliable.

Citing Jaafar *et al.* 2020 [3]: “At Ct = 35, the value we used to report a positive result for PCR, <3% of cultures are positive.” In other words, there was no successful virus isolation of SARS-CoV-2 at those high Ct values.

Further, scientific studies show that only non-infectious (dead) viruses are detected with Ct values of 35 [22].

Between 30 and 35 there is a grey area, where a positive test cannot be established with certainty. This area should be excluded. Of course, one could perform 45 PCR cycles, as recommended in the Corman-Drosten WHO-protocol (Figure 4), but then you also have to define a reasonable Ct-value (which should not exceed 30). But an analytical result with a Ct value of 45 is scientifically and diagnostically absolutely meaningless (a reasonable Ct-value should not exceed 30). All this should be communicated very clearly. *It is a significant mistake that the Corman-Drosten paper does not mention the maximum Ct value at which a sample can be unambiguously considered as a positive or a negative test-result. This important cycle threshold limit is also not specified in any follow-up submissions to date.*

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_SARSr-F2 (10 µM stock solution)	1.5 µl	GTGARATGGTCATGTGTGGCCG
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	

* 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

Figure 4: RT-PCR Kit recommendation in the official Corman-Drosten WHO-protocol [8]. Only a “Cycler”-value (cycles) is to be found without corresponding and scientifically reasonable Ct (Cutoff-value). This or any other cycles-value is nowhere to be found in the actual Corman-Drosten paper.

4. Biomolecular validations

To determine whether the amplified products are indeed SARS-CoV-2 genes, biomolecular validation of amplified PCR products is essential. For a diagnostic test, this validation is an absolute must.

Validation of PCR products should be performed by either running the PCR product in a 1% agarose-EtBr gel together with a size indicator (DNA ruler or DNA ladder) so that the size of the product can be estimated. The size must correspond to the calculated size of the amplification product. But it is even better to sequence the amplification product. The latter will give 100% certainty about the identity of the amplification product. Without molecular validation one can not be sure about the identity of the amplified PCR products. Considering the severe design errors described earlier, the amplified PCR products can be anything.

Also not mentioned in the Corman-Drosten paper is the case of small fragments of qPCR (around 100bp): It could be either 1,5% agarose gel or even an acrylamide gel.

The fact that these PCR products have not been validated at molecular level is another striking error of the protocol, making any test based upon it useless as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.

5. Positive and negative controls to confirm/refute specific virus detection.

The unconfirmed assumption described in the Corman-Drosten paper is that SARS-CoV-2 is the only virus from the SARS-like beta-coronavirus group that currently causes infections in humans. The sequences on which their PCR method is based are *in silico* sequences, supplied by a laboratory in China [23], because at the time of development of the PCR test no control material of infectious (“live”) or inactivated SARS-CoV-2 was available to the authors. The PCR test was therefore designed using the sequence of the known SARS-CoV-1 as a control material for the Sarbeco component (Dr. Meijer, co-author Corman-Drosten paper in an email exchange with Dr. Peter Borger) [2].

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

All individuals testing positive with the RT-PCR test, as described in the Corman-Drosten paper, are assumed to be positive for SARS-CoV-2 infections. There are three severe flaws in their assumption. First, a positive test for the RNA molecules described in the Corman-Drosten paper cannot be equated to “infection with a virus”. A positive RT-PCR test merely indicates the presence of viral RNA molecules. As demonstrated under point 1d (above), the Corman-Drosten test was not designed to detect the full-length virus, but only a fragment of the virus. We already concluded that this classifies the test as unsuitable as a diagnostic test for SARS-virus infections.

Secondly and of major relevance, the functionality of the published RT-PCR Test was not demonstrated with the use of a positive control (isolated SARS-CoV-2 RNA) which is an essential scientific gold standard.

Third, the Corman-Drosten paper states:

“To show that the assays can detect other bat-associated SARS-related viruses, we used the E gene assay to test six bat-derived faecal samples available from Drexler et al. [...] und Muth et al. [...]. These virus-positive samples stemmed from European rhinolophid bats. Detection of these phylogenetic outliers within the SARS-related CoV clade suggests that all Asian viruses are likely to be detected. This would, theoretically, ensure broad sensitivity even in case of multiple independent acquisitions of variant viruses from an animal reservoir.”

This statement demonstrates that the E gene used in RT-PCR test, as described in the Corman-Drosten paper, is not specific to SARS-CoV-2. The E gene primers also detect a broad spectrum of other SARS viruses.

The genome of the coronavirus is the largest of all RNA viruses that infect humans and they all have a very similar molecular structure. Still, SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 have two highly specific genetic fingerprints, which set them apart from the other coronaviruses. First, a unique fingerprint-sequence (KTFPPTEPKDKKKK) is present in the N-protein of SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 [13,14,15]. Second, both SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 do not contain the HE protein, whereas all other coronaviruses possess this gene [13, 14]. So, in order to specifically detect a SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 PCR product the above region in the N gene should have been chosen as the amplification target. A reliable diagnostic test should focus on this specific region in the N gene as a confirmatory test. The PCR for this N gene was not further validated nor recommended as a test gene by the Drosten-Corman paper, because of

being “not so sensitive” with the SARS-CoV original probe [1].

Furthermore, the absence of the HE gene in both SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 makes this gene the ideal negative control to exclude other coronaviruses. The Corman-Drosten paper does not contain this negative control, nor does it contain any other negative controls. The PCR test in the Corman-Drosten paper therefore contains neither a unique positive control nor a negative control to exclude the presence of other coronaviruses. This is another major design flaw which classifies the test as unsuitable for diagnosis.

6. Standard Operational Procedure (SOP) is not available

There should be a Standard Operational Procedure (SOP) available, which unequivocally specifies the above parameters, so that all laboratories are able to set up the identical same test conditions. To have a validated universal SOP is essential, because it facilitates data comparison within and between countries. It is very important to specify all primer parameters unequivocally. We note that this has not been done. Further, the Ct value to indicate when a sample should be considered positive or negative is not specified. It is also not specified when a sample is considered infected with SARS-CoV viruses. As shown above, the test cannot discern between virus and virus fragments, so the Ct value indicating positivity is crucially important. This Ct value should have been specified in the Standard Operational Procedure (SOP) and put on-line so that all laboratories carrying out this test have exactly the same boundary conditions. It points to flawed science that such an SOP does not exist. The laboratories are thus free to conduct the test as they consider appropriate, resulting in an enormous amount of variation. Laboratories all over Europe are left with a multitude of questions; which primers to order? which nucleotides to fill in the undefined places? which Tm value to choose? How many PCR cycles to run? At what Ct value is the sample positive? And when is it negative? And how many genes to test? Should all genes be tested, or just the E and RpRd gene as shown in Table 2 of the Corman-Drosten paper? Should the N gene be tested as well? And what is their negative control? What is their positive control? The protocol as described is unfortunately very vague and erroneous in its design that one can go in dozens of different directions. There does not appear to be any standardization nor an SOP, so it is not clear how this test can be implemented.

7. Consequences of the errors described under 1-5: false positive results.

The RT-PCR test described in the Corman-Drosten paper contains so many molecular biological design errors (see 1-5) that it is not possible to obtain unambiguous results. It is inevitable that this test will generate a tremendous number of so-called “false positives”. The definition of false positives is a negative sample, which initially scores positive, but which is negative after retesting with the same test. False positives are erroneous positive test-results, i.e. negative samples that test positive. And this is indeed what is found in the Corman-Drosten paper. On page 6 of the manuscript PDF the authors demonstrate, that even under well-controlled laboratory conditions, a considerable percentage of false positives is generated with this test:

“In four individual test reactions, weak initial reactivity was seen however they were negative upon retesting with the same assay. These signals were not associated with any particular virus, and for each virus with which initial positive reactivity occurred, there were other samples that contained the same virus at a higher concentration but did not test positive. Given the results from the extensive technical qualification described above, it was concluded that this initial reactivity was not due to chemical instability of real-time PCR probes and most probably to handling issues caused by the rapid introduction of new diagnostic tests and controls during this evaluation study.” [1]

The first sentence of this excerpt is clear evidence that the PCR test described in the Corman-Drosten paper generates false positives. Even under the well-controlled conditions of the state-of-the-art Charité-laboratory, 4 out of 310 primary-tests are false positives per definition. Four negative samples initially tested positive, then were negative upon retesting. This is the classical example of a false positive. In this case the authors do not identify them as false positives, which is intellectually dishonest.

Another telltale observation in the excerpt above is that the authors explain the false positives away as "handling issues caused by the rapid introduction of new diagnostic tests". Imagine the laboratories that have to introduce the test without all the necessary information normally described in an SOP.

8. The Corman-Drosten paper was not peer-reviewed

Before formal publication in a scholarly journal, scientific and medical articles are traditionally certified by “peer review.” In this process, the journal’s editors take advice from various experts (“referees”) who have assessed the paper and may identify weaknesses in its assumptions, methods, and conclusions. Typically a journal will only publish an article once the editors are satisfied that the authors have addressed referees’ concerns and that the data presented supports the conclusions drawn in the paper.” This process is as well described for Eurosurveillance [16].

The Corman-Drosten paper was submitted to Eurosurveillance on January 21st 2020 and accepted for publication on January 22nd 2020. On January 23rd 2020 the paper was online. On January 13th 2020 version 1-0 of the protocol was published at the official WHO website [17], updated on January 17th 2020 as document version 2-1 [18], even before the Corman-Drosten paper was published on January 23rd at Eurosurveillance.

Normally, peer review is a time-consuming process since at least two experts from the field have to critically read and comment on the submitted paper. In our opinion, this paper was not peer-reviewed. Twenty-four hours are simply not enough to carry out a thorough peer review. Our conclusion is supported by the fact that a tremendous number of very serious design flaws were found by us, which make the PCR test completely unsuitable as a diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus. Any molecular biologist familiar with RT-PCR design would have easily observed the grave errors present in the Corman-Drosten paper before the actual review process. We asked Eurosurveillance on October 26th 2020 to send us a copy of the peer review report. To date, we have not received this report and in a letter dated November 18th 2020, the ECDC as host for Eurosurveillance declined to provide access without providing substantial scientific reasons for their decision. On the contrary, they write that “disclosure would undermine the purpose of scientific investigations.” [24].

9. Authors as the editors

A final point is one of major concern. It turns out that two authors of the Corman-Drosten paper, Christian Drosten and Chantal Reusken, are also members of the editorial board of this journal [19]. Hence there is a severe conflict of interest which strengthens suspicions

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

that the paper was not peer-reviewed. It has the appearance that the rapid publication was possible simply because the authors were also part of the editorial board at Eurosurveillance. This practice is categorized as compromising scientific integrity .

SUMMARY CATALOGUE OF ERRORS FOUND IN THE PAPER

The Corman-Drosten paper contains the following specific errors:

1. There exists no specified reason to use these extremely high concentrations of primers in this protocol. The described concentrations lead to increased nonspecific bindings and PCR product amplifications, making the test unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.
2. Six unspecified wobbly positions will introduce an enormous variability in the real world laboratory implementations of this test; the confusing nonspecific description in the Corman-Drosten paper is not suitable as a Standard Operational Protocol making the test unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.
3. The test cannot discriminate between the whole virus and viral fragments. Therefore, the test cannot be used as a diagnostic for intact (infectious) viruses, making the test unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus and make inferences about the presence of an infection.
4. A difference of 10° C with respect to the annealing temperature T_m for primer pair1 (RdRp_SARSr_F and RdRp_SARSr_R) also makes the test unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.
5. A severe error is the omission of a Ct value at which a sample is considered positive and negative. This Ct value is also not found in follow-up submissions making the test unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

6. The PCR products have not been validated at the molecular level. This fact makes the protocol useless as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.
7. The PCR test contains neither a unique positive control to evaluate its specificity for SARS-CoV-2 nor a negative control to exclude the presence of other coronaviruses, making the test unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.
8. The test design in the Corman-Drosten paper is so vague and flawed that one can go in dozens of different directions; nothing is standardized and there is no SOP. This highly questions the scientific validity of the test and makes it unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.
9. Most likely, the Corman-Drosten paper was not peer-reviewed making the test unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.
10. We find severe conflicts of interest for at least four authors, in addition to the fact that two of the authors of the Corman-Drosten paper (Christian Drosten and Chantal Reusken) are members of the editorial board of Eurosurveillance. A conflict of interest was added on July 29 2020 (Olfert Landt is CEO of TIB-Molbiol; Marco Kaiser is senior researcher at GenExpress and serves as scientific advisor for TIB-Molbiol), that was not declared in the original version (and still is missing in the PubMed version); TIB-Molbiol is the company which was “the first” to produce PCR kits (Light Mix) based on the protocol published in the Corman-Drosten manuscript, and according to their own words, they distributed these PCR-test kits before the publication was even submitted [20]; further, Victor Corman & Christian Drosten failed to mention their second affiliation: the commercial test laboratory “Labor Berlin”. Both are responsible for the virus diagnostics there [21] and the company operates in the realm of real time PCR-testing.

CONCLUSION

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

In light of our re-examination of the test protocol to identify SARS-CoV-2 described in the Corman-Drosten paper we have identified concerning errors and inherent fallacies which render the SARS-CoV-2 PCR test useless.

The decision as to which test protocols are published and made widely available lies squarely in the hands of Eurosurveillance. A decision to recognise the errors apparent in the Corman-Drosten paper has the benefit to greatly minimise human cost and suffering going forward. Is it not in the best interest of Eurosurveillance to retract this paper? Our conclusion is clear. In the face of all the tremendous PCR-protocol design flaws and errors described here, we conclude: There is not much of a choice left in the framework of scientific integrity and responsibility.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

References

[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] Email communication between Dr. Peter Borger & Dr. Adam Meijer: Supplementary Material

[3] 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>

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

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

[6] Laboratory testing for COVID-19 Emergency Response Technical Centre, NIVD under China CDC March 15th, 2020:

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

[7] Real-Time PCR Handbook Life Technologies

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

Nolan T, Huggett J, Sanchez E. Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR) First Edition 2013

[8] 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/>

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

[9] Kurkela, Satu, and David WG Brown. "Molecular-diagnostic techniques." *Medicine* 38.10 (2009): 535-540.

[10] Wolfel *et al.*, Virological assessment of hospitalized patients with 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 JMJ, Caroline RA, Robert AH, Angela BW et al. (2003) *Science*. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300(5624): 1399-1404.

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

[15] 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-](https://www.researchgate.net/publication/341120750_A_SARS-like_Coronavirus_was_Expected_but_nothing_was_done_to_be_Prepared)

[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>

[16] Eurosurveillance paper evaluation / review process:

<https://www.eurosurveillance.org/evaluation>

[17] 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-](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf)

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

[18] Official WHO-recommendation for the Corman / Drosten RT-qPCR-protocol, which

directly derives from the Eurosurveillance-publication, document-version 2-1, published on

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

17th January 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>; archive: <https://bit.ly/2TqXBjX>

[20] 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>

[21] Christian Drosten & Victor Corman, responsible for viral diagnostics at Labor Berlin: <https://www.laborberlin.com/fachbereiche/virologie/>; archive: archive.is/CDEUG

[22] 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>

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

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

[24] ECDC reply to Dr. Peter Borger, 18th November 2020: Supplementary Material

[25] Prof. Dr. Ulrike Kämmerer & team, survey & Primer-BLAST table: Supplementary Material

Additional literature:

Description RT-PCR RKI Germany, on page 10 of this link:

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

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Author's Affiliations:

- 1) **Dr. Pieter Borger** (MSc, PhD), Molecular Genetics, W+W Research Associate, Lörrach, Germany,
- 2) Rajesh Kumar Malhotra (Artist Alias: **Bobby Rajesh Malhotra**), Former 3D Artist / Scientific Visualizations at CeMM - Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences (2019-2020), University for Applied Arts - Department for Digital Arts Vienna, Austria
- 3) **Dr. Michael Yeadon** BSc(Hons) Biochem Tox U Surrey, PhD Pharmacology U Surrey. Managing Director, Yeadon Consulting Ltd, former Pfizer Chief Scientist, United Kingdom,
- 4) **Dr. Clare Craig** MA, (Cantab) BM, BCh (Oxon), FRCPath, United Kingdom
- 5) **Kevin McKernan**, BS Emory University, Chief Scientific Officer, founder Medical Genomics, engineered the sequencing pipeline at WIBR/MIT for the Human Genome Project, Invented and developed the SOLiD sequencer, awarded patents related to PCR, DNA Isolation and Sequencing, USA
- 6) **Prof. Dr. Klaus Steger**, Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Molecular Andrology, Biomedical Research Center of the Justus Liebig University, Giessen, Germany
- 7) **Dr. Paul McSheehy** (BSc, PhD), Biochemist & Industry Pharmacologist, Loerrach, Germany
- 8) **Dr. Lidiya Angelova**, MSc in Biology, PhD in Microbiology, Former researcher at the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Maryland, USA
- 9) **Dr. Fabio Franchi**, Former Dirigente Medico (M.D) in an Infectious Disease Ward, specialized in "Infectious Diseases" and "Hygiene and Preventive Medicine", Società Scientifica per il Principio di Precauzione (SSPP), Italy
- 10) **Dr. med. Thomas Binder**, Internist and Cardiologist (FMH), Switzerland
- 11) **Prof. Dr. med. Henrik Ullrich**, specialist Diagnostic Radiology, Chief Medical Doctor at the Center for Radiology of Collm Oschatz-Hospital, Germany
- 12) **Prof. Dr. Makoto Ohashi**, Professor emeritus, PhD in Microbiology and Immunology, Tokushima University, Japan
- 13) **Dr. Stefano Scoglio**, B.Sc. Ph.D., Microbiologist, Nutritionist, Italy
- 14) **Dr. Marjolein Doesburg-van Kleffens** (MSc, PhD), specialist in Laboratory Medicine (clinical chemistry), Maasziekenhuis Pantein, Beugen, the Netherlands
- 15) **Dr. Dorothea Gilbert** (MSc, PhD), PhD Environmental Chemistry and Toxicology. DGI Consulting Services, Oslo, Norway

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

- 16) **Dr. Rainer J. Klement**, PhD. Department of Radiation Oncology, Leopoldina Hospital Schweinfurt, Germany
- 17) **Dr. Ruth Schruefer**, PhD, human genetics/ immunology, Munich, Germany,
- 18) **Dra. Berber W. Pieksma**, General Practitioner, The Netherlands
- 19) **Dr. med. Jan Bonte** (GJ), Consultant Neurologist, the Netherlands
- 20) **Dr. Bruno H. Dalle Carbonare** (Molecular biologist), IP specialist, BDC Basel, Switzerland
- 21) **Dr. Kevin P. Corbett**, MSc Nursing (Kings College London) PhD (London South Bank) Social Sciences (Science & Technology Studies) London, England, UK
- 22) **Prof. Dr. Ulrike Kämmerer**, specialist in Virology / Immunology / Human Biology / Cell Biology, University Hospital Würzburg, Germany

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Author's Contributions:

PB: Planned and conducted the analyses and research, conceptualising the manuscript.

RKM: Planned and conducted the research, conceptualising the figures and manuscript.

MY: Conducted the analyses and research.

KMcK: Conducted the analyses and research, conceptualized the manuscript.

KS: Conducted the analyses and research.

PMcS: Proofreading the analyses and research.

LA: Proofreading the analyses and research.

FF: Proofreading the analyses and research.

TB: Proofreading the analyses and research.

HU: Proofreading the analyses and research.

MO: Proofreading the analyses and research.

SS: Proofreading the analyses and research.

MDvK: Proofreading the analyses and research.

DG: Proofreading the analyses and research.

RJK: Proofreading the analyses and research.

RS: Proofreading the analyses and research, and the manuscript.

BWK: Proofreading the analyses and research.

RvV: Proofreading the analyses and research.

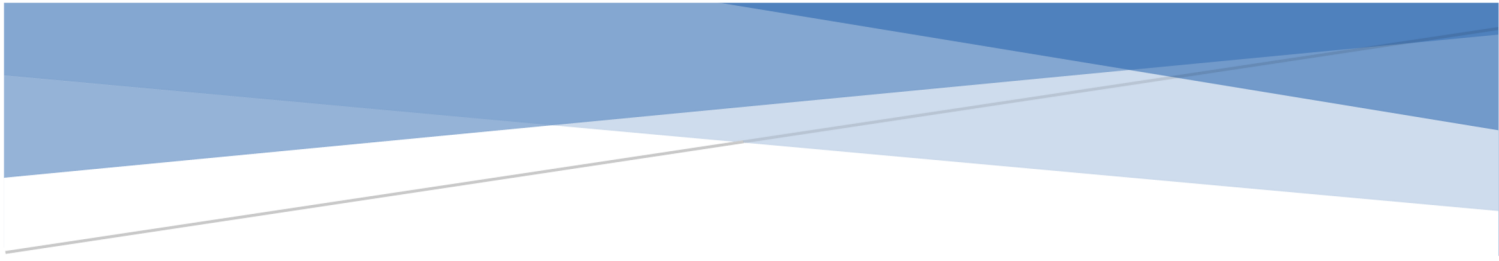
JB: Proofreading the analyses and research.

KC: Proofreading the analyses and research.

UK: Planned and conducted the analyses and research, conceptualising the manuscript.

Acknowledgement:

We are grateful to Saji N Hameed (Environmental Informatics, University of Aizu, Tsuruga, Ikki-machi, Aizuwakamatsu-shi, Fukushima, Japan) and Howard R. Steen (MA Chem. Eng. Cantab (1969-'73), Former Research Manager, UK) for proofreading our manuscript.



**Bewertung der Eignung der RT-qPCR Technik zum
Nachweis einer möglichen Infektion und
Infektiosität von Personen bezüglich SARS-CoV-2**

Gutachten

Kämmerer, Ulrike

Präfix

Die **Polymerase-Chain-Reaktion** (Polymerase Kettenreaktion; PCR) ist eine phantastische molekulare Methode, mit der sich im Labor winzigste Spuren einer gesuchten Nukleinsäure (DNA oder RNA, je nach Variante der PCR) nachweisen lassen. Diese macht die Technik zu einer wertvollen Hilfe in der Analyse von Genmustern in kleinsten Proben in der Forschung, aber auch in der Routinediagnostik, wie bei der forensischen Spurensicherung, der Kontaminationsüberwachung großer Chargen von Lebensmitteln und Getränken, der Spurensuche nach nicht zugelassenen Tierarten, z.B. in Fleisch/Wurstprodukten (Stichwort Pferdefleisch im Hackfleisch) oder der Überwachung von Blutprodukten auf virale Genome von HIV und Hepatitis-Viren.

Diese extreme Sensitivität macht die Technik allerdings auch sehr anfällig für Kontaminationen (s. „Phantom von Heilbronn“ unter Punkt 3.5) oder Überinterpretationen von Ergebnissen, wenn die PCR ohne weiteren Zusammenhang als alleiniges Kriterium herangezogen wird. So kann man eine gefundene Gensignatur einer gesuchten Person an einem Tatort nur als Indiz werten und damit weder sicher nachweisen, dass die Person dort persönlich anwesend war, noch ob die gefundene Genspur von einem Lebenden oder Toten stammt. Zum Vergleich: der Gennachweise mittels PCR ist so sensitiv, wie wenn ein Alkoholmeßgerät noch 0,0000000008-Promille Alkohol im Blut nachweisen und als „alkoholisiert“ ausgeben könnte und damit einen Autofahrer bei einer Kontrolle in Bedrängnis bringen würde, obwohl er keinen Tropfen Alkohol konsumiert und auch keinerlei Anzeichen für Alkoholkonsum hat.

Die Technik der PCR (auch RT-PCR oder RT-qPCR) kann unabhängig von der extremen Sensitivität jedoch immer nur das gesuchte Genstückchen vervielfältigen und nachweisen. Ob dieses jedoch aus einem lebensfähigen oder vermehrungsfähigen Organismus stammt, kann mit der Technik nicht geklärt werden.

Die in der SARS-CoV-2-Fallsuche verwendete **Reverse-Transkriptase-quantitative Polymerase Chain Reaktion (RT-qPCR)** ist eine Variante der PCR, in der das Ausgangsmaterial RNA erst in DNA umgeschrieben wird, um dann in der PCR so vervielfältigt zu werden, dass in jeder Kopierunde Lichtsignale einen Rückschluss auf die Menge der verdoppelten Genome geben. Als alleiniges Instrument der Diagnostik einer aktiven Infektion oder gar Infektiosität mit SARS-CoV-2 ist diese molekulare Technik aus zahlreichen Gründen bereits im Ansatz für eine Massentestung ungeeignet. Mittels der PCR-Technik kann allerdings bei vorbestehender Symptomatik eine Differentialdiagnose unterstützt werden, indem die Gensignatur eines möglichen Erregers detektierbar wird, die dann durch den Kliniker mit den Symptomen des Patienten in Einklang gebracht werden kann. Jedoch darf und kann eine PCR nie alleiniges Diagnostikum einer möglichen Erkrankung sein.

In der Diskussion um die Eignung der RT-qPCR für die Identifizierung von Covid-19-Patienten wird häufig ein positiver PCR-Test bei einer symptomfreien gesunden Person dazu verwendet, diese Person als „asymptomatischen Patienten“ zu bezeichnen. Nach allgemein gültigen Begriffsdefinitionen ist eine Person ohne klinische Symptome ("asymptomatisch") jedoch weder infiziert noch ein Patient, siehe hierzu ANNEX 1 (Begriffsdefinitionen) und Punkte 1.5 und 1.6.

Anmerkung: Viele Links im Text funktionieren nicht direkt, sondern müssen kopiert und in den Browser eingetragen werden

Inhalt

1. Definition und Beschreibung wichtiger Begriffe	4
1.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	4
1.2. Quantitative PCR (qPCR).....	5
1.3. Reverse Transkriptase (RT) Reaktion.....	6
1.4. Sensitivität und Spezifität.....	6
1.5. Infektion	7
1.6. Patient	7
2. Grundsätzliches zur diagnostischen Aussagekraft hinsichtlich der Frage „Infektiosität“	8
2.1. Offizielle Stellungnahmen wichtiger offizieller Institutionen / Experten.....	8
2.1.1. Schweizer Bundesamt für Bevölkerungsschutz.....	9
2.1.2. Dr. Antony Fauci	9
2.1.3. Prof. Marion Koopmanns	10
2.1.4. Schwedisches Gesundheitsministerium.....	11
2.1.5. National Centre for Infectious Disease in Singapur.....	12
2.1.6. Nature-Publikation Wölfel, Drosten zu Webasto-Fällen.....	12
2.1.7. Nature Reviews Arbeit von Isabella Eckerle (Genf).....	13
2.1.8. Zentrum für Evidenzbasierte Medizin	14
2.1.9. einer Informationsseite der Cleveland-Klinik.....	15
2.1.10. Offizielle Information der Kanadischen Regierung	15
2.1.11. CDC Richtlinie Influenza	16
2.1.12. Australisches Gesundheitsministerium und „Faktenchecker“-Einschätzung	16
2.1.13. RKI Webseite zur Bewertung PCR als nicht infektiös	18
2.1. Die Aufbereitung der Proben schließt den Nachweis replikationsfähiger Viren aus.....	18

2.3. Zwischenfazit:.....	19
2.2. Abbildung	21
3. Einflussfaktoren auf die Zuverlässigkeit des PCR-Test	22
3.1. Design der PCR und Spezifität	22
3.2. Anzahl der unabhängigen Ziel-Gene („Targets“).....	23
3.3. Anzahl der durchgeführten Zyklen (CT-Wert) bei der qPCR	25
3.3.1 Bedeutung des CT-Wertes.....	26
3.3.2 Belege für die Relevanz des CT-Wertes.....	27
3.4. Vortestwahrscheinlichkeit.....	34
3.4.1. Erklärt von Correctiv.....	34
3.4.2. Vom RKI anhand der Antigen-Schnelltests erklärt (Annex 7).....	36
3.4.3. Publikation zum Vortestproblem der PCR.....	37
3.5. Zwischenbewertung:	38
3.6. Adäquate Kontrollen	39
3.6.1. Bereitstellung adäquater Kontrollen:.....	40
3.6.2. Ringversuche: Auffälligkeiten beim ersten Ansatz.....	41
3.7. Ausschluss von Kontaminationen von Reagenzien und „Problemen im Handlungsablauf“	42
3.7.1 Kontamination innerhalb des Labors durch Fehler in der Durchführung	42
3.7.2. Kontamination der Materialien/Reagenzien ab Hersteller	44
3.7.3. Zwischenbewertung:	44
3.8. Kommerzielle PCR Testkits	45
4. Zusammenhang positiver Nukleinsäure-Nachweis in der RT-qPCR mit Erkrankung und Infektiosität.....	46
4.1. Bewertung Deutsches Ärzteblatt	46
4.2. CDC offiziell	46
4.3. Frankfurter Gesundheitsamt.....	47
4.4. CDC Veröffentlichung	47
4.5. WHO Information für Testlabors.....	47
4.6. Publikation in Lancet	48
4.7. Aussagen von Christian Drosten.....	48
4.7.1 Gerichtsgutachten Drosten	48
4.7.2. NDR Podcast 94	49
4.7.3. Publikation in Science.....	49
5. Aussagen zur PCR-Diagnostik aus den RKI-Protokollen	49
6. Fazit und Zusammenfassung	57
7. Anlagen	58

1. Definition und Beschreibung wichtiger Begriffe

1.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In einer **Polymerasekettenreaktion (PCR)** wird mithilfe des Enzyms Polymerase ein definiertes kurzes (üblicherweise 100-1000 Basen umfassendes) Stück der Desoxyribonukleinsäure (DNA) vervielfältigt. Das zu vervielfältigende DNA-Stück wird mithilfe von zwei sehr kurzen einzelsträngigen DNA-Abschnitten, den „Primern“, eingegrenzt.

Diese **Primer** bestehen üblicherweise aus einer definierten Abfolge von 18-25 Nukleinsäurebasen (die Primersequenz), welche spezifisch zu den Regionen auf der DNA passen, welche den zu vervielfältigenden Abschnitt flankieren. Um die Spezifität der PCR sicherzustellen, dürfen diese Primer explizit nur zu diesem flankierenden Bereich und zu keinem weiteren Bereich einer DNA passen. Mithilfe großer Gendatenbanken und entsprechender Software-Programme (z.B. Primer-Blast <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) können im PCR-Design diese Primer hochspezifisch entworfen werden. Bei spezialisierten Firmen werden aus den eingesendeten Primer-Sequenzen dann die Molekülketten synthetisiert und an das PCR-Labor bzw. den Hersteller von PCR-Kits ausgeliefert. Hier müssen diese Primer dann mit validen positiven und negativen Kontrollen unter verschiedensten Versuchsbedingungen erprobt und im Einsatz optimiert werden. So wird sichergestellt, dass mit dem verwendeten Primerpaar ausschließlich die zu suchende DNA erkannt und vervielfältigt wird, aber keinerlei andere ähnliche DNA-Abschnitte.

Sind die Primer gefunden und auf ihre Spezifität getestet, kann in einem Reaktionsansatz die zu vervielfältigende DNA mit dem Primerpaar, verschiedenen Hilfschemikalien sowie dem Enzym Polymerase gemischt und die Kettenreaktion gestartet werden.

Ablauf der PCR: Diese läuft in zyklischen Wiederholungen der folgenden einzelnen Schritte ab:

1. Das Gemisch wird bei über 90°C aufgeköcht (denaturiert). Hierdurch werden die üblicherweise als Doppelstrang vorliegenden DNA-Stränge in Einzelstränge getrennt, um die spätere Anheftung der Primer zu ermöglichen.

2. Beim folgenden Abkühlen auf die sogenannte „**Annealing-Temperatur**“ können sich die Primer an ihre passenden Regionen an den aufgetrennten DNA-Strängen anheften. Die Bindung der Primer, das Annealing, erfolgt nur in einem eng begrenzten Temperaturbereich, der sog. Schmelztemperatur. Diese hängt vor allem von der Basenzusammensetzung der Primer ab und daher wird deren Sequenz im Idealfall immer so gewählt werden, dass beide

Primer die gleiche Schmelztemperatur von ca. 60°C besitzen. Die angehefteten Primer bilden den Startpunkt für die Polymerase.

3. Diese Polymerase ergänzt von den Primern ausgehend die durch das Erhitzen vorliegende einzelsträngige DNA wieder zu einem passenden Doppelstrang (**Elongation**) meist bei ca. 72°C.

Durch die Lage der beiden Primer an den flankierenden Seiten des gesuchten DNA-Abschnittes sind an den Einzelsträngen die Elongationsreaktionen gegenläufig, da die Polymerase immer nur in eine Richtung arbeitet. Am Ende dieses Schrittes sind aus einer ursprünglichen doppelsträngigen DNA nun zwei identische doppelsträngige DNA-Moleküle entstanden, welche durch Aufkochen wieder getrennt, dann mithilfe der Primeranlagerung und der Polymerase in vier identische DNA-Moleküle vervielfältigt werden usw.

Jeder PCR-Zyklus aus Aufkochen-Annealing-Elongation bewirkt eine Verdopplung des gesuchten DNA-Abschnittes, so dass die Vervielfältigung im 2-er Logarithmus erfolgt und somit sehr schnell eine extrem hohe Anzahl von Kopien des ursprünglichen Ausgangsmaterials vorliegt.

So werden aus einem DNA-Strang nach 10 PCR-Zyklen bereits $2^{10} = 1.024$ DNA-Kopien, bei 20 Zyklen schon über 1 Million (1.048.576) und bei 30 Zyklen über 1 Milliarde (1.073.741.824) Kopien.

1.2. Quantitative PCR (qPCR)

Bei der **quantitativen PCR (qPCR)**-Technik, wie sie derzeit weltweit hauptsächlich zum Nachweis der genomischen RNA von SARS-CoV-2 eingesetzt wird, nutzt man ein drittes kurzes DNA-Stück, ähnlich der beiden Primer, welches mittig in dem gesuchten DNA-Abschnitt passend binden kann, die „**Probe**“ (**Sonde**). Anders als die beiden Primer ist diese Sonde noch mit zwei Molekülen verbunden, einem Fluoreszenzfarbstoff an einem Ende und einem weiteren Molekül (Quencher) am anderen Ende, welches das Aussenden der Fluoreszenz verhindern kann, solange sich beide gleichzeitig (also in unmittelbarer Nähe zueinander) an der Probe befinden. Beim Elongationsschritt baut die Polymerase nun diese Sonde ab. Dadurch wird der Quencher abgetrennt und das Fluoreszenzmolekül kann nun sein Farbsignal aussenden. Dieses Farbsignal wird im PCR-durchführenden Gerät (Thermozykler) erfasst und gemessen. Bei jedem PCR-Zyklus werden also entsprechend der steigenden Anzahl der Kopien immer mehr Fluoreszenzsignale frei, die Sonde „leuchtet“ immer stärker. Und die Kurve der Farbsignalintensität steigt mit jedem Zyklus. Ab einem bestimmten Wert übersteigt die Kurve dann das Hintergrundrauschen (Schwellenwert) und wird als positiv gewertet. Die Zykluszahl, bei welcher dieses Überschreiten des Schwellenwertes erfolgt, wird als **CT-Wert** bezeichnet (CT steht dabei für „Cycle Treshold“ = Zyklusschwelle).

Je schneller die Fluoreszenz über den gesetzten Schwellenwert ansteigt (niedriger CT), umso mehr Ausgangskopien der gesuchten DNA waren im PCR-Ansatz vorhanden. Da weder die Primer noch das Enzym Polymerase immer 100% spezifisch arbeiten, wird in jedem PCR-Ansatz auch ein Bruchteil unspezifische DNA mitkopiert. Und je mehr Zyklen die PCR durchläuft, umso größer ist die Gefahr, dass auch diese wenigen unspezifischen Reaktionen dann doch den Schwellenwert überschreiten. Ab einem CT-Wert von 40 ist daher mit größter Wahrscheinlichkeit von einem falsch positiven Signal aufgrund unspezifischer Ausgangsmaterialien auszugehen. Eine zuverlässige PCR sollte daher nicht mehr als 30-35 Zyklen benötigen, um ein deutliches Signal „positiv“ zu generieren, im Falle aktiver Infektionen mit gesuchten Viren ist von einer ausreichenden Zykluszahl von 25-30 auszugehen (siehe auch Punkt 3.2.).

1.3. Reverse Transkriptase (RT) Reaktion

Die **Reverse Transkriptase Reaktion (RT)** wird benötigt, wenn die zu vervielfältigende Ausgangsnukleinsäure nicht als DNA, sondern als Ribonukleinsäure (RNA) vorliegt, wie dies bei SARS-CoV-2 als RNA-Virus der Fall ist. Da in der PCR ausschließlich DNA vervielfältigt werden kann, muss eine RNA vorher in DNA überführt werden. Dies geschieht mithilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“, welches aus RNA einen komplementären Kopierstrang aus DNA erstellt, welcher dann als Ausgangsmaterial für die PCR dient.

Um die Zuverlässigkeit eines mittels RT-qPCR oder auch nur PCR erzielten Ergebnisses werten zu können, werden mithilfe von definierten Proben verdünnter korrekter Zielgene (z.B. RNA des gesuchten Virus) und sehr ähnlicher, aber nicht gesuchter Zielgene (z.B. nahverwandte Viren) die Sensitivität und die Spezifität des verwendeten Testsystems bewertet.

1.4. Sensitivität und Spezifität

Die **Sensitivität** gibt im Falle der PCR (in allen Variationen) an, wie empfindlich der Test auch noch kleinste Mengen des gesuchten Zielgens nachweise kann, die **Spezifität** beschreibt, wie zuverlässig der Test ausschließt, dass andere, nahverwandte Gene auch zu einem positiven Ergebnis (**falsch positiv**) führen. Je höher die Spezifität, umso sicherer ist auszuschließen, dass durch das PCR-System selber falsch positive Ergebnisse erzielt werden.

Hiervon unbenommen sind allerdings noch **falsch positive Ereignisse**, welche durch **Laborkontaminationen** mit Zielgenen, **Verunreinigungen von Testchemikalien** und **Kontaminationen direkt bei der Probenentnahme** entstehen können. Diese kontaminationsbedingten falsch positiven Ergebnisse können durch rigorose Qualitätssicherung und „Standard Operating Procedures“ (SOPs), dem Einsatz von speziell

geschultem Fachpersonal sowie permanenter externer Kontrolle in Form von Ringversuchen ausgeschlossen oder zumindest stark minimiert werden.

1.5. Infektion

Eine Infektion ist definiert als eine Situation, in der mindestens die folgenden drei Aspekte zusammen auftreten:

- Eindringen von Mikroorganismen (Keimen) wie Bakterien oder Viren in den Körper
- Diese eingedrungenen Mikroorganismen vermehren sich im Körper
- Und der Körper reagiert auf sie (Symptome)

Die Symptome einer Infektion mit dem SARS-CoV-2-Virus umfassen nach Angaben der CDC (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>)

- Fieber oder Schüttelfrost
- Husten
- Kurzatmigkeit oder Atembeschwerden
- Müdigkeit
- Muskel- oder Körperschmerzen
- Kopfschmerzen
- Neuer Verlust von Geschmack oder Geruch
- Halsschmerzen
- Verstopfte oder laufende Nase
- Übelkeit und/oder Erbrechen
- Diarrhöe

Weitere Quellenbeschreibungen für die allgemein gültige Definition des Begriffs "Infektion" siehe **ANNEX 1**

1.6. Patient

Ein Patient ist per definitionem eine Person, die von professionellen Gesundheitsdienstleistern betreut wird, die Symptome von Krankheiten oder Verletzungen aufweist oder andere Einschränkungen der vollständigen Gesundheit zeigt.

Nach der Definition kann also eine gesunde "symptomlose" Person ohne medizinische Probleme nicht als "Patient" bezeichnet werden. Weitere Quellenbeschreibungen zu dieser allgemein gültigen Definition des Begriffs "Patient" siehe **ANNEX 1**

2. Grundsätzliches zur diagnostischen Aussagekraft hinsichtlich der Frage „Infektiosität“

Der Erfinder des PCR-Tests, der im August 2019 verstorbene Nobelpreisträger Kary Mullis, hat immer wieder darauf hingewiesen, dass sein Test allein dazu geeignet ist, ein ansonsten für das menschliche Auge unsichtbares Molekül (die Desoxyribonukleinsäure, DNA) oder Fragment der DNA durch Vervielfältigung (Amplifikation) sichtbar zu machen. Nicht aber eine Aussage dazu zuzulassen, ob das, was sichtbar gemacht wurde, gefährlich ist oder krank macht.

Insbesondere kann ein PCR-Test – auch wenn er korrekt durchgeführt wird - keinerlei Aussage dazu treffen, ob eine Person mit einem aktiven Erreger infiziert ist oder nicht. Denn der Test kann nicht unterscheiden zwischen „toter“ Materie*, wie zum Beispiel einem völlig harmlosen Genomfragment als Überbleibsel des Kampfes des körpereigenen Immunsystems gegen eine Erkältung oder eine Grippe (solche Genom-Fragmente finden sich noch viele Monate, nachdem das Immunsystem das Problem „erledigt“ hat) und „lebender“ Materie, d.h. einem „frischen“, reproduktionsfähigen Virus.

* So wird die PCR beispielsweise auch in der Forensik eingesetzt, um aus Haarresten oder anderen Spurenmaterialien vorhandene Rest-DNA mittels PCR so zu vervielfältigen, dass die genetische Herkunft des/der Täter(s) erkennbar ist („Genetischer Fingerabdruck“). **Aber auch hier kann aufgrund der PCR-Analyse keine Aussage getroffen werden ob die identifizierte Person wirklich vor Ort war (oder nur mit ihren Genspuren „verseuchtes Material“ – siehe unter 3.5.2. Fall „Das Phantom von Heilbronn“) und, wenn diese Person vor Ort war, ob sie zu dem Zeitpunkt gelebt hat oder tot war.**

2.1. Offizielle Stellungnahmen wichtiger offizieller Institutionen / Experten

Über die Unbrauchbarkeit der PCR als alleiniger diagnostischer Test zum Nachweis einer Infektiosität bzw. Ansteckungsgefahr

Vorbemerkung: Auf der Seite vom Bundesgesundheitsministerium wird korrekt der Bezug auf den Einsatz der PCR zur Abklärung der möglichen Erregerart bei Erkrankten hergestellt.

(<https://www.bundesgesundheitsministerium.de/coronavirus/nationale-teststrategie/faq-covid-19-tests.html>). Dort heißt es unter „Welche Tests sind wofür geeignet:

*„**Laborbasierte PCR-Tests** als Goldstandard der Diagnostik werden in erster Linie dafür eingesetzt, **um bei einer Person mit Symptomen abzuklären**, ob eine Infektion mit SARS-CoV-2 vorliegt. Ein Arzt/eine Ärztin kann eine PCR-Testung im Rahmen der Krankenbehandlung veranlassen. Auch bei asymptomatischen Personen kann ein PCR-Test zur Bestätigung eines vorangegangenen positiven Antigentests sinnvoll sein.“*

Alle im Folgenden (A-J) dargelegten Quellen bestätigen, dass eine PCR (alle Formen davon) generell das jeweils gesuchte Genomfragment des gesuchten Erregers (hier RNA- Abschnitte des SARS-CoV-2 Virus) in einer Probe nachweisen können, nicht aber, ob eine Person aktiv infiziert ist und auch nicht, ob diese Person infektiös ist. Und nur die nachgewiesene Infektiosität kann ein Grund für eine angeordnete Isolation darstellen, das ist mithilfe der PCR NIEMALS möglich.

Belege im Einzelnen:

2.1.1. Schweizer Bundesamt für Bevölkerungsschutz

Explizit wird auf dem Infoblatt des **Schweizer Bundesamt für Bevölkerungsschutz BABS Labor Spiez** der Nachteil der PCR wie folgt aufgeführt: „Es können nur Erreger nachgewiesen werden, deren Gen-Sequenz bekannt ist. **Ob ein Erreger infektiös (virulent, «lebendig») ist oder nicht, bleibt unbekannt.**

Die Originalseite ist zwischenzeitlich nicht mehr auffindbar, aber im Webarchiv (https://web.archive.org/web/20210706132230/https://www.labor-spiez.ch//pdf/de/dok/pos/88_021_Plakate_PCR_d.pdf) weiterhin verfügbar.

Das Dokument ist als **ANNEX 2** angefügt.

2.1.2. Dr. Antony Fauci

Eine entscheidende Aussage über die Eignung des PCR-Tests als Parameter für das Übertragungsrisiko von Infektionskrankheiten machte **Antony Fauci, führender "Seuchenexperte und Regierungsberater" in den USA**, in einer MSNBC-Sendung vom 30.12.2021 (der Rachel Maddow Show) (Washington DC 9:04 PM; <https://www.youtube.com/watch?v=bAICMQ1D5F8>) ab Minute 6:35)

Frage des Reporters:

"...ist ein PCR-Test auch kein guter Parameter für die Übertragbarkeit und Isolierung? Wie kann man eigentlich feststellen, ob man in dem Zyklus, in dem man Covid hat, ansteckend ist? Wie kann man das messen, wenn nicht mit einem PCR-Test oder einem Antigentest?"

Dr. Fauci

"Ja, das ist eine sehr gute Frage, denn die PCR misst nicht das replikationsfähige Virus, sondern die Viruspartikel, die Nukleinsäure. Mit anderen Worten: Ich könnte infiziert sein, das replikationskompetente Virus aus mir entfernt haben, aber ich kann noch mehrere Tage nach meiner Genesung PCR-positiv sein und überhaupt nicht mehr übertragbar sein. Eine PCR ist also gut, um festzustellen, ob man infiziert ist - wenn ich infiziert bin, ja, ich bin infiziert, aber die Tatsache, dass sie positiv ist - der CDC-Direktor sagte, dass sie mehrere Tage und sogar Wochen später keinen Hinweis darauf gibt, ob man übertragbar ist oder nicht.

*Und ich denke, das ist die verständliche Verwirrung, die die Leute bei Tests haben. Tests sagen aus, ob man infiziert ist oder nicht, und nicht, ob man infiziert und übertragbar ist. **Der einzige Weg, um festzustellen, ob eine Infektion übertragbar ist, besteht darin, nachzuweisen, dass der Virus in einem lebt und sich vermehrt, und der Test misst das nicht.** (7:38) Er misst das Vorhandensein oder die Abwesenheit des Virus, und das Virus kann ein totes, inaktives Virus sein, das nicht übertragbar ist.“*

Im Original:

Question of Reporter:

„...is a PCR test not a good parameter either for transmissibility and isolation? How can people actually tell if they are contagious in the cycle of having covid? How do you measure that if not with either a PCR test or an antigen test?“

Dr. Fauci

*“Yes, that is a very good question **because PCR doesn't measure replication competent virus** it measures viral particles, nucleic acid. So in other words I could be infected, have cleared the replication competent virus from me but **I can continue to be positive with the PCR for several days after recovering and not being transmissible at all.** So a PCR is good to tell you if you are be - if I am infected yes I am infected but the very fact that it is positive - the CDC director said for several days and even weeks later **it doesn't give you any indication of whether or not you are transmissible.***

And I think that's the understandable confusion that people have about testing. Testing say whether you are infected or not versus are you infected plus transmissible.

***The only way you can tell if it is transmissible if you can show that there really is life replication virus in you and the test don't measure that** (7:38) They measure the presence or absence of the virus and the virus can be dead inactive virus that doesn't transmit“*

2.1.3. Prof. Marion Koopmanns

Auch **Marion Koopmanns**, die Direktorin der Abteilung für Viruswissenschaften an der Erasmus Universität und Fachberaterin der WHO, somit eine der zentralen Virologinnen der Corona-Frage und gleichzeitig Mitautorin in der RT-qPCR Publikation von Corman/Drosten in Eurosurveillance bestätigt in einem Interview mit NPO Radio 1 (26.11.2020 im Rahmen ihres Podcastes „Virusfeiten“ <https://www.nporadio1.nl/podcasts/virusfeiten/46542/4-blijvend-moe-na-corona-mischien-helpt-een-aspirientje>), **dass die PCR nicht geeignet ist über den Status Infektiosität zu entscheiden.** (ab Minute 0:09 in <https://www.youtube.com/watch?v=flsF7trvq2c>)

Explizit die entscheidende Passage des Interviews mit Marion Koopmanns (MK):

„MK: ...es kursieren einige Geschichten, die sagen, na ja, der PCR-Test ist nicht gut. Interviewer: Zumindest zeigt es nicht unbedingt, dass man ansteckend ist.

MK: Ja, genau. Und das stimmt auch. Denn die PCR zeigt, dass Sie die Virus-RNA mit sich führen. Das ist buchstäblich das, was die PCR tut. **Und ob diese RNA in einem Viruspartikel steckt, der noch intakt und auch infektiös ist. Oder ob es sich nur um Reste von RNA handelt, die noch lange nach einer Infektion nachgewiesen werden können. Das kann nicht unterschieden werden.** Sie können ein Gefühl dafür bekommen, indem Sie nachschauen "Wieviel gibt es?". Aber man kann diesen Unterschied nicht sehr gut erkennen. Das heißt: dieser Test ist prima, um zu sagen "Sie haben es gehabt", **aber dieser Test ist weniger geeignet, um zu sagen "zu diesem Zeitpunkt sind Sie noch ansteckend".**

Interviewer: Sie sprechen gerade über den PCR-Test, nicht wahr?

MK: Ja.

Im Original:

“ MK: ...er ciruleren wat verhalen waarin gezegd wordt, nou ja, de PCR test ist niet goed.

Interviewer: Althans die toont niet perse aan dat je besmettelijk bent.

MK: Ja precies. En dat klopt ook. Want de PCR toont aan dat jij het virus RNA bij je hebt. Dat is letterlijk wat de PCR doet. En of dat RNA in een virus deeltje zit dat nog intact is en ook besmettelijk is. Of dat het gewoon restjes RNA zijn, die je nog een tijd lang nadat iemand geïnfecteerd is geweest, kunt aantonen, dat onderscheid zie je niet. Je kunt een beetje een gevoel krijgen door te kijken "hoeveel is het?". Maar dat verschil is niet goed te maken. Dat betekent, die test is prima om te zeggen "je hebt het gehad", maar die test is minder geschikt om te zeggen "op dit moment ben je nog besmettelijk".

Interviewer: Over de PCR test heb je het nu, huh?

MK: ja“

2.1.4. Schwedisches Gesundheitsministerium

Das **schwedische Gesundheitsministerium** erklärt auf seiner offiziellen Webseite (<https://www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/publikationsarkiv/v/vagledning-om-kriterier-for-bedomning-av-smittfrihet-vid-covid-19/>): „Die PCR-Technologie, die in Tests zum Nachweis von Viren verwendet wird, kann nicht zwischen Viren unterscheiden, die in der Lage sind, Zellen zu infizieren, und Viren, die vom Immunsystem unschädlich gemacht wurden, **und daher können diese Tests nicht verwendet werden, um festzustellen, ob jemand infektiös ist oder nicht.** RNA von Viren kann oft noch Wochen (manchmal Monate) nach der Infektion nachgewiesen werden, bedeutet aber nicht, dass eine Person noch infektiös ist.“

Im Original

„PCR-tekniken som används i test för att påvisa virus kan inte skilja på virus med förmåga att infektera celler och virus som oskadliggjorts av immunförsvaret och därför kan man inte använda dessa test för att avgöra om någon är smittsam eller inte. RNA från virus kan ofta påvisas i veckor (ibland månader) efter insjuknandet men innebär inte att man fortfarande är smittsam.“ Diese Beurteilung wurde am 19.04.2021 bestätigt.

2.1.5. National Centre for Infectious Disease in Singapur

Ebenfalls bereits im Mai 2020 wurde vom **National Centre for Infectious Disease in Singapur** ein Positionspapier veröffentlicht, in dem unter Punkt 5 darauf hingewiesen wird, dass es wichtig ist darauf hinzuweisen, dass der Nachweis viraler RNA durch PCR nicht mit Infektiosität oder lebensfähigem Virus gleichzusetzen ist (<https://www.ncid.sg/Documents/Period%20of%20Infectivity%20Position%20Statementv2.pdf>).

Im Original:

„...it is important to note that viral RNA detection by PCR does not equate to infectiousness or viable virus“

2.1.6. Nature-Publikation Wölfel, Drosten zu Webasto-Fällen

In einer **Nature-Publikation**, in der die Analyse der ersten Covid-19-Fälle in Deutschland beschrieben wird (<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>), identifizierten die Autoren (darunter **R. Wölfel, C. Drosten und V. Corman**) die SARS-CoV-2-positiven Fälle durch die TIB-Molbiol/Roche-PCR für den Nachweis des E- und RdRp-Gens und verglichen die PCR-Ergebnisse mit dem Goldstandard: der „Virusisolierung in Zellkultur“.

Hinsichtlich der PCR etablieren die Autoren ein eigenes Nachweissystem auf RT-PCR Basis, um: *„...den Nachweis einer aktiven Virusreplikation bei fehlender Histopathologie zu erbringen, haben wir RT-PCR-Tests durchgeführt, um virale subgenomische RNA direkt in klinischen Proben zu identifizieren. (...) Virale subgenomische mRNA wird nur in infizierten Zellen transkribiert und nicht in Virionen verpackt und zeigt daher das Vorhandensein aktiv infizierter Zellen in Proben an.“*

Im Original:

“To obtain proof of active virus replication in the absence of histopathology, we conducted RT-PCR tests to identify viral subgenomic RNAs directly in clinical samples. (...) Viral subgenomic mRNA is transcribed only in infected cells and is not packaged into virions, and therefore indicates the presence of actively infected cells in samples“.

Das bedeutet, dass schon sehr früh bekannt und publiziert war, **dass die üblichen RT-qPCRs, die genomische RNA von SARS-CoV-2 nachweisen, keine Entscheidung darüber zulassen, ob möglicherweise ein aktiv replizierendes Virus in der Probe vorhanden ist.** Spätestens zu diesem Zeitpunkt hätten also alle PCR-Empfehlungen der WHO auf den Nachweis subgenomischer RNA umgestellt werden müssen - was bedeutend besser wäre als der genomische Nachweis, aber dennoch nach wie vor nur die Wahrscheinlichkeit einer Virusreplikation auf RNA-Ebene angibt und kein endgültiger Nachweis eines infektiösen Virus ist.

2.1.7. Nature Reviews Arbeit von Isabella Eckerle (Genf)

In einer Übersichtsarbeit, welche am 02.12.2022 in **Nature Reviews Microbiology** (<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>) publiziert wurde, wird an mehreren Stellen explizit darauf hingewiesen, dass eine RT-PCR weder dazu geeignet ist, infektiöse Viren nachzuweisen noch infektiöse (ansteckende) Menschen sicher zu diagnostizieren. Bemerkenswert an dieser Publikation ist, dass sie mit **Isabella Eckerle** als Seniorautorin von einer engen Mitstreiterin von Christian Drosten verantwortet wird.

Zitate im Einzelnen:

Einleitung, erster Absatz:

*“Der Nachweis viraler RNA in Atemwegsproben mittels RT-PCR ist zwar hochempfindlich und spezifisch, unterscheidet aber nicht zwischen replikationsfähigen Viren und Rest-RNA.”
“Dies liegt daran, dass virale RNA (die von der RT-PCR erfasst würde) in Abwesenheit infektiöser Viren nachweisbar bleibt, während die Positivität von Ag-RDTs besser mit der Anwesenheit infektiöser Viren korreliert.“*

Im Original:

*„Although detection of viral RNA in respiratory specimens by RT-PCR is highly sensitive and specific, it does not distinguish between replication-competent virus and residual RNA.“
“This is because viral RNA (which would be picked up by RT-PCR) remains detectable in the absence of infectious virus, whereas positivity of Ag-RDTs better correlates with the presence of infectious virus.“*

Unter der Überschrift: “Detection of RNA viral load”

“Obwohl die RT-PCR die Infektiosität nicht direkt bestimmen kann, da sie nicht zwischen replikationsfähigem (infektiösem) Virus und restlicher (nicht infektiöser) viraler RNA unterscheiden kann, wurde nach einer Korrelation zwischen der RNA-Viruslast und dem Vorhandensein infektiöser Viren gesucht.“

Im Original:

“Although RT-PCR cannot directly determine infectiousness owing to its inability to differentiate between replication-competent (infectious) virus and residual (non-infectious) viral RNA, a correlation between RNA viral load and the presence of infectious virus has been sought.“

Unter der Überschrift: “SARS-CoV-2 diagnostic in public health“:

„Leider gibt es derzeit keinen diagnostischen Point-of-Care-Test zur Bestimmung der Infektiosität von SARS-CoV-2 in einer Patientenprobe, und die oben beschriebene Viruskultur ist für diagnostische Zwecke nicht geeignet. Daher wurde eine Reihe von Ansätzen vorgeschlagen, um einen Näherungswert für die Infektiosität zu finden, der die Isolierungszeiträume vorgibt“

Im Original:

„Unfortunately, no point-of-care diagnostic test currently exists to determine infectious SARS-CoV-2 in a patient sample, and virus culture as described above is not suited for diagnostic purposes. Thus, a range of approaches have been suggested to find a proxy for infectiousness to guide isolation periods.”

Anmerkung: Es ist zu beachten, diese Aussage stammt aus dem Dezember 2022, also fast 3 Jahre nach dem Einführen der RT-qPCR zur direkten Testung (Point of care) von vermeintlich infektiösen Personen in den Testzentren als Basis der Inzidenzen, der R-Werte und der daraus resultierenden Maßnahmen!!! Diese Aussage wird sogar in der Schlussfolgerung dieser Übersichtsarbeit nochmals explizit verstärkt:

Im Abschnitt “Conclusions”:

*“Obwohl während der Pandemie viele Fortschritte auf dem Gebiet der Diagnostik gemacht wurden, **gibt es bis heute keine diagnostischen Tests, die das Vorhandensein eines infektiösen Virus zuverlässig nachweisen.**“*

Im Original:

“Although much progress has been made during the pandemic in the field of diagnostics, to date, no diagnostic tests exist that reliably determine the presence of infectious virus.”

2.1.8. Zentrum für Evidenzbasierte Medizin

Unter dem Titel „PCR-Positive: Was bedeuten sie?“ (original: “PCR positives: what do they mean?”) wird in einem Beitrag vom 17.September 2020 auf der Seite des **Zentrums für Evidenzbasierte Medizin** ([PCR positives: what do they mean? - The Centre for Evidence-Based Medicine \(cebm.net\)](https://www.cebm.net)) detailliert auf die Interpretation der RT-PCR Ergebnisse zur Detektion von SARS-CoV-2 eingegangen.

Mit Bezug auf eine Übersichtsarbeit von Jefferson T - ursprünglich Preprint, welche schließlich im Dezember 21 in der Zeitschrift „Clinical Infectious Diseases) veröffentlicht wurde ([Viral Cultures for Coronavirus Disease 2019 Infectivity Assessment: A Systematic Review - PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/)) - wird folgendes Fazit gezogen:

*„Der PCR-Nachweis von Viren ist hilfreich, solange seine Genauigkeit nachvollziehbar ist: Er bietet die Möglichkeit, RNA in winzigen Mengen nachzuweisen, aber **es kann unklar sein, ob diese RNA ein infektiöses Virus darstellt**“ (Im Original: „PCR detection of viruses is helpful so long as its accuracy can be understood: it offers the capacity to detect RNA in minute quantities, **but whether that RNA represents infectious virus may not be clear**“)*

Die Explizite Schlussfolgerung im Abstract der Publikation lautet:

„Für die Übertragung sind vollständige Lebendviren erforderlich, nicht die durch PCR identifizierten Fragmente. Durch prospektive Routinetests von Referenz- und Kulturproben

und deren Beziehung zu Symptomen, Anzeichen und Patienten-Kofaktoren sollte die Zuverlässigkeit der PCR zur Beurteilung des Infektionspotenzials bestimmt werden. Bei Proben mit hohem Ct-Wert ist es unwahrscheinlich, dass sie ein infektiöses Potenzial haben.“

Im Original: **“Conclusions:** *Complete live viruses are necessary for transmission, not the fragments identified by PCR. Prospective routine testing of reference and culture specimens and their relationship to symptoms, signs, and patient co-factors should be used to define the reliability of PCR for assessing infectious potential. Those with high Ct are unlikely to have infectious potential.”*

2.1.9. einer Informationsseite der Cleveland-Klinik

Zur Frage, warum eine PCR positiv sein kann, obwohl die betroffenen Personen weder symptomatisch noch ansteckend sind, steht auf einer **Informationsseite der Cleveland-Klinik** ([PCR Test for COVID-19: What It Is, How Its Done, What The Results Mean \(clevelandclinic.org\)](https://www.clevelandclinic.org/health/condition/12000/pcr-test-for-covid-19-what-it-is-how-it-is-done-what-the-results-mean)):

„Das bedeutet, dass der Test weiterhin Fragmente des SARS-CoV-2-Virus nachweisen kann, auch wenn Sie sich von COVID-19 erholt haben und nicht mehr ansteckend sind. Sie können also weiterhin positiv getestet werden, wenn Sie in der Vergangenheit an COVID-19 erkrankt waren, auch wenn Sie das SARS-CoV-2-Virus nicht mehr auf andere übertragen können.“

Im Original: *“This means that the test can continue to detect fragments of SARS-CoV-2 virus even after you’ve recovered from COVID-19 and are no longer contagious. So you may continue to test positive if you’ve had COVID-19 in the distant past, even though you can’t spread the SARS-CoV-2 virus to others.”*

2.1.10. Offizielle Information der Kanadischen Regierung

Auch die durch besonders strikte „Corona-Maßnahmen“ bekannt gewordene **kanadische Regierung** hatte bereits mit letztem Änderungsdatum 10.06.2021 unter dem Kapitel „CT-Werte und Infektiosität“ (Im Original: „Ct values und infectiousness“) bestätigt, dass eine Person als infektiös gilt *„..... wenn sie Viruspartikel ausscheidet, die intakt und in der Lage sind, andere zu infizieren. PCR-Tests können nicht unterscheiden zwischen genomischem Virusmaterial, das von intakten Viruspartikeln bei infektiösen Personen stammt, und Viruspartikelfragmenten, die bei Personen vorhanden sind, die sich erholt haben“*

Im Original: *„A person is deemed infectious if they shed virus particles that are intact and able to go on to infect others. PCR tests cannot distinguish viral genomic material coming from intact viral particles in persons who are infectious or viral particle fragments that are present in individuals who have recovered.“*

2.1.11. CDC Richtlinie Influenza

Was für die SARS-CoV-2 PCR-Diagnostik gilt, war schon vorher für **Influenza CDC Richtlinie.**

Dieser hier für SARS-CoV-2 angeführte und vielfach durch Zitate belegte Aspekt, dass eine positive PCR nicht gleichzusetzen ist mit einer aktiven Infektion oder gar einer Aussage darüber, ob eine Person infektiös (ansteckend) ist, wurde z.B. auch bereits im Rahmen der Influenzadiagnostik durch das CDC auf dessen Internetseite explizit benannt ([Information on Rapid Molecular Assays, RT-PCR, and other Molecular Assays for Diagnosis of Influenza Virus Infection | CDC](#)). Mit letzter Änderung vom 21.10.2019 lautet dort das Fazit unter „Interpretation der Testergebnisse“ (interpretation of testing results):

„Ein positives Ergebnis bedeutet, dass in der untersuchten Atemwegsprobe Influenzavirus-RNA oder -Nukleinsäuren nachgewiesen wurden, was eine Infektion mit dem Influenzavirus bestätigt, aber nicht unbedingt bedeutet, dass ein infektiöses Virus vorhanden ist oder dass der Patient ansteckend ist.“

Im Original: *“A positive result indicates detection of influenza viral RNA or nucleic acids in the respiratory specimen tested, confirming influenza virus infection, but does not necessarily mean infectious virus is present or that the patient is contagious.”*

Und bereits in der Einführung (Background) ist zu lesen:

„Der Nachweis von RNA oder Nukleinsäuren des Influenzavirus durch molekulare Tests bedeutet nicht unbedingt, dass ein lebensfähiges Virus oder eine laufende Replikation des Influenzavirus nachgewiesen wurde.“

Im Original:

“Notably, the detection of influenza viral RNA or nucleic acids by molecular assays does not necessarily indicate detection of viable virus or on-going influenza viral replication”

2.1.12. Australisches Gesundheitsministerium und „Faktenchecker“-Einschätzung

Senator Gerd Rennik fragte am 11.11.2021 die **australische Arzneimittelbehörde TGA** (Therapeutic Goods Administration), ob der PCR-Test «den Unterschied zwischen einem lebendigen und toten Virus erkennen» könne. Die Behörde antwortete am 31.01.2022 wie in Annex 6 nachzulesen: *„PCR-Tests sind zwar hochsensitiv und weisen das genetische Material des SARS-CoV-2-Virus nach, sie können aber nicht zwischen dem lebenden und toten Virus unterscheiden. (...) Manchmal, wenn das Virus nicht mehr lebt und sich nicht mehr vermehrt, können virale genetische Fragmente durch PCR nachgewiesen werden und schwach positive Ergebnisse liefern.“*

Im Original: *„While PCR tests are highly sensitive and detect the genetic material of the SARS-CoV-2 virus, they cannot differentiate between live and dead virus. (...) Sometimes, when the virus is no longer alive and replicating, viral genetic fragments can be detected by PCR and produce weak positive results.“*

Im „**Faktencheck der DPA**“ vom 20.05.22 ([Australische Behörde betont Wert von PCR-Tests \(dpa-factchecking.com\)](https://www.dpa-factchecking.com)) wird hierzu Stellung genommen und bereits einleitend hervorgehoben, **„Dass die PCR-Tests zur Feststellung von Corona-Infektionen nicht hundertprozentig fehlerfrei sind, ist unbestritten.“** Und weiter unten im Text nochmals explizit: **„Die Tatsache, dass es bei PCR-Tests sowohl zu falsch-negativen als auch zu falsch-positiven Testergebnissen kommen kann, ist bekannt, seit es solche Tests gibt.“**

Auch die „**Faktenchecker**“ von **Correctiv**“ betonten in ihrer Meldung am 14.06.2022 [Australische Arzneimittelbehörde erklärte PCR-Tests nicht für sinnlos \(correctiv.org\)](https://www.correctiv.org) **„Das australische Gesundheitsministerium hat erklärt, dass PCR-Tests das Vorhandensein von Erbmateriale des Coronavirus nachweisen, auch wenn das Virus sich nicht mehr vermehren kann. Das ist lange bekannt und bedeutet nicht, dass die Tests keine Aussagekraft haben.“**

Weiter wird im Text auf **Friedemann Weber**, Direktor am Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen, verweisen, der Correctiv auf Anfrage schrieb: **„PCR kann tatsächlich nicht erkennen, ob ein Genmaterial von einem sich vermehrenden Virus stammt oder nicht. Allerdings muss das Genmaterial ja irgendwie mal produziert worden sein. Und das kann eigentlich nur von einer Infektion stammen.“** Beim Ausklingen einer Infektion **könne das PCR-Signal tatsächlich auf Partikel zurückgehen, die zum Beispiel vom Immunsystem inaktiviert worden seien.** „Aber auch da muss man zuvor eben infiziert gewesen sein“, schrieb uns Weber.

Und schließlich wird im „Faktencheck“ hervorgehoben: **„Ein positiver PCR-Test zeigt mit 98-prozentiger Wahrscheinlichkeit eine Infektion“.** Dass diese 98% Wahrscheinlichkeit jedoch nur in einer Gruppe von Menschen mit hoher Krankheitsrate zutrifft, hängt von der sogenannten „Vortestwahrscheinlichkeit“, der Prävalenz ab (siehe auch Kapitel 3.4), wie 2022 in einem Aufsatz der Biostatistikerin Prof. Christel Weiß aus Mannheim anschaulich publiziert wurde (Notfall Rettungsmed 2022; 25:48-50 [PCR-Tests und Schnelltests – Wie zuverlässig sind sie? | SpringerLink](https://www.springerlink.com)). Hier wurde bei einer angenommenen Empfindlichkeit (Sensitivität) von 99% und Zuverlässigkeit (Spezifität) eines PCR Tests von 99,5% aufgezeigt, dass bei hohen Prävalenz von 20%, z.B. in einer Hochrisikogruppe eines Pflegeheims zu erwarten ist, dass von 10.000 Tests 2020 ein positives Ergebnis liefern, wovon allerdings 40 falsch positiv zu erwarten sind. Bei einer niedrigen Prävalenz (wie z.B. in der Massentestung einer gesunden Population wie Jugendlichen) von 1% betont die Autorin, dass Vorsicht angebracht ist: denn **„Ein Drittel aller positiven Befunde ist nämlich falsch“.** Die Aussage beruht auf der in Tabelle 1 der Publikation aufgezeigten Berechnung, dass bei der gewählten Beispielgruppe von Jugendlichen von 100 echt Infizierten aus einer Gruppe von 10,000 Getesteten mit 99 „echt positiven“ aber eben auch 49,5 „falsch positiven“ Ergebnissen gerechnet werden muß. Auch in dieser Publikation wird in der Zusammenfassung hervorgehoben: **„Ferner ist zu beachten: Eine nachgewiesene Infektion**

mittels eines PCR-Tests bedeutet nicht zwangsläufig, dass die betreffende Person ansteckend oder erkrankt ist“

2.1.13. RKI Webseite zur Bewertung PCR als nicht infektiös

Auf der Seite des **RKI** zum Thema „Hinweise auf Testungen von Patientinnen und Patienten auf SARS-CoV-2 (abgerufen 02.08.2023) [RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - Hinweise zur Testung von Patientinnen und Patienten auf SARS-CoV-2](#) steht unter der Zwischenüberschrift „Positive PCR-Ergebnisse bei Genesenen“:

„Im Unterschied zu replikationsfähigem Virus ist SARS-CoV-2 virale RNA bei vielen konvaleszenten Patienten noch Wochen nach Symptombeginn in der RT-PCR nachweisbar (Xiao et al., 2020; Zheng et al., 2020; Zhou et al., 2020). Dass diese positiven RT-PCR-Ergebnisse bei konvaleszenten Patienten nicht zwingend mit Kontagiosität gleichzusetzen sind, wurde bereits zu Beginn der Pandemie demonstriert, zum einen durch die parallele Durchführung von PCR und Virusanzucht (Bullard et al., 2020; Covid-Investigation Team, 2020; Singanayagam et al., 2020; Wolfel et al., 2020) und zum anderen durch eine großangelegte Studie des koreanischen CDC, die unter anderem Kontaktpersonen von genesenen Patienten mit erneut positiver PCR untersuchte (Korea Centers for Disease Control, 2020).“

Insofern war laut RKI bereits sehr früh offiziell bekannt, dass eine positive PCR nicht mit einer Infektiosität (Kontagiosität) gleichzusetzen ist, was der missbräuchlichen Verwendung positiver PCR-Ergebnisse zur Durchsetzung von Isolationsmaßnahmen eindeutig widerspricht.

2.1. Die Aufbereitung der Proben schließt den Nachweis replikationsfähiger

Viren aus

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur Beurteilung der Frage, ob ein RT-qPCR Test eine Aussage über die Infektiosität einer positiv getesteten Person trifft, also die Frage, inwieweit das positive RT-qPCR Ergebnis auf die Anwesenheit von vermehrungsfähigen Viren schließen lässt, ist die Aufbereitung der Probe für die RT-qPCR.

Aus dem Abstrichmaterial muss die RNA des gesuchten Gens (hier: SARS-CoV-2 Virus Genom), isoliert werden, um für einen Gennachweis in der RT-qPCR einsetzbar zu sein. Ein entscheidender Schritt hierbei ist die komplette Denaturierung allen biologischen Materials und Abtrennung der Hauptkomponenten Eiweiß, Fette und Nukleinsäuren, um letztendlich die RNA als Startbasis für die RT-qPCR vorliegen zu haben. Das Originalprotokoll von Chomczynski und Sacci aus dem Jahr 1987 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2440339/>; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406285/>) ist nach wie vor Bestandteil nahezu aller Protokolle zur Aufreinigung biologischen Materials zur RNA-Isolation, sei es laboreigen hergestellt oder in gekauften „Extraktionskits“. Komponenten der originalen

Extraktionslösungen sind Phenol/Chloroform und Isoamylalkohol, in verschiedenen abgewandelten kommerziellen Lösungen, auch ähnlich wirkende, jedoch weniger giftige Substanzen. Alle haben zu eigen, dass sie jede lebende oder vermehrungsfähige biologische Struktur komplett zerstören.

Dies bedeutet: **im Laborprozess der Aufbereitung einer Abstrichprobe, welcher zwingend der RT-qPCR vorgeschaltet ist, wird jedes biologische Material, sei es nun eine vitale Zelle, ein vermehrungsfähiges Virus oder auch nur Zelltrümmer und Genreste, so denaturiert, dass keinerlei Aussage mehr möglich ist, ob das Material von einem intakten oder gar vermehrungsfähigen Organismus oder von bereits vorgeschädigten oder zerstörten Proben stammt.** Durch diesen Extraktions- und Aufbereitungsprozess bedingt kann keinesfalls aus einer positiven RT-qPCR, welche Genom-Fragmente nachweist, auf das Vorhandensein replikationsfähiger Viren in der Abstrichprobe geschlossen werden, es kann immer nur die isolierte RNA, unabhängig von der Quelle, nachgewiesen werden.

2.3. Zwischenfazit:

Selbst wenn also bei der Durchführung der PCR inklusive aller vorbereitenden Schritte (PCR-Design und Etablierung, Probenentnahme, Aufbereitung und PCR-Durchführung) alles „richtig“ gemacht wird und der Test positiv ist, d.h.: eine Genom-Sequenz erkennt, welche ggf. auch in einem oder sogar dem konkreten „Corona“-Virus (SARS-CoV-2) existiert, **kann diese Technik unter keinen Umständen nachweisen, dass die Person, welche positiv getestet wurde, mit einem replizierenden SARS-CoV-2 infiziert und folglich für andere Personen ansteckend = gefährlich sein könnte.**

Eine bessere Plausibilität eines positiven PCR-Ergebnisses hinsichtlich einer Virusinfektion und vor allem eines im Gewebe replizierenden Virus wäre der - bereits in der unter Punkt 2.1.F erwähnten Publikation beschriebene - Nachweis der subgenomischen RNA gewesen. **Da diese sgRNA nur bei der Bildung neuer Viren in einer infizierten Zelle auftritt, kann sie immerhin als Indiz (Indikator), wenn auch nicht als Beweis einer aktiven Virusinfektion herangezogen werden.** Hierzu ist in der unter Punkt 2.1.G aufgeführten Publikation sehr gut unter dem Punkt „SARS-CoV-2 diagnostics in public health“ dargestellt:

*„Ein Beispiel ist der Nachweis von sgRNA-Transkripten, die bei der Virusreplikation und insbesondere bei der Synthese von Negativstrang-RNA entstehen. Obwohl sgRNAs in infizierten Zellen transkribiert werden, sind sie nicht in den Virionen verpackt und können daher **als Indikator für eine aktive Replikation und damit für infektiöse Viren dienen.** Es wurden spezifische RT-PCR-Assays entwickelt, um sgRNAs zusätzlich zum diagnostischen Nachweis genomischer SARS-CoV-2-RNA nachzuweisen, **doch haben sich diese Assays aufgrund ihrer geringeren Empfindlichkeit als herkömmliche RT-PCR-Assays nicht für den routinemäßigen diagnostischen Einsatz durchgesetzt.**“*

[...]

Obwohl das Fehlen von sgRNA auf eine fehlende Virusreplikation hinweist, ist das Vorhandensein von sgRNA also nicht unbedingt ein Hinweis auf Infektiosität.“

Im Original:

„One example is the detection of sgRNA transcripts, which are generated during virus replication, and specifically the synthesis of negative-strand RNA. Although sgRNAs are transcribed in infected cells, they are not packaged in the virions and can therefore serve as an indicator of active replication and thus of infectious virus. Specific RT-PCR assays were developed to detect sgRNAs in addition to the diagnostic detection of genomic SARS-CoV-2 RNA, but such assays have not made their way into routine diagnostic use owing to their lower sensitivity than conventional RT-PCR assays.

[...]

Thus, although the absence of sgRNA would indicate absence of viral replication, the presence of sgRNA does not necessarily indicate infectiousness“

Generell müssen für die Feststellung einer aktiven Infektion und der Beurteilung, ob eine Person ansteckende Viren „produziert“ und abgibt, neben der klinischen Symptombeurteilung weitere und zwar konkrete diagnostische Methoden wie die Isolation von vermehrungsfähigen Viren eingesetzt werden (Goldstandard). Hierzu findet sich unter der Überschrift „Detection of infectious Virus“ in der unter Punkt 2.1.G aufgeführten Publikation folgende zutreffende Aussage:

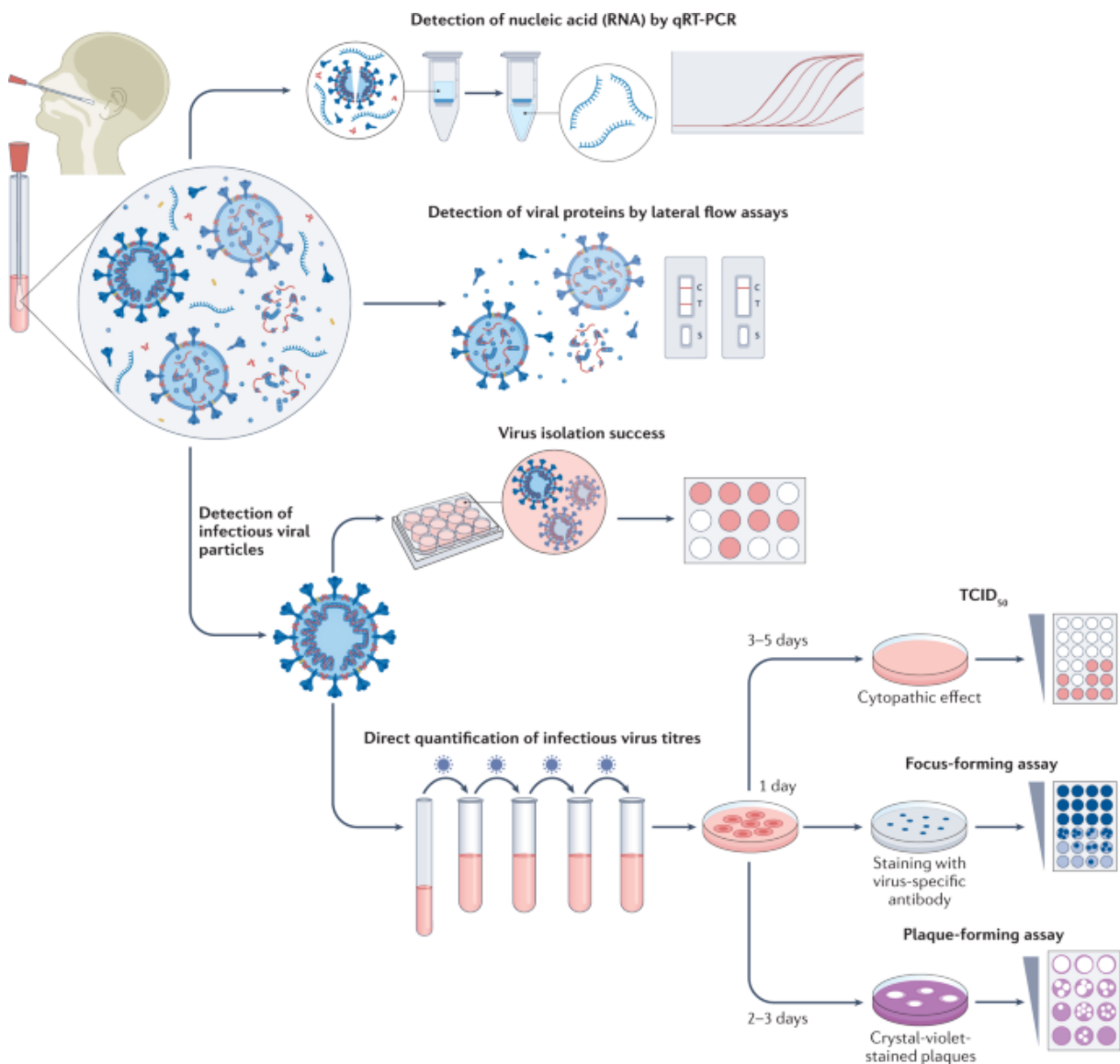
„Der Goldstandard für den Nachweis infektiöser (d. h. replikationsfähiger) Viren in Atemwegsproben ist die Gewinnung von Viren in Zellkulturen, ein Verfahren, das gemeinhin als Virusisolierung bezeichnet wird“

Im Original:

“The gold standard for determining the presence of infectious (that is, replication competent) virus in respiratory specimens is the recovery of virus in cell culture, a procedure that is commonly termed virus isolation“

2.2. Abbildung

Aus dieser Arbeit (<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>) sei hier zur besseren Übersicht die Abbildung 1 übernommen, in welcher die verschiedenen Nachweismethoden optisch dargestellt sind: der Nachweise der viralen Nukleinsäure (RNA) mittels RT-qPCR (hier qRT-PCR genannt), der Nachweise viraler Eiweißbestandteile mittels Antigen-Schnelltest (lateral-flow assay) und der Nachweis infektiöser Viren mittels verschiedener Isolationsmethoden in Zellkultur.



Abbildungslegende:

Zum Nachweis der SARS-CoV-2-Viruslast werden Abstrichproben aus dem Nasen-Rachen-Raum oder dem Oropharynx verwendet. Der Nachweis viraler Nukleinsäuren (RNA) erfolgt durch quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR). Die virale RNA wird aus lysiertem Virus extrahiert, revers transkribiert und mittels qPCR unter Verwendung von Primern, die für eine oder mehrere Zielregionen im viralen Genom spezifisch sind, amplifiziert. Der Amplifikationszyklus, bei dem die Proben den Schwellenwert überschreiten (Zykluschwelle), bestimmt die Menge der viralen RNA. Die RNA-Viruslast kann als Anzahl der viralen RNA-Kopien pro Milliliter oder durch den willkürlichen testspezifischen Zykluswellenwert ausgedrückt werden. Lateral Flow Assays weisen das Vorhandensein spezifischer viraler Proteine in den lysierten

Viruspartikeln nach. Das SARS-CoV-2-Nukleokapsid wird in den meisten Antigen-detektierenden (Schnell-)Diagnostiktests verwendet. **Das Vorhandensein infektiöser (replikationsfähiger) Viren in respiratorischen Proben kann nur durch die Wiedergewinnung von Viren in Zellkulturen durch Isolierung oder durch Quantifizierung infektiöser Virustiter unter Verwendung der 50%igen infektiösen Gewebekulturdosis (TCID50), fokusbildender Tests oder plaquebildender Tests festgestellt werden.** Die Virusisolierung erfolgt durch Auftragen von infektiösem Medium auf die Monoschicht von Zellen; der Erfolg der Isolierung wird durch das Auftreten eines zytopathischen Effekts etwa 3-5 Tage nach der Infektion bestimmt. Die weiße Farbe zeigt das Vorhandensein eines zytopathischen Effekts in den Zellen an. Zur Quantifizierung des infektiösen Virustiters werden serielle Verdünnungen von Respirationsproben durchgeführt und zur Inokulation auf der Monolage von Zellen verwendet. In TCID50, 3-5 Tage nach der Infektion, wird der vireninduzierte zytopathische Effekt klassischerweise mit Hilfe der Mikroskopie bestimmt. Bei fokusbildenden Tests werden die Zellen 1 Tag nach der Infektion fixiert und eine Immunfärbung mit virusspezifischen Antikörpern durchgeführt, um Gruppen von infizierten Zellen (Foci) zu erkennen. Die Foci, die auf das Vorhandensein infektiöser Viren hinweisen, sind blau dargestellt. Bei der Plaquebildung werden die Platten 2-3 Tage nach der Infektion fixiert und mit Kristallviolett angefärbt; Vertiefungen mit einzelnen Plaques werden zur Bestimmung des Virustiters verwendet. Die Plaques, die das Vorhandensein infektiöser Viren anzeigen, sind weiß dargestellt.

3. Einflussfaktoren auf die Zuverlässigkeit des PCR-Test

Tatsächlich aber hängen die Ergebnisse eines PCR-Tests von einer Reihe von Parametern ab, die zu erheblichen Unsicherheiten bedingen und zum anderen so beeinflusst werden können, dass viele oder wenige (scheinbar) positive Ergebnisse erzielt werden.

3.1. Design der PCR und Spezifität

Eine PCR kann mithilfe von Datenbanken (z.B. Genbank, GISAID) und etablierter Software (sogenannte Primersuchprogramme) sehr komfortabel designt werden. Hierbei entscheidet die Zielsetzung (was soll wie genau nachgewiesen werden) über die Anforderungen an die eingesetzte Zielregion und die Passgenauigkeit der Primer.

Soll eine grobe Suche nach Vertretern einer großen Gruppe ähnlicher Viren (z.B. alle Coronaviren) angestrebt werden, werden die Primer in sogenannte konservierte gruppenspezifische Regionen gelegt. Dies ist ähnlich, wie wenn man einer Software sagen würde: Erkenne zuverlässig alle roten Autos auf einem Parkplatz (aber keine LKW, Motorräder und auch keine anderen Farben). Hiermit kann in einer Probe gesucht werden, ob überhaupt Genspuren von einem Vertreter der gesuchten Virusgruppe (z.B. Coronaviren) vorhanden sind.

Möchte man nur eine Subgruppe finden (z.B. Sarbecoviren innerhalb der Coronaviren), entsprechend einer Automarke innerhalb der Gruppe aller roten Autos (im Beispiel), dann können die Primer subgruppenspezifisch designt werden. Dies wurde im Fall der WHO empfohlenen PCR aus der Charité beim sogenannten „E-Gen“, aber auch beim RdRp-von Corman/Drosten zur Gruppe der Sarbeco-Viren, zu denen SARS-CoV-2 gehört, angewendet.

Es ist aber (nicht immer, aber oft) auch möglich, eine hochspezifische PCR zu entwerfen, mit der NUR das speziell gesuchte Gen (hier Virusgen von SARS-CoV-2) entdeckt und vervielfältigt wird. Analog dazu wäre im Beispiel das Erkennen eines speziellen Modells innerhalb der Gruppe der roten Autos einer Marke. Hierzu muss das Design beinhalten, dass die Region, die verwendet wird, keinerlei Homologien zu nahe verwandten Viren (z. B. SARS1 oder

Fledermausviren zu SARS-CoV-2) oder auch irgendeiner anderen schon bekannten Gensignatur (menschliches Genom, andere Organismen) hat.

Die Suchprogramme können dies sehr zuverlässig ermöglichen. Bei der qPCR kommt dann noch ein drittes Genstück dazu, welches spezifisch nur mit der gesuchten Genregion reagieren darf, das ist die „Probe“.

Insofern: ein gutes PCR-Design umfasst für die normale PCR zwei und für die qPCR drei hochspezifische, nur die gewünschten Zielsequenzen erkennende Primer/Sonden und kann dann in der Tat hochspezifisch nur das gewünschte Zielgen erfassen.

Auch für SARS-CoV-2 wäre solch ein spezifisches PCR-Design möglich gewesen, wurde aber in den ursprünglichen und maßgeblichen WHO-Protokollen unterlassen.

Nach dem Design **müssen dann zwingend das Primerpaar und die Sonde an realen Proben im Labor überprüft werden.** Hierzu werden sichere Proben mit dem zu identifizierenden Genmaterial (hier: Proben von sicher SARS-CoV-2 infizierten Personen oder sogar ein komplett charakterisiertes Virusisolat) benötigt, ferner ein breites Spektrum von Viren und anderen Erregern, welche prinzipiell ähnliche Symptome in Patienten auslösen können und die kein Signal mit der eingesetzten PCR ergeben dürfen.

Wenn alle diese Bedingungen erfüllt sind: Die PCR findet genau das vom Designer angestrebte Zielgen - entweder wie beabsichtigt einer Gruppe oder eben hochspezifisch eines einzelnen Erregers - und ist dieses zweifelsfrei mit umfassenden positiv- und negativ-Kontrollen im Labor experimentell nachgewiesen, dann kann dieses Design als Protokoll zur Unterstützung einer klinischen Diagnose auch zuverlässig als spezifisch verwendet werden.

3.2. Anzahl der unabhängigen Ziel-Gene („Targets“)

In dem ursprünglich von der WHO am 13.01.2020 publizierten Protokoll **„Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time PCR“** (<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf>) wird die Abfolge von PCR-Nachweisen von drei unabhängigen Teilgenen des später in SARS-CoV-2 umbenannten Virus beschrieben. Die Reihenfolge bezog sich auf das E-Gen, das RdRp-Gen und dann das N-Gen. Bereits am 17.01.2020 folgte eine Änderung durch die WHO mit dem Protokoll **„Diagnostic detection of 2019-nCoV by real time PCR“** (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2) in der das N-Gen als Nachweis entfernt wurde und somit statt der ursprünglichen 3 Zielregionen nur noch zwei Genabschnitte empfohlen wurden. Am 02.03.2020 wurde in einem erneut aktualisierten Testprotokoll der WHO **„Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases“** (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331329/WHO-COVID-19-laboratory->

[2020.4-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](#)) darauf hingewiesen, dass ".... In Gebieten, in denen das COVID-19-Virus weit verbreitet ist, könnte ein einfacherer Algorithmus angewandt werden, bei dem z. B. ein Screening durch RT-PCR **eines einzigen Unterscheidungstargets** als ausreichend angesehen wird.... Im Original: „.... In areas where COVID-19 virus is widely spread a simpler algorithm might be adopted in which for example screening by RT-PCR of a single discriminatory target is considered sufficient...." (Seite 3 unten) woraufhin die Labors großflächig dazu übergangen, nur noch 1 Zielgen zu analysieren, **und sich nur noch auf das gruppenspezifische E-Gen als gültige PCR spezialisierten**, wie z.B. explizit vom Labor Augsburg am 03.04. beschrieben (nur noch im Internetarchiv verfügbar: <https://www.oder-spreepiraten.de/wp-content/uploads/2020/05/Ge%C3%A4ndertes-Befundlayout-der-SARS-CoV2-PCR-Ergebnisse--Labor-Augsburg-MVZ-GmbH.pdf>)

Die herausragende Bedeutung der Anzahl der mittels PCR analysierten unabhängigen Zielgene bei unspezifischen Einzeltests, wie in dem bevorzugt von der WHO empfohlenen Protokoll der Charité (und über TIB MolBiol/Roche weltweit sehr schnell flächendeckend eingesetzt), ergibt sich aus folgender exemplarischer Rechnung:

Die im WHO-Protokoll ursprünglich für den Nachweis von SARS-CoV-2 angegebenen drei Zielregionen E, RdRp und N-Gen wurden zügig in vielen laboreigenen und kommerziellen Testsystemen eingesetzt. Ein erster Ringversuch vom Institut Instant e.V. (<https://corona-ausschuss.de/wp-content/uploads/2020/07/Instand-Ringversuch-Virusgenom-Nachweis-SARS-CoV-2.pdf>) ergab für diese Gene eine mittlere Spezifität von:

Zielgen des SARS-CoV-2 Genoms	Anzahl überprüfte Testkits	Spezifität nur Zellkultur (ohne Virus-RNA)	Spezifität mit verwandtem Coronavirus (HCoV 229E)	%	Mittlere Spezifität absolut	Mittlere Fehlerrate (1-abs. Spez.)
E-Gen	24	99,46%	95,17%	97,31	0,9731	0,0269
RdRp-Gen	13	97,80%	90,66 %	94,23	0,9423	0,0577
N-Gen	21	98,20%	87,95 %	93,08	0,9308	0,0692

In einer Mischpopulation von 100.000 Tests würde sich selbst bei keiner echt infizierten Person aufgrund der mittleren Fehlerrate ergeben:

Bei einem reinen E-Genetest: $100.000 \times 0,0269 =$ **2690** falsch positive
 Bei E und RdRp-Test in Folge: $100.000 \times (0,0269 \times 0,0577) =$ **155** falsch positive
 Bei allen drei Genen (E, RdRp, N): $100.000 \times (0,0269 \times 0,0577 \times 0,0692) =$ **10** falsch positive

Dies bedeutet, die Vorgabe der WHO im März 2020, also vor der offiziellen Pandemieausrufung, sukzessive die Anzahl der zu testenden Zielgene bei gleichzeitiger Beibehaltung der ursprünglichen PCR-Vorgaben („Corman/Drosten-Protokoll“) von SARS-CoV-2 von 3 auf 1 zu reduzieren, resultierte in einer Zunahme der falsch positiv getesteten Personen im obigen Rechenbeispiel von 10 bei 3 Genen auf fast 2700 bei nur noch dem E-Gen je 100.000 durchgeführter Tests.

Würden die 100.000 durchgeführten Tests repräsentativ bei 100.000 Bürgern einer Stadt/Landkreis innerhalb von 7 Tagen durchgeführt sein, so ergibt sich alleine aus dieser Fragestellung der verwendeten Zielgene hinsichtlich der „7-Tagesinzidenz“ ein Unterschied von 10 (3 „Targets“) gegenüber 155 (2 „Targets“) gegenüber 2690 (1 „Target“) und davon abhängig die Schwere der ergriffenen Freiheitsbeschränkungen der Bürger.

Zwischenbewertung: Das Rechenbeispiel zeigt, wie durch „Spielen an den Vorgaben“ bezüglich der nachzuweisenden Zielgene für die Labore die täglichen Fallzahlen beeinflusst werden können. Angesichts der immensen Auswirkungen auf die politischen Entscheidungen, welche von den Absolutzahlen positiver Tests und der daraus abgeleiteten „7-Tages-Inzidenz“ bestimmt werden, ist die Vorgabe der WHO (und auch des RKI) zur Reduktion der Zielgene klar dazu geeignet gewesen, die „Pandemie“ durch falsche Testvorgaben künstlich um den Faktor bis zu 300 aufzublähen.

Dies ist eine evidenzfreie Vorgehensweise, die zum einen enorme persönliche Einschränkungen der Quarantäne/Isolation, welche die fälschlich „positiv getesteten“ Personen erleiden müssen, nach sich zieht, zum anderen über die „7-Tage Inzidenzzahl“ die enormen gesellschaftlichen und wirtschaftlichen Einschränkungen und Schäden willentlich in Kauf nimmt und letztendlich auch die Basis für die „Impfnotwendigkeit“ bildet.

Wäre konsequent die korrekte Anzahl von drei bzw. sogar besser (wie z.B. in Thailand ursprünglich eingesetzt) bis zu 6 Genen für die PCR Analyse verwendet worden, hätte sich die Rate der positiven Tests und damit die „7-Tagesinzidenz“ fast komplett auf null reduziert.

3.3. Anzahl der durchgeführten Zyklen (CT-Wert) bei der qPCR

„Infektiöse Personen haben in der Regel eine RNA-Viruslast von $>10^6$ Genomkopien pro Milliliter, was in den meisten RT-PCR-Tests einem Ct-Wert von 25 entspricht.“

Diese Definition eines sinnvollen CT-Werts wird explizit in der bereits unter 2.1.G zitierten Übersichtsarbeit, welche am 02.12.2022 in Nature Reviews Microbiology (<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>) erschienen ist, im Kapitel „SARS-CoV-2 Diagnostics in public health“ getroffen und fasst somit die im folgenden dargelegten Aspekte sinnvoll zusammen.

Im Original:

“Infectious individuals typically have RNA viral loads of $>10^6$ genome copies per millilitre, which corresponds largely with a Ct of 25 in most RT-PCR assays”

3.3.1 Bedeutung des CT-Wertes

Neben der Anzahl der nachgewiesenen Ziel-Gene, insbesondere bei nur einem oder maximal zwei Genen, stellen unabhängig vom Design der PCR die Anzahl der Zyklen der Amplifikation in der qPCR bis zur Wertung „positiv“ und der daraus resultierende CT-Wert eine entscheidende Stellschraube dar. **Je kleiner der CT-Wert einer Probe in einer qPCR, desto höher war die Ausgangsmenge der DNA in der Probe.**

Dies korreliert unter standardisierten Bedingungen mit (im Falle von Viren) der Ausgangsmenge an viralen Genomen, der sog. **viral load**, welche im Idealfall als „Anzahl viraler Kopien“ pro ml Probe angegeben werden sollte. Diese viral load korreliert auch im Fall von SARS-CoV-2 mit der Anzuchtbarkeit infektiöser Viren in Zellkultur, wie bereits im März 2020 publiziert wurde. (Abbildung 1e in Wölfel et al., <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>) **Hier war eine Mindestmenge von 10^6 RNA-Kopien/ml nötig, um aus der Probe entsprechende Viren anzüchten zu können**, in einer weiteren Arbeit unter Mitbeteiligung von C. Drosten aus dem Mai 2021 waren sogar im Schnitt 10^8 Viren in der Probe für eine positive Zellkultur notwendig (supplemental Figure S4 von <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34035154/>).

In letzterer Arbeit ergab sich auch, dass keiner der 25.381 getesteten Personen im Falle einer ermittelten Viruslast unter 10^5 virale Genome je ml in der Probe aufwies (Tabelle S1), wohingegen die RT-qPCR aus dem Ursprungsprotokoll (Corman V et al., <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>) bereits bei ca. 4 Kopien je Probenansatz (5µl entsprechend ca. 10^3 Kopien/ml) ein positives Ergebnis liefern kann, also bereits um den Faktor 1.000-10.000 eher als in einer Probe mit tatsächlich infektiöser Viruslast.

Auch **kommerzielle PCR-Testsysteme**, sogenannte Kits, von denen es weltweit (Stand Mai 2022) bereits ca. 630 verschiedene gibt (<https://www.finddx.org/covid-19/test-directory>) weisen teilweise Nachweisgrenzen von weniger als 10 Kopien/Reaktion aus, wie z.B. Kits der Firma TIB-MolBiol (https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_53-0777_96_Wuhan-R-gene_V200204_09155376001%20%282%29.pdf) - Punkt 5 „Specification“. Ein Beispiel der Differenz zwischen Nachweisfähigkeit und einer sinnvollen Nachweisgrenze ist im Beispiel **ANNEX 3** gegeben.

Es ist hier fachlich zu unterscheiden zwischen einer „Kontamination“* des Rachenraums mit einzelnen wenigen, aber keine Infektion auslösenden Viren und einer echten „Infektion“. Letztere geht mit vermehrungsfähigen Viren einher, die dann a) zu einer symptomatischen Erkrankung und b) einer Infektiosität, d.h. der Fähigkeit, andere Personen anzustecken,

führen. Anmerkung: *zum Begriff: „Wir haben gelernt, dass es anders als mit Bakterien keine Normalbesiedlung mit Coronaviren auf der Schleimhaut gibt.“ (K. Henning im Podcast 58 mit C. Drosten)

Diesen **Aspekt der Kontamination versus echter Infektion** hat Christian Drosten bereits 2014 in einem Interview in der Wirtschaftswoche im Zusammenhang mit MERS beschrieben (<https://www.wiwo.de/technologie/forschung/virologe-drosten-im-gespraech-2014-die-who-kann-nur-empfehlungen-aussprechen/9903228-2.html>): „Ja, aber die Methode (Anmerkung: gemeint ist die PCR) ist so empfindlich, dass sie ein einzelnes Erbmolekül dieses Virus nachweisen kann. Wenn ein solcher Erreger zum Beispiel bei einer Krankenschwester mal eben einen Tag lang über die Nasenschleimhaut huscht (Anmerkung: das wäre die o.g. „Kontamination“), ohne dass sie erkrankt oder sonst irgend etwas davon bemerkt, dann ist sie plötzlich ein Mers-Fall. Wo zuvor Todkranke gemeldet wurden, sind nun plötzlich milde Fälle und Menschen, die eigentlich kerngesund sind, in der Meldestatistik enthalten.“ [...] „Denn was zunächst interessiert, sind die echten Fälle (Anmerkung: Das sind die „Infizierten“). **Ob symptomlose oder mild infizierte Krankenhausmitarbeiter wirklich Virusträger sind, halte ich für fraglich. Noch fraglicher ist, ob sie das Virus an andere weitergeben können.**“

Letzteres ist eine entscheidende Aussage auch in Bezug auf die sehr nahe mit MERS verwandten SARS-CoV-2 Viren.

Aber exakt dieser Punkt der Virusweitergabe (und damit des Treibens der Pandemie) ist die Begründung für die ergriffenen Maßnahmen wie Quarantäne/Isolationsanordnungen, die „Lockdowns“ und die sogenannten AHA-Regeln.

3.3.2 Belege für die Relevanz des CT-Wertes

3.3.2.1. Kanadische Studie

Eine **kanadische Studie** von Jared Bullard/Guillaume Poliquin in Clinical Infectious Diseases 2020, nachzulesen unter dem Link (<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa638>) kam bereits im Mai 2020 zu dem Ergebnis, dass oberhalb eines CT-Wertes von 24 kein reproduktionsfähiges Virus mehr gefunden wurde – dies bedeutet: Der Versuch, aus Abstrichproben, die erst bei einem höheren CT-Wert zu einem positiven Test führten, anschließend vermehrungsfähige Viren anzuzüchten, scheiterte. Oberhalb eines CT-Wertes von 24 ist laut dieser Studie die Menge nachweisbaren viralen Erbguts also so gering, dass sich der positive Test jedenfalls nicht mehr im Sinne einer aktiven Infektion interpretieren ließ.

3.3.2.2. Studie aus Frankreich

Eine große **Studie von Jaffar** et al. (Doi [10.1093/cid/ciaa1491](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491)) setzte die Grenze zur Anzuchtbarkeit von SARS-CoV-2 aus Patientenprobenmaterial bei einem CT-Wert von 30 .

3.3.2.3. Studie des amerikanischen CDC

In einer Studie zum Vergleich Antigentest/RT-qPCR und **Virusanzucht aus dem CDC** (<https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciab303/6224406>) wurde eine erfolgreiche Virusanzucht für einen CT-Bereich von 17,4-28,8) beschrieben, wobei nur bei einem CT bis maximal 25 alle Proben von symptomatischen Personen stammten und mit einer erfolgreichen Virusanzucht einhergingen und nur 18,2%, wenn der CT zwischen 25 und 29 lag. Im Original: „Virus was isolated from specimens with Ct values ranging from 17.4-29.8; virus was isolated from all specimens with a Ct value <25 and from 18.5% (5/27) of specimens with a Ct value ≥25. (Seite 9 mittig). Unabhängig von dieser Überprüfung mithilfe der Virusanzucht galten hier jedoch alle Proben, welche in zwei Target-Sequenzen aus dem „N-Gen“ mit einem Ct bis 40 positiv wurden als „echt positiv“

3.3.2.4. Empfehlungen C. Drosten im NDR Podcast

In seinem **NDR-Podcast vom 16.02.2021 benannte C. Drosten** explizit, dass eine Erhöhung des CT von 25-27 über die Grenze von 28 hinweg bedeutet, dass Personen von denen diese Abstriche mit dem höheren CT gewonnen wurden, nicht mehr infektiös sind. „und auch hier ist wieder eine Ct-Wertverschiebung von 25 auf 27 ungefähr, 27, 28 zu sehen. Und das ist ein Bereich, da ist nach unserer Einschätzung wirklich die Infektiosität zu Ende. Wenn man so eine Patientenprobe sieht und man würde fragen, ist der Patient noch infektiös, da würde ich sagen: **Nein, das ist jetzt langsam nicht mehr ein infektiöser Bereich. Das kann man korrelieren**“ Seite 4 (rechte Spalte oben in: <https://www.ndr.de/nachrichten/info/coronaskript270.pdf>)

Mit diesen CT-Angaben bezieht sich C. Drosten vermutlich hauptsächlich auf eine Studie zur Impfeffektivität in Israel, welche mittels RT-qPCR überprüft wurde.

Auf diese Studie mit dem Titel „Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine“ (<https://www.nature.com/articles/s41591-021-01316-7>) wird auch in einem Schreiben vom RKI (AZ: ID3176 vom 31.03.2021) an das Bundesministerium für Gesundheit hingewiesen. In dieser Studie wird anhand von PCR-Tests nach einer Impfung (mit BNT162b2) aufgezeigt, dass bei geimpften Probanden, welche ab Tag 12 nach der ersten Impfung in der PCR für SARS-CoV-2 positiv wurden, der CT für die drei getesteten Gene (E, N, RdRp mittels des Seegene Allplex Testkits, welcher laut Instant Ringversuch 340 eine Spezifität von 96-98,4% aufweist) von einem **mittleren CT von 25 auf einen mittleren CT von 27 ansteigt**.

Im Vergleich mit einer ebenfalls SARS-CoV-2 PCR positiven ungeimpften Kohorte **wird in dieser Studie ein Impferfolg anhand einer CT-Abnahme von 1,64-2,33 festgemacht und der**

„Erfolg“ ist damit praktisch nicht messbar, weil laut PCR die Personen mit BNT162b2 noch immer eindeutig „positiv“ für SARS-CoV-2 sind!!!

Im Original: „Finally, applied on all infections (post-vaccination and unvaccinated, $n=5,794$), a multivariate linear regression model accounting for age, sex and vaccination quantify **Ct regression coefficients ranging from 1.64 (N gene) to 2.33 (RdRp) for vaccination after 12 days or longer prior to infection sampling**”, was rechnerisch mit einer 4-fachen Reduzierung der Viruslast in Geimpften versus Ungeimpften gleichgesetzt wird. Im Original: „As a difference of 1 Ct unit is equivalent to a factor of about 1.94 in viral particles per sample, these Ct differences represent a viral load ratio ranging from 2.96 to 4.68.“

Bemerkenswert bei den PCR Analysen ist hier ebenfalls, dass auch in dieser Arbeit die CT-Werte bis 40 analysiert und gewertet wurden (Extended Data Figure 4 dieser Publikation)

3.3.2.5. Empfehlungen CDC

Auch das **CDC** geht entsprechend in einer Empfehlung vom 16.04.2021 auf den CT bei der SARS-CoV-2 PCR dahingehend ein, dass dieser einen Wert von maximal 28 haben sollte, um PCR Produkte von „Impfdurchbrüchen“ (also RT-qPCR positiven Personen nach kompletter Impfung) zur Sequenzierung ins Labor zu senden (<https://www.cdc.gov/vaccines/covid-19/downloads/Information-for-laboratories-COVID-vaccine-breakthrough-case-investigation.pdf>)

3.3.2.6. Studie aus Südkorea

Eine **Studie aus Südkorea** erwähnt einen CT von ≤ 25 als Obergrenze der klinisch relevant „positiven“ und zieht diesen Wert zum Vergleich mit der Güte von Antigentests heran. Originalzitat: „ [...] based on a **clinically significant Ct value of ≤ 25** (...)“ (S. 3 in <https://jkms.org/DOIx.php?id=10.3346/jkms.2021.36.e101>)

3.3.2.7. Artikel der New York Times

Einhellige wissenschaftliche Meinung u.a. auch von Dr. Fauci vom US CDC, aber auch einer Reihe von in der **New York Times im August 2020** zitierten Wissenschaftlern, (<https://www.nytimes.com/2020/08/29/health/coronavirus-testing.html>) ist, **dass alle „positiven“-Resultate, die erst ab einem Zyklus von 35 erkannt werden, keinerlei wissenschaftliche (d.h.: keine evidenzbasierte) Grundlage haben.** Der mit Hilfe der WHO weltweit propagierte RT-qPCR Test zum Nachweis von SARS-CoV-2 hingegen war (und ihm folgend auch alle anderen auf ihm als Blaupause basierenden Tests) auf 45 Zyklen eingestellt, ohne einen CT-Wert für „positiv“ zu definieren.

3.3.2.8. Nationales CDC Singapur

Ebenfalls bereits im Mai 2020 wurde vom **National Center for Infectious Diseases in Singapur** ein Positionspapier herausgegeben

(<https://www.ncid.sg/Documents/Period%20of%20Infectivity%20Position%20Statementv2.pdf>), welches darauf hinweist, dass

1. Es wichtig ist, dass der Nachweis viraler RNA durch die PCR weder einer Infektiosität, noch einem vermehrungsfähigem Virus entspricht („*it is important to note that viral RNA detection by PCR does not equate to infectiousness or viable virus*“)
2. Der Grenzwert (cycle threshold value CT) der PCR weist als **Surrogatmarker** für den Gehalt an viraler RNA bereits ab einem **CT von 30** zwar noch virale RNA nach, nicht mehr jedoch die Anwesenheit von vermehrungsfähigen Viren und die betroffenen Personen sind nicht infektiös.

Originaltextauszug:

*“6. A surrogate marker of ‘viral load’ with PCR is the cycle threshold value (Ct). A low Ct value indicates a high viral RNA amount, and vice versa. As noted above, **detection of viral RNA does not necessarily mean the presence of infectious or viable virus**. In a local study from a multicenter cohort of 73 COVID-19 patients, when the Ct value was 30 or higher (i.e. when viral load is low), no viable virus (based on being able to culture the virus) has been found.”*

3.3.2.9. RKI Homepage

Auch das **RKI erklärt auf seiner Homepage** bereits zum Stand 11.08.2020

(https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html#doc13490982bodyText4) *“Erste Ergebnisse aus der Diagnostik am RKI zeigen, dass der Verlust der Anzüchtbarkeit in Zellkultur mit einer per real-time PCR (Anmerkung: ist die RT-qPCR) ermittelten RNA Menge von <250 Kopien/5 µL RNA einherging. Diese RNA-Konzentration entsprach im verwendeten Testsystem einem Ct-Wert >30.”*

3.3.2.9. Weitere Studie aus Südkorea mit Besprechung aus der Schweiz

Eine **Studie aus Südkorea** (<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2027040>) legt die Grenze zur Virusanzüchtbarkeit auf einen CT-Wert von 28,4. Diese Studie wird unter dem Titel „Infektiosität und PCR-Positivität – Nicht das Gleiche“ am 28.01.2021 ([Infektiosität und PCR-Positivität - Nicht das Gleiche - infekt.ch](https://www.infekt.ch)) fundiert vom ehemaligen Chefarzt für Infektiologie des Kantonsspitals St. Gallen, Prof. em. Dr. med. Pietro Verjazza besprochen. Prof. Verjazza weist auf die Abbildung der Studie hin, in der auch für symptomatische aber Zellkultur-negative Patienten ein positives PCR Ergebnis erzielt wurde, allerdings mit CT-Werten größer als 28. Zu beachten ist auch, dass sogar bei einem CT von 22-28 schon Personen gefunden

wurden, welche keine positive Zellkultur und damit keine wirklich vermehrungsfähigen Viren aufwiesen.

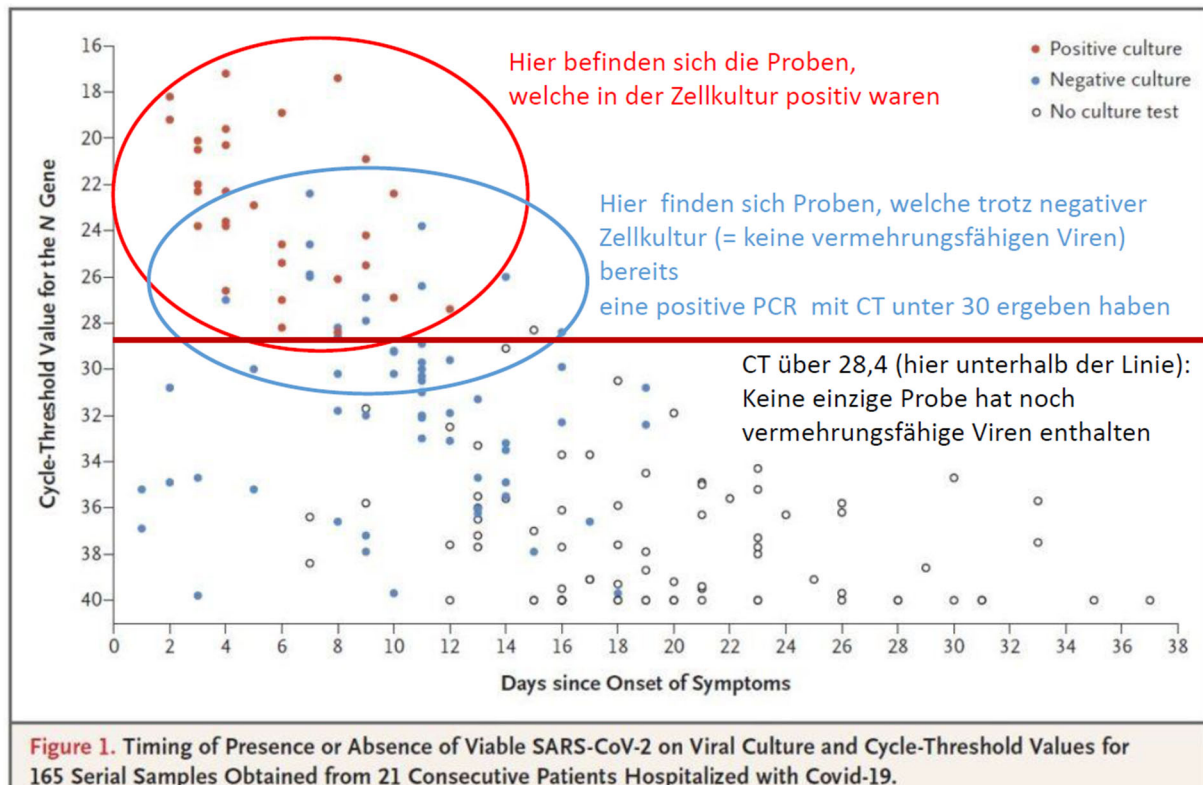


Abbildung aus der Südkoreanischen Studie (DOI: 10.1056/NEJMc2027040) mit eigenen Ergänzungen. Hier ist sehr schön der Zusammenhang positive Zellkultur als Maß für das Vorhandensein vermehrungsfähiger Viren und CT-Wert zu erkennen

3.3.2.10. Studie aus Frankfurt

Und in einer **Studie aus Frankfurt** (<https://www.mdpi.com/2077-0383/10/2/328>) zeigte sich, dass von 64 RT-qPCR positiven Patientenproben (ein Gen getestet) nur aus 33 (=52%) eine Virusanzucht in Zellkultur gelang. Diese infektiösen Proben wurden bereits bis zu einem mittleren CT-Wert von 26 positiv (Ergänzende Abbildung 1) wohingegen aus den Proben mit einem höheren CT keine Virusanzucht mehr gelang.

3.3.2.11. Englisches Office of national statistics (ONS)

Der Grenzwert CT 25 wurde bereits im Dezember 2020 vom englischen „**Office of national statistics**“ (ONS) eingeführt, hier mit CT über 25 als negativ bewertet. Tabellenblatt 2 (Data) im verlinkten Excel-Datenblatt (link unten). Ergebnisse: „Die Analyse zeigt: - Personen mit einer höheren Konzentration an viralen Erbmateriale (positive Fälle mit niedrigen Ct-Werten; unter 25) sind eher in einem Haushalt infektiös als solche mit niedrigeren Konzentrationen (positive Fälle mit hohen Ct-Werten; über 25)“.

Im Original: „*The analysis shows: - People with a higher concentration of viral genetic material (positive cases with low Ct values; below 25) are more likely to be infectious in a household than those with lower concentrations (positive cases with high Ct values; above 25).*“ (<https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/conditionsanddiseases/adhocs/12683coronaviruscovid19infectionsurveycyclethresholdandhouseholdtransmissionanalysis>).

3.3.2.12. Kohortenstudie aus Münster

Mit Bezug auf diesen ONS-Grenzwert folgerten die Autoren einer großen **Kohorten Studie aus Münster** im Sommer 2021 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8166461/>), in der mittels RT-qPCR der Gene ORF-1ab und E in Abstrichproben von 162.457 Personen untersucht wurden: „**RT-PCR-Test-Positivität sollte nicht als genaues Maß für die infektiöse SARS-CoV-2-Inzidenz angesehen werden**“ Im Original: „*RT-PCR test positivity should not be taken as an accurate measure of infectious SARS-CoV-2 incidence*“

In dieser Studie zeigte sich, dass insgesamt 2,6% der untersuchten Proben ein positives RT-qPCR Ergebnis hatten. Der CT-Grenzwert, über dem die Proben als sicher negativ gewertet wurden, war sehr hoch mit 40 angesetzt. Die Proben wurden auch nach der Anzahl der Proben analysiert, welche bis zu einem Grenzwert von 25 positiv wurden (immer jeweils beide Gene, persönliche Information auf Rückfrage bei A. Spelsberg, einer Mitautorin).

Die Ergebnisse zeigten, dass bei **asymptomatischen** Personen insgesamt nur 0,4% (68 von 16.874 Personen) einen positiven RT-qPCR Test mit einem mittleren CT von fast 29 aufwiesen. Hiervon hatten nur 27% (= 18 Personen) einen CT bis 25, welcher von den Autoren als „*Hinweis für eine Wahrscheinlichkeit, dass die Person infektiös ist*“ (im Original: „*indicating a likelihood of the person being infectious*“) gewertet wurde. Umgerechnet bedeutet dies, dass bei nur 18 von 16874 (=0,1%) asymptomatischen (gesunden) Personen die PCR auf eine mögliche Infektiosität bezüglich SARS-CoV-2 hingewiesen hat.

Auch von 6212 **symptomatischen** Personen aus den Spitzenzeiten der beiden ersten „Corona-Wellen“ hatten nur 403 Personen (=6,5%) eine positive RT-qPCR auf SARS-CoV-2 mit einem mittleren CT von 27.8 (1.Welle) und 26.6 (2. Welle). Von diesen Positiven hatten maximal (in der 2.Welle) 40% (= 145/367) und in der ersten Welle sogar nur 26,5% (=10/36) Personen einen CT von bis 25 und konnten damit als wahrscheinlich infektiös eingestuft werden. **Umgerechnet ließ sich folglich bei nur 155 von 6212 symptomatischen (kranken)Personen (=2,5%) von einer möglichen Infektiosität mit SARS-CoV-2 ausgehen.**

3.3.2.13. Infektionskontrollstudie aus England

In einer Covid-19 **Infektionskontrollstudie aus England** (<https://elifesciences.org/articles/64683>) analysierten die Autoren die Ergebnisse von SARS-CoV-2 PCR Testungen (3 Gene, kommerzieller Test von Thermo Fisher) in 3,3 mio Fällen.

Insgesamt fanden sich 0.83% Test positive Abstriche mit einem mittleren CT Wert von 29,2, wobei es ausreichte, wenn ein Gen der drei getesteten Zielgene, das N-Gen, alleine positiv war und auch ohne definierte CT Grenze. Hier zählten als „geringe Evidenz“ für eine Infektion diejenigen Personen, die keine Symptome aufwiesen und nur ein Gen mit einem CT von 34 oder höher aufwiesen, wohingegen die „sehr wahrscheinlichen“ Fälle bei Vorliegen von Symptomen und zwei oder drei positiven Zielgenen gewertet wurden.

Interessanterweise korrelierte ein niedriger CT (24,9) mit einer späteren Antikörpernachweisbarkeit im Serum (als Indiz für eine echte Infektion), wohingegen Testergebnisse mit hohem CT-Werten (über 33) meist ohne Antikörperreaktion in den betroffenen Personen einhergingen und damit auf eine fehlende echte Infektion hinwiesen.

3.3.2.14. Vergleich kommerzieller PCR-Kits auf internationaler Seite

Im **Vergleich kommerzieller PCR-Testkits** ([http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag tab.](http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag_tab.)) zeigt sich die enorme Bandbreite der CT-Werte selbst bei hochstandardisierten Proben zwischen den verschiedenen Testkits und auch bezüglich der unterschiedlichen Zielgene. Auch die Ergebnisse der verschiedenen Ringversuche von Instand e.V. wären sehr spannend, sind aber weitgehend nicht öffentlich einsehbar und werden auch auf Anfrage nach Informationsfreiheitsgesetz unter Verschluss gehalten (<https://fragdenstaat.de/anfrage/herausgabe-der-auswertung-des-ringversuchs-der-gruppe-340-termin-4-2020/#nachricht-533736>) So schwankt hier bei einem übermittelten PDF der Versuchsreihe von Juni/Juli 2020 z.B. der CT für die gleiche definierte verdünnten Probe von SARS-CoV-2 (Probennummer 340061) für die WHO-empfohlenen Gene zwischen 15-40 (E-Gen), 20-40,7 (N-Gen) und 19,5-42,8 (RdRp-Gen). Dies zeigt eindrucksvoll einen extremen Mangel an Teststandardisierung innerhalb der beteiligten (und zertifizierten) Labors.

3.3.2.15. Evaluierung standardisierter WHO-Kontrollen

Bei der **Evaluation zweier standardisierter WHO-Kontrollen** für die RT-qPCR durch mehrere Labors und verschiedener RT-qPCR Ansätze, (Bentley E, WHO/BS/2020.2402 abrufbar: <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2402>) zeigte sich für die Kontrollprobe 20/138 (eine synthetische Virenprobe mit der Wuhan1-Sequenz, in der Abbildung schwarze Linie), dass eine Genommenge von $10^{6,73}$ (Korrelation zu potentiell infektiöser Viruslast) im Schnitt bei einem CT von 23-24, eine Genommenge von $10^{5,73}$ (unterhalb der potentiell infektiösen Viruslast) bei einem CT von 25,5 - 26,5 als positiv gewertet wurde, so dass mit diesem Ansatz die potentiell infektiöse Viruslast von 10^6 viralen Genomen in einem Bereich von CT23-26,5 liegen würde.

Für ein inaktiviertes SARS-CoV-2 (Probe 20/146, rote Linie in der Abbildung) mit definierter Virusmenge von $10^{7,7}$ in der Stocklösung zeigte sich ein positiver RNA Nachweis bereits bei einem CT von unter 20, bei $10^{6,7}$ lag der CT bei 22-23 und bei $10^{5,7}$ lag der CT bei 25,5 - 26, so

dass auch bei einer definierten Probe mit den SARS-CoV-2 Viren ein Äquivalent zu einer infektiösen Dosis bereits bei einem Ct von 22 bis 26 detektiert wird.

Im Folgenden die maßgebliche **Abbildung** aus der Publikation (Bentley E, WHO/BS/2020.2402) Seite 63. Die standardisierten RNA-Ausgangsmengen sind für die Probe 20/138 unter Punkt 3 (Unitage) auf S. 66 mit 6.73 log₁₀ IU/ml angegeben und für die Probe 20/146 auf Seite 64 unter Punkt 3 mit 7,7 log₁₀ IU/ml

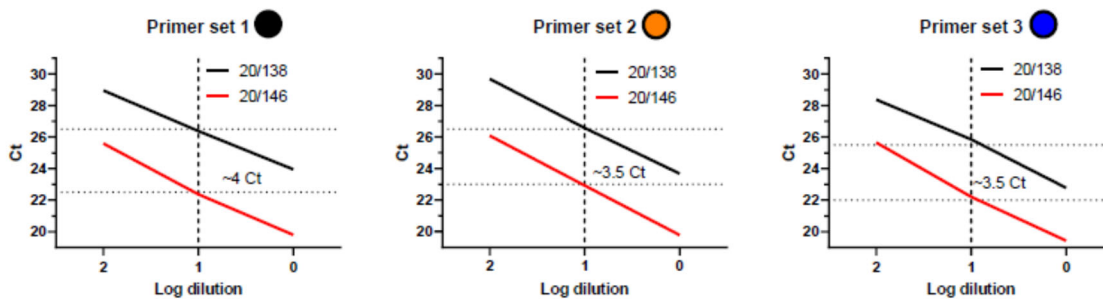


Figure 2. Relative potency of 20/138 compared to 20/146 by Real-time RT-PCR quantification using three primer sets. There is an approximate 0.5 Ct shift between the standard curves using primer set 1 which targets the region of lower coverage, in comparison to primer sets targeting the junction (primer set 2) and region of higher coverage (primer set 3).

3.4. Vortestwahrscheinlichkeit

3.4.1. Erklärt von Correctiv

Die Faktenchecker von Correctiv nahmen sich bereits zum 18. Juni 2020 der Problematik der Vortestwahrscheinlichkeit an ([Corona-PCR-Test und Vortestwahrscheinlichkeit: So kann es zu falschen Ergebnissen kommen - correctiv.org](#)) und zitieren die ursprünglich auf der RKI Seite stehende Warnung: *„Von einer Testung von asymptomatischen Personen wird aufgrund der unklaren Aussagekraft eines negativen Ergebnisses sowie der Möglichkeit falsch positiver Befunde in Abhängigkeit von der Prävalenz/ Inzidenz in der Regel abgeraten.“* Diese Warnung wurde am 02.06. 2020 gestrichen und durch einen Hinweis auf die Vortestwahrscheinlichkeit ersetzt wurde („*Generell wird die Richtigkeit des Ergebnisses von diagnostischen Tests auch von der Verbreitung einer Erkrankung beeinflusst. Je seltener die Erkrankung und je ungezielter getestet wird, umso höher sind die Anforderungen an Sensitivität und Spezifität der zur Anwendung kommenden Tests.*“)

In einer im Correctiv Artikel verlinkten interaktiven Seite des British Medical Journals (noch am 10.01.2024 aktiv) kann man die Test Parameter eingeben und damit die Wahrscheinlichkeit von falsch und richtig bewertete Testergebnissen in Abhängigkeit von

der Vortestwahrscheinlichkeit und den Parametern Sensitivität und Spezifität ausrechnen lassen. ([Covid-19 test calculator | The BMJ](#))

Nimmt man hierzu exemplarisch die (ebenfalls im Korrektiv-Artikel verlinkten) Dokumente des ersten INSTANT e.V. Ringversuchs zur RT-qPCR zum Nachweis von SARS-CoV-2 Genomen (Test 340, siehe auch Punkt 3.6.2.) und setzt den meistverwendeten (und ursprünglich von der WHO empfohlenen) TIB Molbiol E-Gentest ein. Für diesen läßt sich aus den Ergebnissen von Seite 28 des Instant Versuches eine Spezifität von 97,1% errechnen und die Tabelle auf Seite 32 weist eine Sensitivität von 97,06 % aus.

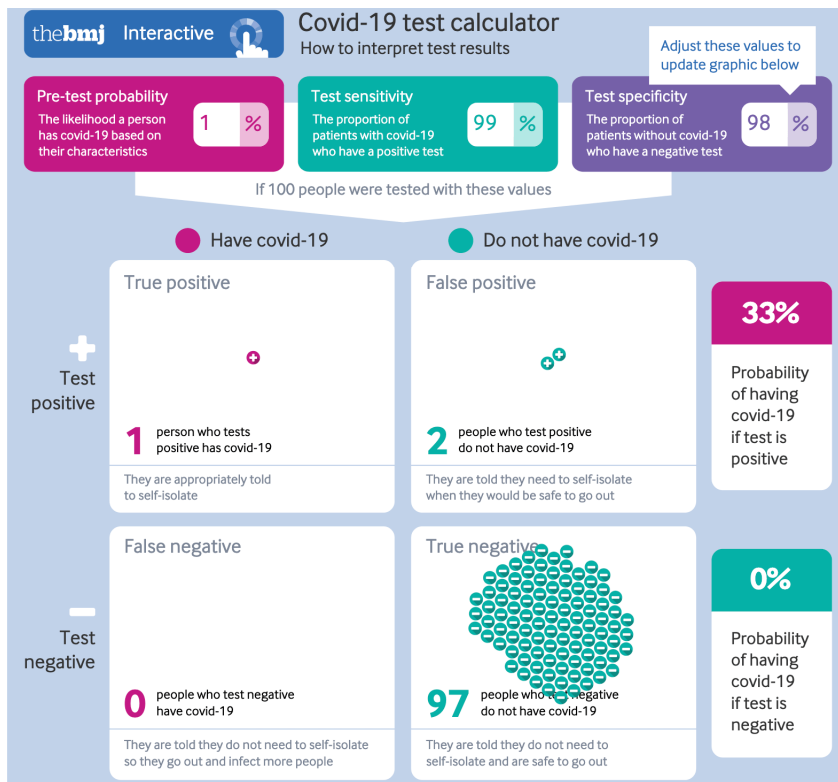
Mit diesen Werten ergibt sich exemplarisch

Setzt man 10 von 100 Personen als echt Infiziert voraus („Pre-Test Probability“=10%), dann ergibt sich, dass für alle 10 korrekt der gesuchte Genabschnitt erkannt wird („true positiv“), aber auch noch 3 Personen einen falsch positiven PCR Test („False positive“) bekommen. Dies würde auf die „Inzidenz“ (Anzahl positiv getesteter Personen unter 10.000) hochgerechnet bedeuten, dass aus einer Inzidenz von 1000 dann 1300 würde. Dies hätte kaum einen Einfluss auf mögliche Maßnahmen.

Für den, bei anlasslosen Massentestungen eher anzunehmenden Fall, dass maximal 1 von 100 Personen echt Genome von SARS-CoV-2 in sich trägt (entspricht einer Inzidenz von 100, da 100 von 10.000 echt positiv), finden sich der eine 1 echt positive Fall aber ebenfalls 3 falsch positive Fälle. Dies würde bedeuten, dass die „Inzidenz“ nicht wie real mit 100 sondern, aufgrund der falsch positiven Ergebnisse, mit 400 resultieren würde. Mit entsprechenden Auswirkungen auf die verordneten Maßnahmen.

Correctiv hat mit einem genaueren Test kalkulieren lassen, bei dem dann 2 von 3 positiven Tests falsch wären, setzt man den Fall der niedrigen Inzidenz an.

Siehe nachfolgende Abbildung: Testkalkulator aus der Webpage des British Medical Journal



3.4.2. Vom RKI anhand der Antigen-Schnelltests erklärt (Annex 7)

In einer Infographik erläutert **das RKI** unter der Überschrift „Corona-Schnelltest-Ergebnisse verstehen“

(https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Infografik_Antigentest_PDF.pdf?__blob=publicationFile) anschaulich, wie die Wahrscheinlichkeit dass ein Testergebnis stimmt, von der sogenannte **Vortestwahrscheinlichkeit** abhängt, d.h. von der wirklichen Anzahl echt infizierter Personen in der getesteten Population.

Dieser Aspekt der Vortestwahrscheinlichkeit gilt sowohl für die Antigen-Schnelltests als auch gleichermaßen für die RT-qPCR-Tests.

Das vom RKI vorgestellte Rechenbeispiel für die Interpretation der Antigen-Schnelltests setzt ein realistisches Szenario ausgehend von einer Sensitivität (Empfindlichkeit) der Antigentests von 80% und einer Spezifität (Zuverlässigkeit) von 98% voraus, wobei auch hier (https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html) ausdrücklich erwähnt wird: „Zu beachten sind hierbei die erheblichen Leistungsunterschiede der unterschiedlichen kommerziell erhältlichen Tests (Verweis auf: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.01.20203836v1>).“

Sind angenommen 5 Personen von 10.000 Getesteten wirklich mit SARS-CoV-2 infiziert, zeigen sich dennoch im gewählten Rechenbeispiel **200 falsch positive Tests** und 4 richtig positive

Tests. Das bedeutet, dass 1 echt infizierter je 10.000 Personen übersehen würde, **aber 200 ein falsch positives Ergebnis bekommen** und daher in Quarantäne/Isolation müssen. Dies würde im Falle einer Schultestung mit z.B. 1000 Schülern bedeuten, dass 20 ein falsches „Du bist Corona-Positiv“ mitgeteilt bekommen, und die Schule erst einmal als „Ausbruchsort“ gesperrt würde, bis dann die Nachtestung evtl. Entwarnung gibt. Solche Fälle sind bereits in der Presse berichtet worden.

In den *„Hinweisen zur Bewertung der Ergebnisse aus AG-Testen“* (Anmerkung: Antigen-Schnelltests) auf der Seite des RKI wird die **Problematik der falsch positiven Antigentests** thematisiert: *„Ein positives Testergebnis mittels AG-Test löst den Verdacht auf eine übertragungsrelevante Infektion mit dem SARS-CoV-2 aus und bedarf zur Vermeidung falsch-positiver Befunde einer Nachtestung mittels PCR. In Anbetracht der potenziell erheblichen Konsequenzen inkorrekt ergebener Ergebnisse bestehen nicht nur an die Sensitivität von Antigentests hohe Anforderungen, sondern auch an die Spezifität. So wäre bei niedriger Prävalenz/Vortestwahrscheinlichkeit und geringer Testspezifität mit einer hohen Zahl falsch-positiver Ergebnisse und einer entsprechenden zusätzlichen Belastung des ÖGD durch Auferlegung und ggf. Rücknahme von Maßnahmen zu rechnen.“*
[„https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html)

3.4.3. Publikation zum Vortestproblem der PCR

Auch die Zuverlässigkeit der PCR Ergebnisse ist neben den technischen Problemen wie Design und Durchführung von der Vortestwahrscheinlichkeit abhängig, wie im 3.5.1 im BMJ Rechner aufgezeigt und wie 2022 in einem Aufsatz der Biostatistikerin Prof. Christel Weiß aus Mannheim anschaulich publiziert wurde (Notfall Rettungsmed 2022; 25:48-50 [PCR-Tests und Schnelltests – Wie zuverlässig sind sie? | SpringerLink](#)). Hier wurde bei einer angenommenen Empfindlichkeit (Sensitivität) von 99% und Zuverlässigkeit (Spezifität) eines PCR Tests von 99,5% aufgezeigt, dass bei hohen Prävalenz von 20%, z.B. in einer Hochrisikogruppe eines Pflegeheims zu erwarten ist, dass von 10.000 Tests 2020 ein positives Ergebnis liefern, wovon allerdings 40 falsch positiv zu erwarten sind. Bei einer niedrigen Prävalenz (wie z.B. in der Massentestung einer gesunden Population wie Jugendlichen) von 1% betont die Autorin, dass Vorsicht angebracht ist: denn *„Ein Drittel aller positiven Befunde ist nämlich falsch“*. Die Aussage beruht auf der in Tabelle 1 der Publikation aufgezeigten Berechnung, dass bei der gewählten Beispielgruppe von Jugendlichen von 100 echt Infizierten aus einer Gruppe von 10.000 Getesteten mit 99 „echt positiven“ aber eben auch 49,5 „falsch positiven“ Ergebnissen gerechnet werden muß. Auch in dieser Publikation wird in der Zusammenfassung hervorgehoben: *„Ferner ist zu beachten: Eine nachgewiesene Infektion mittels eines PCR-Tests bedeutet nicht zwangsläufig, dass die betreffende Person ansteckend oder erkrankt ist“*

3.5. Zwischenbewertung:

Vor diesem Hintergrund der o. aufgeführten Punkte A-P ist es befremdlich, wenn die RT-qPCR nach wie vor vom RKI als „Gold-Standard“ angesehen wird, ohne die exakten Validierungen und externen Zertifizierungsbedingungen und Zielwerte des CT zu definieren (und ohne dass diese von den Behörden offensichtlich vollumfänglich überwacht werden).

Generell kann eine RT-qPCR schon aufgrund der methodischen Vorgänge keine intakten, vermehrungsfähigen (infektiösen) Viren nachweisen, nicht einmal das komplette intakte Virusgenom, sondern ausschließlich Nukleinsäure des gesuchten Abschnitts. Es ist generell möglich, bei gut eingestellten und korrekt durchgeführten PCR-Tests, **durch Validierung mit einer parallel durchgeführten Virusanzucht in Zellkultur** einen Grenzwert (CT) zu definieren, ab dem ein positives PCR-Signal nicht mehr mit vermehrungsfähigen Viren korreliert. Diese ist in der Überwachung von Blutprodukten seit Jahren gut geübte Routine.

Diese stringente Validierung erlaubt dann - solange das Testsystem NICHT verändert wird - als Surrogatmarker eine Abschätzung der Viruslast und damit der möglichen Infektiosität der getesteten Probe, nie allerdings jedoch den definitiven Nachweis. Sobald eine Komponente am PCR-Testsystem (seien es Chemikalien, Plastikwaren, Enzyme, Protokollabläufe oder Maschinen) in einem der angewendeten Schritte verändert wird, muss zwingend das System wieder neu kalibriert werden.

Aus allen bisher publizierten Informationen (siehe oben) kann geschlossen werden, dass jeder CT-Wert über 35 nicht mehr mit einer Anzuchtbarkeit infektiöser Viren einhergeht und damit der absolute Grenzwert für die Entscheidung „positiv“ ist, auch unabhängig vom verwendeten Testsystem. Der CT-Bereich 25-35 ist testabhängig möglicherweise noch valide als Surrogatmarker für „positiv im Sinne einer potentiell für eine Infektiosität ausreichenden Viruslast“ zu bewerten, wenn er, wie beschrieben, durch adäquate Validierung im durchführenden Labor mit einer Virusanzucht verglichen wurde.

CT ≤ 25 : positiver Genomnachweis, hohe mRNA Last in der Probe
CT 26-35 : nur positiv, wenn mit Virusanzucht abgeglichen
CT > 35 : negativ

Die strenge Bewertung des CT-Wertes spielt vor allem eine Rolle, wenn nur ein Genabschnitt in der PCR getestet wird, gilt aber generell für jedes einzelne Target.

3.6. Adäquate Kontrollen

Um die **Sensitivität** und **Spezifität** einer RT-qPCR korrekt einschätzen zu können, müssen bei jedem Reaktionsdurchlauf adäquate Proben mitgeführt werden. Dies beginnt bei der Teststelle mit „Leerabstrichen“, um Kontaminationen am Probengewinnungsort sicher auszuschließen, geht weiter über Extraktionskontrollen, um die korrekte Isolation vermehrbare RNA mit allen anschließenden Bearbeitungsschritten sicherzustellen, d.h. eine künstlich hergestellte definierte RNA oder - zu bevorzugen - inaktivierte Virusisolate definierter Konzentration, welche in allen Arbeitsschritten der Probenaufbereitung bis hin zur PCR mitgeführt und bearbeitet wird und für die dann mithilfe passender Primer auch die PCR durchgeführt wird. Hiermit kann ausgeschlossen werden, dass im Rahmen der Probenbearbeitung hemmende Substanzen oder Fehler die Amplifikation von RNA verhindern.

Solche definierten Kontrollen stehen seit Dezember 2020 über die WHO (siehe Punkt 3.3.2P, Quelle: <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2402>) und sogar seit November 2020 über Instant e.V. zur Verfügung.

Aus dem Begleitheft zum Versand der definierten Bezugsproben (https://www.instand-ev.de/fileadmin/uploads/user_upload/Dokumente/Virologie/20210118g_Begleitheft_-_quantitative_Bezugsproben_1_und_2_-_SARS-CoV-2.pdf) lassen sich generell folgende Aspekte erkennen:

- Es wurde als Kontrolle der Stamm BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 als hitzeinaktivierte Probe mit kontrollierter Virenzahl eingesetzt, die 10^6 und 10^7 RNA-Kopien/ml entsprachen, da hier die Schwelle zur Einschätzung der Patienten als „wahrscheinlich kontagiös“ angesetzt wurde (in: 2.2. Verwendungszweck). Dieser Stamm wurde laut Datenbank (<https://www.european-virus-archive.com/virus/human-2019-ncov-isolate>) am 28.01.2020 in München gewonnen und wird über die Charité verkauft.
- Abhängig von den getesteten Genen und dem ausführenden Labor zeigte sich eine große Bandbreite der CT-Werte trotz definierter Probe in Referenzlabors. Dieser CT Wert schwankte z.B. für das E-Gen für die Probe mit 10^6 Kopien/ml zwischen 21,9 (Labor 4) und 28,7 (Labor 1); für das RdRp-Gen zwischen 24,8 (Labor 4) und 33,0 (Labor 1). Über alle Tests aus rückmeldenden Labors ergab sich für diese Probe eine Streuung der CT-Werte von 12-38 (Abbildung 2) und für die höher konzentrierte Probe eine Streuung der CT-Werte von 10-36. Allein dieses Beispiel zeigt, dass jedes Labor immer in jeder Testserie die definierten Proben mitführen muß, um den laboreigenen CT-Wert auf die Viruslast umrechnen zu können, die die eigentliche Bezugsprobe zur Beurteilung der getesteten Patientenprobe darstellen sollte.

Die extreme Schwankungsbreite der CT-Werte in den verschiedenen Testsystemen thematisiert C. Drosten in seinem NDR-Podcast 94 vom 22.06.2021

<https://www.ndr.de/nachrichten/info/coronaskript306.pdf>) wie folgt: „Und zwar die Ct-Werte, die wir hier haben, die sind zwischen den einzelnen Testherstellern nicht so ohne Weiteres vergleichbar.“...“ Aber nur so lange, wie wir uns in demselben Testsystem bewegen, können wir die zahlenmäßig vergleichen. Die Unterschiede sind da zum Teil erheblich. Es gibt Testhersteller, bei denen ist ein Wert von sagen wir mal 25 überhaupt nichts Besorgniserregendes, während derselbe Wert von 25 in dem Test eines anderen Herstellers zeigt, dass das schon ernsthaft eine infektiöse Konzentration ist. **Das liegt einfach daran, dass diese Testhersteller nicht auf den Ct-Wert standardisieren.**“ (Seite 17) Weiter beklagt er, dass diese Standardisierung mit (von ihm) hergestellten Kalibrationen nicht stattfindet (S.18): „Was aber im Moment noch nicht passiert ist, dass flächendeckend auf dieser jetzt geschaffenen technischen Laborbasis auch Empfehlungen von den Landesgesundheitsämtern oder auch vom Robert Koch-Institut für bestimmte Anwendungsbereiche ausgesprochen und angewendet werden.“ Bedeutet: seit Herbst 2020 wären geeignete Kontrollen zur Viruslastbestimmung vorhanden und müssten von den Behörden für die Labors zur Validierung der Testergebnisse eingefordert werden, was aber offensichtlich (laut C. Drosten) nicht geschieht. „Wir können das eben sogar so, dass dieses inhärente Problem der Nichtvergleichbarkeit der Ct-Werte schon gelöst ist. Wohlgermerkt im Herbst. Die Technik und die Labortestung ist hier nicht der Haken, sondern es ist wieder mal die Umsetzung und die Regulation.“

3.6.1. Bereitstellung adäquater Kontrollen:

Ferner muss in jeder korrekten Testserie eine Reihe von externen (d.h. parallel wie bei Patientenproben) Negativkontrollen sowie eine Positivkontrolle mitgeführt werden, die im Idealfall aus einem inaktivierten definierten SARS-CoV-2 Virusstamm besteht. Dies wäre eine ureigene Aufgabe des RKI (unter Mithilfe anderer, geeigneter öffentlicher Einrichtungen, wie dem Bernhard Nocht-Institut oder dem Friedrich-Löffler Institut), in den dort vorhandenen Labormöglichkeiten (der Sicherheitsstufe 4) eine ausreichende Anzahl der SARS-CoV-2 Viren aus Patientenproben zu isolieren, daraus definierte Stämme als Kontrollen zu kultivieren, diese zu inaktivieren und in definierten Viruszahlen über die lokalen Aufsichtsbehörden als Kontrollen an die testenden Labors abzugeben. Nachdem diese wichtige Dienstleistung jedoch selbst nach drei Jahren der „Pandemie“ nach wie vor nicht routinemäßig angeboten wird, besteht die Positivkontrolle meist nur aus einer synthetischen RNA, welche lediglich die Zielgene des Testsystems kodiert. Über diese Positivkontrolle kann auch die untere Nachweisgrenze der PCR bestimmt werden. Diese wird von einigen kommerziellen Kits mit 20 oder weniger viralen Genomen je Probe angegeben und weist damit (siehe Punkt 1.3.2.) bereits eine Virusmenge im Abstrich nach, welche um den Faktor 10^5 unter der infektiösen Dosis liegt und damit keinerlei diagnostischen/prognostischen Wert hat. Eine Übersicht über die aktuell eingesetzten kommerziellen Kits mit ihren Leistungsdaten findet sich unter http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag_tab.

3.6.2. Ringversuche: Auffälligkeiten beim ersten Ansatz

Zu den korrekt durchgeführten Kontrollen gehört auch die Teilnahme der Test durchführenden Labors an sogenannten „Ringversuchen“. Bei diesen wird von einem externen Anbieter ein anonymisiertes Panel an Testproben zur Verfügung gestellt. Diese enthalten im Falle des Virusnachweises negative Proben und Proben mit nahe verwandten Viren (inaktiviert) zur Überprüfung der Spezifität (diese Proben dürfen kein positives Signal ergeben) und Positivproben mit verschiedenen Verdünnungen des gesuchten Virus (inaktiviert), um die Sensitivität (ab welcher Virenanzahl wird die PCR positiv, mit welchem CT-Wert) zu ermitteln.

Versuch von Instant e.V.

Im Fall von SARS-CoV-2 erfolgte der erste Ringversuch „Virusgenom-Nachweis - SARS-CoV-2 (340)“ durch den Verein „INSTANT e.V.“ bereit im April 2020. An diesem Ringversuch nahmen laut Bericht 488 Labors teil, von denen 463 Ergebnisse zurückmeldeten. Die Ergebnisse können im publizierten Kommentar (Zeichhardt M: *Kommentar zum Extra Ringversuch Gruppe 340 Virusgenom-Nachweis SARS-CoV-2*“, verfügbar unter: <https://corona-ausschuss.de/wp-content/uploads/2020/07/Instand-Ringversuch-Virusgenom-Nachweis-SARS-CoV-2.pdf>)

nachgelesen werden und zeigen zwei Abweichungen von dem üblichen Ringversuchsprozedere, welche bereits hier auf Laborprobleme mit der RT-qPCR zum Nachweis von SARS-CoV-2 hinwiesen: So heißt es auf Seite 4 der Publikation: *„Wichtige Mitteilung zur Auswertung: Nur 4 der 7 Proben, die in diesem Extra-Ringversuch untersucht wurden, werden für die Erlangung eines Zertifikats über die erfolgreiche Teilnahme berücksichtigt“*. In der Fußnote auf Seite 10 des Kommentars heißt es: *„In der Zwischenauswertung vom 17. April 2020 wurden allen Teilnehmern des Extra INSTANT Ringversuchs (340) Virusgenom-Nachweis von SARS-CoV-2 April 2020 die Probeneigenschaften der Proben 340059, 340060 und 340064 vorzeitig mitgeteilt. Die Ergebnisse dieser 3 Proben bleiben für die Erteilung eines Zertifikats unberücksichtigt [...]“* Der Grund für diesen Ausschluss bestimmter Proben wird auf Seite 4 des Kommentars dargelegt: *„Während der Extra-Ringversuch noch lief, erhielt INSTANT e.V. aus dem In- und Ausland dringliche Anfragen, noch vor Ende der verlängerten Abgabefrist, also vor dem 28. April 2020, die Eigenschaften der zu untersuchenden Proben aufzudecken, damit Laboratorien bei etwaigen Fehlmessungen ihre Testmethode kurzfristig verbessern können.“* (Seite 4 oben im Bericht von INSTANT e.V.)

Dieses Vorgehen ist sehr ungewöhnlich für einen echten Ringversuch und stellt damit kein unabhängiges externes Überprüfungsverfahren der beteiligten Labore mehr dar.

Trotz der schon aufgedeckten Proben und des reduzierten Testumfangs kam es bei einer Vielzahl von Laboren zu Verwechslungen von Proben – so heißt es auf Seite 18 des Kommentars: *„Bei Probe 340064 (SARS-CoV-2 positiv 1:100 000 verdünnt) beruht die reduzierte Erfolgsquote von nur 93,2 % im Wesentlichen auf falschen Ergebniszuordnungen (**Verwechslungen**) bei Probe 340064 und Probe 340065 (negativ für SARS-CoV-2 und positiv*

für HCoV 229E). Die Verwechslungen bei den Proben 340064 und 340065 betreffen 24 Labore mit insgesamt 59 Ergebnissen je Probe. Siehe dazu auch Abschnitt 2.4.2.1. [...]“. Eine Vielzahl von Laboren hat also fälschlich die Probe 340064 (leicht verdünntes SARS-CoV-2) mit der Probe 340065 (negativ für SARS-CoV-2 und positiv für das naheverwandte Virus HCoV 229E) verwechselt.

Abgesehen von der erschreckenden Tatsache, dass offensichtlich selbst unter hoch standardisierten Abläufen in einem Ringversuch eine erhebliche Anzahl von Proben vertauscht wurden (was die Frage nach der entsprechenden Quote an Probenvertauschungen und damit falsch zugeordneten Abstrichproben unter Massentestbedingungen aufwirft), fällt auf, dass alle gemeldeten Verwechslungen nur diese beiden Proben betrafen, nicht jedoch die ebenfalls bewerteten Proben mit der Endziffer 61 (sehr hoch verdünntes SARS-CoV-2) und 62 (negativ). Die detaillierten Ergebnisse eines zweiten Ringversuchs aus Juni/Juli 2020 (<https://www.instand-ev.de/System/rv-files/Zusammenfassung%20der%20Probeneigenschaften%20und%20Sollwerte%20Virologie%20340%20Juni%20Juli%202020%2020200911a.pdf>) sind nach wie vor nicht öffentlich detailliert einsehbar, eine Anfrage ans RKI via „Frag den Staat“ wurde nicht beantwortet ([Herausgabe der Auswertung des Ringversuchs der Gruppe 340 Termin 4 2020 - FragDenStaat](#)).

3.7. Ausschluss von Kontaminationen von Reagenzien und „Problemen im Handlungsablauf“

3.7.1 Kontamination innerhalb des Labors durch Fehler in der Durchführung

Das beste PCR-Design kann dennoch zu falsch positiven Ergebnissen führen, wenn entweder die zugrundeliegenden Reagenzien / Kits mit positiven Proben kontaminiert sind, oder, sehr viel wahrscheinlicher, **Kontaminationen im Laborablauf** entstehen. Da die PCR eine extrem empfindliche Methode ist (exponentieller Reaktionsverlauf), die wenige Moleküle einer DNA nachweisen kann, ist in der klinischen Diagnostik die Laborkontamination durch PCR Endprodukte ein Hauptproblem (beschrieben z.B. bereits 2004 in Aslanuadeh J et al., <http://www.annclinlabsci.org/content/34/4/389.full.pdf+html>: „Eine typische PCR erzeugt bis zu 10^9 Kopien der Zielsequenz, und wenn sie verwirbelt wird, enthält selbst das kleinste Aerosoltröpfchen bis zu 10^6 Amplifikationsprodukte [6]. Unkontrolliert können in relativ kurzer Zeit durch die Bildung von Aerosolen mit Amplifikationsprodukten Laborreagenzien, Geräte und Belüftungssysteme kontaminiert werden [6].)

Im Original: „A typical PCR generates as many as 10^9 copies of target sequence and if aerosolized, even the smallest aerosol will contain as many as 10^6 amplification products [6].

If uncontrolled, within a relatively short time the buildup of aerosolized amplification products will contaminate laboratory reagents, equipment, and ventilation systems [6].)

Diese extreme Kontaminationsgefahr setzt voraus, dass in den diagnostischen Laboren, welche mit der PCR arbeiten, höchste Sorgfalt bei der Testung waltet - sehr fachkundiges Personal, kontaminationssichere Umgebung, permanente unabhängige Kontrolle.

Bereits im oben schon erwähnten Ringversuch 340 im April tauchte ein Problem mit falsch positiven Ergebnissen auf, welches wie folgt kommentiert wurde (Seite 20 unten): „*Zusätzlich weisen in einigen Fällen die Untersuchungen mit den SARS-CoV-2-negativen Kontrollproben 340060, 340062 und 340065 auf Spezifitätsprobleme hin, die unabhängig von Vertauschungen der Proben 340064 und 340065 sind. Es ist abzuklären, ob diese **falsch positiven Ergebnisse** auf ein **Spezifitätsproblem der angewendeten Teste oder auf eine Verschleppung von SARS-CoV-2 bei der Testdurchführung bzw. auf Verwechslungen mit anderen Proben** in diesem Ringversuch in den betreffenden Laboren zurückzuführen sind.*“ (Seite 21 unten in <https://www.instand-ev.de/System/rv-files/340%20DE%20SARS-CoV-2%20Genom%20April%202020%2020200502j.pdf>). Zur Verwechslung in diesem Ringversuch siehe Details weiter oben unter „Ringversuche“.

Wenn man vor diesem Hintergrund ferner sieht, wie z.B. nach einem BBC-Bericht in großen Testlaboren in England offen und extrem kontaminationsanfällig mit ungeschultem Personal gearbeitet wird (Film aktuell nicht mehr offen zugänglich <https://www.youtube.com/watch?v=Uk1VK1reNtE>), verwundert es nicht, wenn sich auch in Deutschland (wo es solche Beiträge bisher nicht gefilmt gibt) gelegentlich Meldungen über „falsch positive Fälle“ durch Laborkontaminationen in den Medien finden (Z.B. MVZ Augsburg - Link am Ende des Abschnitts).

Selbst unter kontrollierten Laborbedingungen sind Kontaminationen durch die Arbeitsschritte der PCR bei so einer hochempfindlichen Methode nicht sicher auszuschließen. So wurde auf die Problematik von falsch positiven PCR-Ergebnissen in der SARS-CoV-2 Diagnostik aufgrund von Laborabläufen und **bereits in der ersten Publikation** der RT-qPCR (Corman et al., DOI: [10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045)) hingewiesen: „*In four individual test reactions, weak initial reactivity was seen but they were negative upon retesting with the same assay*“ [.....] „*.... **most probably to handling issues**....*“

Ebenfalls ein Problem mit Kontaminationen, die zu falsch positiven Ergebnissen im Zusammenhang mit Genomen von SARS-CoV-2 bei einer von der Charité geleiteten Studie (unter anderem mit den Autoren Drosten und Landt aus der oben aufgeführten Arbeit Corman et al, welche die erste PCR für die WHO schon mit Kontaminationen beschreiben hat) geführt haben, zwang die Autoren sogar eine Science-Publikation zurückzuziehen. Begründung u.a.

„Wir fanden eine **Mischung aus verschiedenen SARS-CoV-2 Genom Fragmenten die einige der Proben kontaminiert haben...**“ Im Original: „We found a mixture of different SARS-CoV-2 genomic fragments contaminating some of the samples“. ANNEX 5

Selbst die „Goldstandard-Labors“ der Charité um Herrn Drosten haben also deutliche Probleme mit der Kontamination durch Genomfragmente von SARS-CoV-2 offen eingestanden und publiziert, welche zu falsch positiven Ergebnissen in der diagnostischen PCR als auch der Genom (Varianten-) Analyse führen können.

3.7.2. Kontamination der Materialien/Reagenzien ab Hersteller

Selbst wenn der Handlungsablauf im Labor optimal und extrem überwacht funktioniert, um laborbedingte Kontaminationen stark zu minimieren, kann hier eine unerwartete Quelle für falsch positive Ergebnisse in der **Kontamination der eingesetzten Materialien/Chemikalien ab Hersteller entstehen**. So können bereits die zur Probenentnahme verwendeten Abstrich Materialien ab Werk kontaminiert sein - wie z.B. beim Falle des „Phantoms von Heilbronn“, in welchem die Wattestäbchen zur Abnahme der DNA-Spuren an den Tatorten mit der DNA einer Verpackungskraft des Herstellerwerkes verunreinigt waren und so jahrelang die Forensik mit falschen Spuren behinderte (<https://www.faz.net/aktuell/gesellschaft/kriminaltaet/dna-ermittlungspanne-das-phantom-von-heilbronn-ist-widerlegt-1925411.html>).

Auch im Falle der SARS-CoV-2 Diagnostik wurde bereits im Juni 2020 ein Kontaminationsproblem aufgrund ab Werk mit Positivkontrollen versetzter PCR Primer publiziert (Wernike et al., DOI: [10.1111/tbed.13684](https://doi.org/10.1111/tbed.13684)). Hier war aufgefallen, dass selbst reine Wasserproben mit mehreren unabhängigen Primerchargen einen eindeutig positiven SARS-CoV-2 Nachweis in der RT-qPCR ergaben: „Es gab jedoch auch Primer/Sonden-Sets, die sehr geringe Verunreinigungen aufwiesen, die erst bei der gründlichen internen Validierung entdeckt wurden.“ „ im Original: „However, there were also primers/probe sets that displayed very **low-level contaminations**, which were detected only during thorough internal validation.“

Auch einige in der Tagespresse im Sommer 2020 berichteten falsch-positiven Ergebnisse der SARS-CoV-2 RT-qPCR Testung wurden Materialproblemen zugeordnet (z.B. <http://web.archive.org/web/20210111010037/https://www.br.de/nachrichten/bayern/probleme-in-augsburger-labor-bringen-falsche-testergebnisse,SEh5Qq4>)

3.7.3. Zwischenbewertung:

Selbst bei idealem RT-qPCR-Design und guter Laborpraxis mit adäquater Validierung können Probleme im täglichen Handlungsablauf sowie von außen über bereits ab Werk kontaminierte Proben die Ergebnisqualität der RT-qPCR wesentlich beeinflussen und zu falsch positiven Ergebnissen führen.

3.8. Kommerzielle PCR Testkits

Bereits sehr früh wurden kommerzielle PCR-Testsysteme, die „PCR-Kits“, in den Routinelabors zur Diagnostik eingesetzt, obwohl ein Großteil davon nur für „RUO“ („research use only“) deklariert war.

Besonders herauszustellen ist hierbei der erste und daher prägnanteste Testhersteller, die Berliner Fa. TIB Molbiol, deren Firmeninhaber (Olfert Landt) bereits auf den WHO-Protokollempfehlungen neben Christian Drosten als Autor aufgeführt war. Die Kits, welche entsprechend auf den WHO-Empfehlungen beruhen, werden über die Fa. Roche auf deren Großautomaten „Cobas“ eingesetzt und dürften daher neben weiteren Anbietern (siehe <https://www.vdgh.de/covid-19/sars-cov-2-und-die-industrie/hersteller/artikel16741> Liste der Testhersteller) nach wie vor den Großteil der zur Routinediagnostik eingesetzten Kits in Deutschland ausmachen. Interessanterweise geben viele Testhersteller hier auch das „E-Gen“ als Hauptnachweisziel an und bleiben damit eng an der ursprünglichen WHO Empfehlung.

Laut einem Fernsehbeitrag vom 10.04.2021 ([Standort Berlin - Millionen Corona Test kommen aus Berlin - tv.berlin \(tvb.de\)](#)) mit einem Interview der TIB Molbiol Firmenleitung Constanze und Olfert Landt, wurde der PCR-Test zum Nachweis der Genome von SARS-CoV-2 von Olfert Landt entwickelt (laut ihm erste 5 Minuten). Die Genese der ersten kommerziellen Tests und des WHO-Protokolls wirft entsprechend einige Fragen ob des korrekten zeitlichen Ablaufs und des Urheberrechts auf, was auch in einem Beitrag von Juli 2023 ([Dank PCR-Test: Drosten macht Immobilien-Millionär noch reicher | NIUS.de](#)) wie folgt thematisiert wird: *„Landts Unternehmen ist das erste, das PCR-Testkits für das Sars2-Virus herstellt. Bereits am 10. Januar 2020 startete man mit der Auslieferung. Und das, obwohl die Virus-Sequenz erst am 13. Januar in der offiziellen Genproben-Datenbank landet.“*

Genau Zahlen sind nicht eruiert, jedoch hat TIB Molbiol davon im Jahr 2020 nach eigenen Angaben bereits weltweit über 60 Millionen Tests ausgeliefert (<https://www.tib-molbiol.de/de/covid-19>), obwohl diese nach wie vor als **„Not tested for use in diagnostic procedures“** (z.B. Kopfzeile in https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_53-0777_96_Wuhan-R-gene_V200204_09155376001%20%282%29.pdf) deklariert sind. Die entsprechenden Beipackzettel mit den Protokollangaben und Kitbeschreibungen der Firma TIB Molbiol wurden erstaunlicherweise nach Metaangaben der ursprünglich verfügbaren PDFs (können elektronisch zur Verfügung gestellt werden) bereits am **15.01.2020** (!!!) komplett mit ROCHE SAP-Nummer erstellt, sind nach wie vor unverändert verfügbar, wenn auch mit Metadatenanalyse 06.02.2020 parallel zu anderen Testkits, welche inzwischen eine Zulassung für in vitro Diagnostik haben.

Inzwischen (Stand Juni 2022) gibt es eine große Bandbreite von PCR Nachweissystemen (https://www.theglobalfund.org/media/9629/covid19_diagnosticproducts_list_en.pdf) von denen auch viele für die In vitro Diagnostik (IVD) von SARS-CoV-2 zugelassen sind. In der

exemplarischen Beschreibung eines dieser kits (https://www.genesig.com/assets/files/Path_COVID_19_CE_STED_IFU_Issue_500.pdf) liest sich unter 1. „Intended use“ (bestimmungsgemäßer Gebrauch): **„Positive Ergebnisse sind ein Hinweis auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA. Positive Ergebnisse schließen eine Co-Infektion mit anderen Bakterien oder anderen Viren nicht aus. Negative Ergebnisse schließen eine SARS-CoV-2-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen zur Patientenbehandlung verwendet werden. Positive und negative Ergebnisse müssen mit klinischen Beobachtungen, der Patientengeschichte und epidemiologischen Informationen kombiniert werden.“** im Original: **„Positive results are indicative of the presence of SARS-CoV-2 RNA. Positive results do not rule out co-infection with other bacteria or other viruses. Negative results do not preclude SARS-CoV-2 infection and should not be used as the sole basis for patient management decisions. Positive and Negative results must be combined with clinical observations, patient history, and epidemiological information“**

4. Zusammenhang positiver Nukleinsäure-Nachweis in der RT-qPCR mit Erkrankung und Infektiosität

Nur tatsächlich Infizierte mit sich vermehrende und auch von den Zellen nach außen abgegebenen Viren in ausreichender „infektiöser“ Menge können das Virus weitergeben und bergen das Risiko einer Erkrankung und sind damit für die Bestimmung des Verlaufs einer Infektionsrate und Erkrankungswelle heranzuziehen.

4.1. Bewertung Deutsches Ärzteblatt

„Der PCR-Nachweis ist die Standarduntersuchung zur Diagnose von Virusinfektionen wie SARS-CoV-2. **Der Test weist einzelne Erregergene, jedoch keine intakten Erreger nach.**“ Und: „Es besteht die Möglichkeit, dass der Test über die Dauer der Infektion hinaus positiv ausfällt, weil noch „Virustrümmer“ in Nase oder Rachen vorhanden sind. **Ein sicherer Nachweis der Infektiosität ist nur mit aufwendigen Tests möglich, bei denen im Labor untersucht wird, ob das Material aus den Abstrichen lebende Zellen abtöten kann.**“ Dies schrieb das **Dt. Ärzteblatt am 01.02.2021** (<https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/120745>).

4.2. CDC offiziell

Auch das **CDC** weist unter „Disadvantages“ der NAATs (nucleic acid amplification tests = PCR) darauf hin, **„Ein positiver NAAT-Diagnostetest sollte nicht innerhalb von 90 Tagen wiederholt werden, da Personen weiterhin nachweisbare RNA haben können, nachdem das Risiko einer Übertragung vorüber ist“** im Original: **„A positive NAAT diagnostic test should not be repeated within 90 days, since people may continue to have detectable RNA after risk of transmission**

has passed" (unten in der summary table auf: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#previous>)

4.3. Frankfurter Gesundheitsamt

„Der PCR-Test detektiert Genabschnitte von SARS-CoV-2; er sagt nichts darüber aus, ob es sich um infektiöse Viren oder um Virusreste nach durchgemachter Infektion handelt. Hierzu wäre eine Erregeranzucht erforderlich.“ Dies war in einer Veröffentlichung des Leiters des **Frankfurter Gesundheitsamtes** aus dem August 2020 zu lesen ([https://www.laekh.de/fileadmin/user_upload/Heftarchiv/Einzelartikel/2020/10_2020/Die Covid-19-Pandemie in Frankfurt am Main.pdf](https://www.laekh.de/fileadmin/user_upload/Heftarchiv/Einzelartikel/2020/10_2020/Die_Covid-19-Pandemie_in_Frankfurt_am_Main.pdf)).

4.4. CDC Veröffentlichung

In einer **CDC-Veröffentlichung vom 13.07.20** unter der Überschrift *„CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel For Emergency Use Only Instructions for Use“*, (<https://www.fda.gov/media/134922/download>) findet sich auf S. 38 unter der (noch auf S. 37 zu findenden) Überschrift *„Limitations“* :

“• Detection of viral RNA may not indicate the presence of infectious virus or that 2019-nCoV is the causative agent for clinical symptoms.”

Die Übersetzung lautet: *„Der Nachweis von viraler RNA weist möglicherweise nicht auf das Vorhandensein eines infektiösen Virus hin oder darauf, dass 2019-nCoV der ursächliche Erreger für klinische Symptome ist.“*

4.5. WHO Information für Testlabors

Dass ein reiner mRNA-Nachweis von SARS-CoV-2 nicht zwingend mit einer Erkrankung korrelieren muss und nicht als alleiniges Kriterium für die Beurteilung der Erkrankung herangezogen werden darf, sondern nur ein Hilfsmittel zur Bestätigung einer klinischen Diagnose darstellt, wird auch eindeutig in der **WHO Information** *„Notice for IVD Users 2020/05, Nucleic acid testing (NAT) technologies that use polymerase chain reaction (PCR) for detection of SARS-CoV-2“* vom 13.01.2021 (veröffentlicht am 20.01.2021 unter <https://www.who.int/news/item/20-01-2021-who-information-notice-for-ivd-users-2020-05>) beschrieben: *„Wenn die Testergebnisse **nicht mit dem klinischen Bild** übereinstimmen, sollte eine neue Probe entnommen und mit der gleichen oder einer anderen NAT-Technologie erneut getestet werden.“* - **im Original:** *„Where test results do not correspond with the clinical presentation, a new specimen should be taken and retested using the same or different NAT technology.“*

Ferner: *„Die meisten **PCR-Assays sind als Hilfsmittel für die Diagnose** indiziert, daher müssen Gesundheitsdienstleister jedes Ergebnis in Kombination mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme, dem Probentyp, den Assay-Spezifika, **klinischen Beobachtungen, der***

Patientenanamnese, dem bestätigten Status aller Kontakte und epidemiologischen Informationen berücksichtigen.“ Im Original: *“Most PCR assays are indicated as an aid for diagnosis, therefore, health care providers must consider any result in combination with timing of sampling, specimen type, assay specifics, clinical observations, patient history, confirmed status of any contacts, and epidemiological information”*

4.6. Publikation in Lancet

Auch in einer **Publikation in Lancet**

([https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)00425-](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)00425-6/fulltext#%20)

[6/fulltext#%20](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)00425-6/fulltext#%20)) bezeichnen die Autoren den RT-qPCR Test wie folgt: *“Unserer Ansicht nach ist der aktuelle PCR-Test daher nicht der geeignete Goldstandard für die Bewertung eines SARS-CoV-2-Tests für die öffentliche Gesundheit“* Im Original: *„In our view, current PCR testing is therefore not the appropriate gold standard for evaluating a SARS-CoV-2 public health test”*, da ihrer Meinung nach die PCR auch dann noch positiv anschlägt, wenn die Getesteten schon nicht mehr positiv sind, da die RNA über Wochen und Monate auch nach erfolgreicher Bekämpfung durch das Immunsystem weiter im Körper persistieren kann, ohne dass die Person noch ansteckend ist. *„Sobald die Replikation von SARS-CoV-2 durch das Immunsystem unter Kontrolle gebracht wurde, sinken die mittels PCR in den Atemwegssekreten nachweisbaren RNA-Konzentrationen auf sehr niedrige Werte, bei denen es sehr viel unwahrscheinlicher ist, dass die Betroffenen andere infizieren. Die verbleibenden RNA-Kopien können Wochen, gelegentlich auch Monate, benötigen, bis sie verschwunden sind, während dieser Zeit bleibt die PCR positiv“* im Original: *„Once SARS-CoV-2 replication has been controlled by the immune system, RNA levels detectable by PCR on respiratory secretions fall to very low levels when individuals are much less likely to infect others. The remaining RNA copies can take weeks, or occasionally months, to clear, during which time PCR remains positive”*

4.7. Aussagen von Christian Drosten

4.7.1 Gerichtsgutachten Drosten

In seinem **Gutachten vom April 21 für ein Gericht** in Heidelberg (Anonymisiert hier einzusehen: <https://www.corodok.de/wp-content/uploads/2021/05/Gutachten-Prof.-Drosten-v.-31.3.2021-anonymisiert.pdf>) bestätigt der **Fachgutachter C. Drosten**, dass ein RT-PCR Test auch dann positiv werden kann, wenn *„zumindest der nachzuweisende Abschnitt aus dem Erbgut des Virus in der getesteten Probe vorliegt.“* , bedeutet: auch Erbgutfragmente können, ohne dass sie aus einem intakten, vermehrungsfähigem Virus stammen, bereits in er PCR positive Ergebnisse liefern, damit auch in nicht infektiösen Proben einen vermeintlichen Virusnachweis erbringen.

4.7.2. NDR Podcast 94

In seinem **NDR Podcast 94** vom 22.06.2021 (<https://www.ndr.de/nachrichten/info/coronaskript306.pdf>) Seite 16 geht C. Drosten auf den Zusammenhang Ct-Wert und Infektiosität wie folgt ein: „....*dass ein Fall, nur weil der Patient in diesem Moment **einen hohen Ct-Wert hat, also weil er vielleicht nicht infektiös ist jetzt im Moment, also der hat wenig Virus, der hat Virus, aber der hat wenig Virus**,....*“

4.7.3. Publikation in Science

In einer **Publikation in Science** unter Federführung von C. Drosten vom Mai 2021 (DOI: [10.1126/science.abi5273](https://doi.org/10.1126/science.abi5273)), in welcher die Infektiosität von SARS-CoV-2 untersucht wird, definieren die Autoren gleich im ersten Satz des Abstractes die Parameter für die Quantifizierung und mögliche Weitergabe des Virus als „.... *sind die Virale Last und ob die Proben ein vermehrungsfähiges Virus Isolat in Zellkultur enthalten*“ Im Original: „....*are viral load and whether samples yield a replicating virus isolate in cell culture.*“ Sie führen in der Einleitung ferner aus, dass die virale Last über die virale RNA-Konzentration ermittelt wird und die erfolgreiche Virusisolation in Zellkulturansätzen. Ferner weisen sie darauf hin, dass selbst die „**Viruslast und die Zellkulturinfektiosität nicht direkt auf die Infektiosität in vivo übertragen werden können und der Einfluss des sozialen Kontextes und des Verhaltens auf die Übertragung sehr hoch ist, kann man im Allgemeinen davon ausgehen, dass diese quantifizierbaren Parameter am ehesten mit der Übertragungswahrscheinlichkeit in Verbindung gebracht werden.**“

Im Original: „ *While viral load and cell culture infectivity cannot be translated directly to in vivo infectiousness, and the impact of social context and behavior on transmission is very high, these quantifiable parameters can generally be expected to be those most closely associated with transmission likelihood*“.

5. Aussagen zur PCR-Diagnostik aus den RKI-Protokollen

Die zum 30.05.2024 offiziell vom RKI freigegebenen Besprechungsprotokolle des Krisenstabes „Neuartiges Coronavirus (COVID-19), Aktenzeichen 4.06.02/0024#014 können auf der Seite des RKI unter folgendem Link eingesehen und geladen werden:

[RKI - COVID-19-Pandemie - Interne COVID-19-Krisenstabsprotokolle des Robert Koch-Instituts \(https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/C/COVID-19-Pandemie/COVID-19-Krisenstabsprotokolle.html\)](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/C/COVID-19-Pandemie/COVID-19-Krisenstabsprotokolle.html)

Hier finden sich auch einiges entscheidende Aussagen zur PCR-Diagnostik, welche im Folgenden nach Datum sortiert hier zitiert werden:

Datum	Punkt aus Protokoll	Zitat direkt aus den freigegebenen Protokollen	Anmerkungen
14.01.2020	3	(<i>geschwärzt</i>) (FG17) hat (<i>geschwärzt</i>) (Charité) kontaktiert. Basierend auf dem Gespräch hat FG17 Primer zur Diagnostik des neuen CoV bestellt. ZBS1 überlegt auch Primer zu bestellen.	Hier ist zu vermuten dass der geschwärzte Kontakt der Charité mit Prof. C. Drosten gemeint ist.
16.01.2020	3	Das RKI hat bereits entsprechende Primer zur PCR-Diagnostik des neuen CoV vorliegen. Vermutlich am 17.01.2020 wird auch eine Positivprobe eintreffen. Den PCR-Assay hat (<i>geschwärzt</i>) entwickelt.	Hier ist wieder ein Name geschwärzt, da das PCR-Protokoll aber von V. Coman und C. Drosten am 13.01. in der ersten Version zur WHO eingereicht wurde, wird sich hier auch der Name C. Drosten verbergen
20.01.2020	5	-Virologie Charité/ (<i>geschwärzt</i>) sind als KL primär zuständig, entwickelten die Labordiagnostik für MERS und nun auch für nCoV. - Die PCR-Assay-Entwicklung ist einfacher für SARS und 2019-nCoV, da beide Viren sich sehr ähnlich sind. - Orientierung an publizierten Protokollen.	Da Drosten die MERS-Diagnostik entwickelt hatte, müsste sich auch hier sein Namen hinter dem geschwärzten Feld befinden.
24.01.2020	3	Human-to-human transmission durch asymptomatische Träger mit hohen CT-Werten ; Labore wurden gebeten zu teilen; CT-Wert von 20-30 ; WHO stellt Assays bereit; Uni Bern synthetisiert das Genom;	Hier wurde offensichtlich zum ersten mal bereits die Problematik hoher Ct-Werte diskutiert, bei denen auch „asymptomatische“ Getestete positive PCR-Ergebnisse liefern und auch ein CT von 20-30 (vermutlich) als Richtwert für eine valide Diagnostik diskutiert.
27.01.2020	5	INV-Diagnostik; Verdachtsproben sollten auch auf andere resp. Erreger getestet werden.	Hier bestand offenbar noch die (korrekte) Einschätzung, dass die Symptome durch ein

			breite Palette von respiratorischen Erregern ausgelöst werden können
03.02.2020	2	Ein positives PCR-Ergebnis nach Gesundung muss nicht zwangsläufig mit Infektiosität einhergehen.	<i>Bereits am Anfang Februar 2020 so dokumentiert, wenn auch mit der Eingrenzung „nach Gesundung“</i>
	5	☒ Die Qualität der PCR kann derzeit noch nicht ausreichend eingeschätzt werden . ZBS 1 erwartet Isolate aus München und Japan zur weiteren Untersuchung.	Hier auch bereits korrekt die Diskussion über die PCR-Zuverlässigkeit
04.02.2020	5	Eine Unterscheidung zwischen nCoV und SARS ist mit der PCR möglich.	
05.02.2020	5	PCR Virusnachweis in Sekreten abhängig von verwendetem Material - wenn PCR negativ ist, ist weitergehende Untersuchung nicht notwendig , jedoch ist nCoV potentiell lange nachweisbar (bis zu 38 Tage)	
10.02.2020	6	Ein belgischer Provider hat Kontaminationsprobleme mit einer Positivkontrolle , vorerst Nutzung des Berliner Providers	Hier bereits zum ersten mal die Problematik der Kontamination von PCR-Produkten , vermutlich war die Positivkontrolle in den PCR-Primern beigemischt wie vom Löffler-Institut publiziert (unter Punkt 3.7.2. Wernike et al.)
11.02.2020	4	Diese Analysen weisen auf die Möglichkeit einer quantifizierten PCR (statt konservativ 2x negative Proben) und damit der Entlassung der Patienten bei einem bestimmten cut-off (unterhalb dieses 10^4 /ml). -Die Validierung des Charité-Tests durch WHO-AG ist geplant , das RKI soll sich beteiligen.	Hier zum ersten Mal die Diskussion um die Virusgenommene Der PCR Test (Drosten/Corman) war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht validiert!
12.02.2020	6	Diagnostikkommission hat Ringversuche für 2019-nCoV eingeleitet , warten aktuell auf Rückmeldung, um zu gucken, welche Labore dies anbieten wollen	

13.02.2020		<p>...nach (<i>geschwärzt</i>) besteht dann vermutlich keine Infektiosität mehr, wenn in der Zellkultur keine Virusreplikation mehr bei 10^6/ml beobachtet, deswegen um sicher zu gehen 10^5/ml vorgeschlagen und als ausreichendes Entlassungskriterium empfunden;</p>	<p>Hier hat ein Fachexperte erklärt, dass es einen Zusammenhang gibt zwischen Zellkultur und Anzahl der Viren pro ml. Grenzwert wird definiert. Wäre dann bei Genomäquivalenten ab diesem Zeitpunkt für die PCR als Richtwert wichtig gewesen.</p>
20.02.2020	1	<p>Unklarheit über mögliche falschpositive Testung der Kreuzfahrtpassagierin in Malaysia (2 pos. Tests, Frau ggf. positiv auf dem Schiff), Qualität der Testung nicht bekannt; Zweifel, ob die Passagiere der Westerdam überhaupt auf exponiert waren;</p> <ul style="list-style-type: none"> - Information von CDC: 1. Probe falsch positiv, 2. Probe als Passagier symptomatisch war, ist negativ – 	<p>Hier bereits auch Diskussion um falsch positive Testungen, etwas was ja dann in der öffentlichen Kommunikation immer als „Verschwörungstheorie“ dargestellt wurde, ist hier bereits belegt</p>
	6	<ul style="list-style-type: none"> - PCR-Tests: Sensitivität? Spezifität? Cross-Validierung? <p>Es gibt viele verschiedene PCRs (siehe WHO-Seite dazu), RKI nutzt (<i>geschwärzt</i>) Assays und RKI-eigene Assays; Ringversuch von WHO noch nicht geplant (heute WHO-TK zu Labordiagnostik)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anmerkung zur Qualität der PCR: am LGL war 1 Probe eines deutlich symptomatischen Falls 3x negativ, Nachbeprobung bei (<i>geschwärzt</i>) war positiv; laut LGL war dies ein technischer Fehler, der inzwischen behoben ist 	<p>Hier erneut Fachdiskussion um PCR-Qualität und Dokumentation von technischen Fehlern</p>
21.02.2020	6	<p>Namen der Firmen mit bekanntem Kontaminationsproblem sind nicht</p>	<p>Mehrere Firmen (gemeint sich PCR-Kit Provider)</p>

		öffentlich. Bekannte Firmen werden mit deutschen Laboren kommuniziert	haben offensichtlich Kontaminationsprobleme – PCR damit nicht beurteilbar!
28.02.2020	6	<ul style="list-style-type: none"> 40 Proben durch AGI Sentinel erhalten, schlechte Erfahrung mit kontaminiertem Primer, Vorrat des guten Primers von 4 Wochen, Nach- bzw. neue Bestellung läuft 	Und schon wieder das Kontaminationsproblem der Primer diskutiert
02.03.2020	6	<p>Conamination: Es gab 2 Firmen, die betroffen waren. Neue Batches sind in Ordnung. Das RKI wurde über das EVD-LabNet informiert.</p> <p>Verglichen mit den in-house Assays des RKI funktionieren die Test Kits gut. Die meisten Labore arbeiten aber mit in-house Assays.</p>	Nochmals Diskussion um Kontamination und es zeigt sich deutlich, dass kaum validiert Testkits verwendet wurden sondern selbstgemachte „in house“ assays. Dies bedeutet dass die PCR-Ergebnisse nicht vergleichbar waren.
03.03.2020	6	<p>Kontamination: Es gibt Probleme mit Zulieferern von Primern (Kontrollen sind betroffen), mind. 3 Firmen sind von Kontamination betroffen. Es wird nicht allgemein bekannt gegeben, um welche Firmen es sich handelt. Die Firmen selbst sind in der Pflicht Kunden zu informieren. Keine Aufgabe RKI</p>	Das RKI wusste um kontaminierte Primer (Anmerkung: dadurch werden selbst Wasserproben positiv) und befand es aber nicht als deren Aufgabe, das den testenden Labors zu kommunizieren.
06.03.2020	6	<ul style="list-style-type: none"> Das Verhältnis von replikationsfähigen Viren zu genomischer RNA in den Proben soll untersucht werden. - ARS-Daten: von 500 in der Routinediagnostik getesteten Proben waren 8 positiv. 	Hier wird unterschieden zwischen der Menge an genomischer RNA (die wird mittels RT-PCR nachgewiesen) und tatsächlich vermehrungsfähigen Viren . Die Diagnostik unter kontrollierten Bedingungen zeigt, dass die wenigsten der Erkrankten mit Akuten Respiratorischen

			Symptomen (ARS) tatsächlich für SARS-CoV-2 positiv waren.
11.03.2020	6	<ul style="list-style-type: none"> Noch nicht abschließend klar, ob Kontaminationsproblem behoben wurde da es noch keine weiteren Lieferungen gab 	Noch immer geistert die Kontaminationsproblematik ungelöst rum.
24.03.2020	8	- Proben mit sehr hohem CT , RNA ist noch drin, aber in der Zellkultur ist es nicht mehr infektiös	Zusammenhang zwischen PCR-Parametern (CT-Wert) als Indikator für RNA-Reste und Infektiosität wird dokumentiert
09.04.2020	7	Einigung: PCR bleibt Goldstandard und ist alleiniges Kriterium für die Diagnostik der Infektion, hierzu muss eine Stellungnahme ins Internet gestellt werden.	PCR wurde per „Einigung“ als Goldstandard festgelegt, nicht aufgrund wissenschaftlicher Daten
16.04.2020	7	Erneut Kontaminationsproblem bei einer Firma;	Und wieder Kontaminationsprobleme dokumentiert
17.04.2020	4	In den Entlasskriterien wird beschrieben, dass ein positiver PCR-Nachweis bei einem Genesen nicht zwangsläufig mit einer Infektiosität einhergehen muss . Für diese Fälle sollte immer eine Viruskultur angelegt werden.	Hiermit wird eindeutig dokumentiert, dass es eben keinen Zusammenhang gibt zwischen positiver PCR und Infektiosität, sondern dass hierzu eine Zellkultur (Virusanzucht) nötig ist.
29.04.2020	7	<ul style="list-style-type: none"> Rel. hoher Anteil falsch positiver PCR-Ergebnisse - Es gibt im Rahmen einer Zwischenauswertung von INSTAND einen relativ hohen Anteil von falsch-positiven Ergebnissen – Man muss beachten, dass alle Teste falsch-positive Ergebnisse zeigen , ggf. müsste man empfehlen bei asymptomatischen Personen im Screeningverfahren einen weiteren Test zur Bestätigung zu machen.	Hier wird der erste Ringversuch diskutiert (siehe auch Punkt 3.6.2.)– entscheidend ist die Aussage, dass ALLE Tests (gemeint sind vermutlich Testkits) auch falsch positive Ergebnisse zeigen. Bedeutet, die Fachleute vom RKI wussten dass ein großes Problem mit falsch positiven PCR Ergebnissen

			bestand (welches die „Fallzahlen“ dann künstlich hochgetrieben hat!
06.05.2020	1	<p>RNA Fragmente konnten bis zu 2 Monaten nachgewiesen werden aber mit kulturellen Tests konnten bei diesen Patienten kein lebendes Virus gefunden werden</p> <p>PCR zum Verlaufsmonitoring nicht geeignet.</p> <p>CT-Werte sind testabhängig, können nicht so einfach zur Deutung der Infektiosität verwendet werden (ct-Werte > 25 kann nicht gleichgesetzt werden mit nicht mehr infektiös)</p>	Hier wird erneut korrekt auf die Problematik positiver RNA Nachweis und Aussage über eine Infektiosität hingewiesen, auch hinsichtlich des CT wertes.
05.06.2020	1	selbst bei einer Doppeltestung seien die PCR-Ergebnisse nicht ausreichend sicher; eine sichere Aussage zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen fehlt.	Hier geht es um die Testung von 10 mio Einwohnern in Wuhan, bei der kaum positive Fälle gefunden wurden, was das RKI zur (korrekten Aussage) bringt, dass eben PCR Ergebnisse nicht sicher seien.
15.06.2020	9	<p>Die Proben wurden per PCR sowie Zellanzucht ausgewertet. Es zeigte sich, dass (bis auf einen Ausreißer unter Immunsuppression) nach >7 Tage nach Symptombeginn in der Zellkultur nichts mehr wächst. Ein Cut-off wurde bei einem CT-Wert von 30 festgelegt. Es wurde gesehen, dass ab einem CT-Wert ab 25 bereits nichts mehr wächst, jedoch gab es einen Ausreißer von 29, weshalb er Cut-off dann bei 30 festgelegt wurde.</p>	Untersuchungsergebnisse vom RKI selber!!!!
17.06.2020	4	Im aktuellen Ärzteblatt ist ein Artikel zur Interpretation der Ergebnisse von PCR-Tests auf SARS-CoV-2 erschienen.	Die unter Punkt 3.4. angesprochene

		Dabei wird primär die Relevanz der Vortestwahrscheinlichkeit hervorgehoben.	Vortestwahrscheinlichkeit wird auch wahrgenommen
	13	Es liegen knapp 2 Mio PCR-Testergebnisse vor. Eine Korrelation mit klinischen Daten ist nicht möglich.	Labortests ohne Bezug zur klinischen Realität bestätigt
19.06.2020	8	hier muss der CT-Wert und ggf. Ergebnisse der Anzucht (Symptomfreiheit?) zur Hilfestellung und Entscheidung verwendet werden	Auch hier wieder: Anzuchtergebnisse sind nötig um über Patienten und Infektiosität wirklich entscheiden zu können
		PCR ist für SARS-CoV-2 weniger zuverlässig als für manche andere Erreger, die Spezifität bei Ringversuchen lag teilweise bei 92% und nicht über 98%	Und hier auch eine klare Beurteilung der PCR für SARS-CoV-2 als unzuverlässig
14.08.2020	2	Aus Lagezentrum BMG: Hinweis auf ISO wurde bewusst gestrichen, jeder PCR-Test aus Liste von RKI ist anzuerkennen.	Keine ISO-zertifizierung der PCR-Tests notwendig!

Die Besprechungsprotokolle des ersten halben Jahres aus dem RKI Krisenstab zeigen, dass hier bereits zu Beginn die im vorliegenden Gutachten unter den Punkten 2.1. + 4 (PCR weist keine Infektiosität nach) sondern nur Genomabschnitte der viralen RNA ohne klinischen Bezug
3.7: PCR Materialien haben Kontaminationsprobleme die zu falsch positiven Ergebnissen führen sowie Probleme in den Handlungsabläufen der Labors bedingen falsch positive Ergebnisse

Im Fachgremium bekannt und fachlich korrekt diskutiert würden, allerdings ohne in der Öffentlichkeit die Konsequenzen daraus zu ziehen und gegen die Massentestungen, vor allem von „asymptomatischen“ vorzugehen, auch wenn in mehreren Statements diese Testung von gesunden Personen als nicht sinnvoll erachtet wurde.

„Standardvorgehen in Deutschland: Testung von asymptomatischen Personen nicht sinnvoll und verschwendet Ressourcen.“ (Protokoll vom 11.02.2020) „Vorschlag klare Botschaft für morgige Pressekonferenz Schaade: keine Testung von asymptomatischen Personen“ (Protokoll vom 10.03.2020)

Darüber hinaus wurde festgehalten, dass die Tests zumindest im ersten Halbjahr 2020 größtenteils nicht validiert und kontrolliert waren.

6. Fazit und Zusammenfassung

Zur Aussagekraft der PCR (als PCR, RT-PCR oder RT-qPCR) Tests zur Erkennbarkeit einer Infektiosität mit dem Coronavirus SARS-CoV-2

1. Vor dem Hintergrund der hier dargelegten Probleme und technischen Limitationen ist die PCR in allen Formen (PCR, RT-PCR oder RT-qPCR) nur geeignet, Genomfragmente nachzuweisen und kein geeignetes zuverlässiges (und zugelassenes) Diagnostikmittel zum Nachweis von intakten, infektiösen (replikationsfähigen) SARS-CoV-2 Viren.
2. Diese molekulare Technik kann daher niemals als Nachweis dienen, ob eine Person infektiös ist, denn dies würde voraussetzen, dass intakte (infektiöse) Erreger in ausreichender Menge vorhanden sind UND abgegeben werden.
3. Ferner ist das reine PCR Testergebnis nur ein Laborwert, der angesichts der dargelegten Aspekte nur in Zusammenschau mit einer klinischen Symptomdiagnose (erhoben durch Gesundheitsdienstleister, in Deutschland Mediziner) überhaupt zur Abschätzung einer möglichen Virusinfektion eingesetzt werden darf.

Zusammenfassung:

Eine PCR kann ein hilfreiches Diagnostikmittel sein, um eine Verdachts- oder Differentialdiagnose abzusichern, ABER:

Zur Testung asymptomatischer und selbst symptomatischer Menschen anhand eines Nasen-Rachenabstrichs, wie er massenweise unkritisch und überwiegend von nicht-medizinischen Personal OHNE (hierbei entscheidend: entgegen der WHO-Forderung!) Anamnese- und Symptomerhebung bei den Getesteten erfolgt, **ist die eingesetzte PCR in jeglicher Form (RT-PCRT; RT-qPCR) nicht tauglich, eine Infektion und vor allem eine Infektiosität mit SARS-CoV-2 oder anderen Viren/Krankheitserregern zu erkennen.**

orschlag klare Botschaft für morgige Pressekonferenz Schaade: keine Testung von asymptomatischen Personen

7. Anlagen

ANNEX 1: Definition von "Infektion" und "Patient"

ANNEX 2: PCR-Beschreibung des Schweizer Amtes für Bevölkerungsschutz
(Labor Spiez)

ANNEX 3: Graphische Darstellung der CT-Werte in Verhältnis zur Anzahl der Ausgangsgenome am Beispiel des Viasure-Testkits

ANNEX 4: Hochrangig publizierte Übersichtsarbeit zur Wertung der verschiedenen Diagnostikverfahren von Isabella Eckerle, Nature Reviews Microbiology vom 02.12.2022 mit Hervorhebungen in gelb

ANNEX 5: Retraction Letter Science

ANNEX6: Australisches Gesundheitsministerium

ANNEX 7: Infographik RKI

Bewertung der Begriffe "asymptomatischer Patient" und "positiver Patient" in Bezug auf RT-qPCR-getestete Personen auf SARS-CoV-2

Nach den Definitionen (siehe unten) ist der Begriff asymptomatischer Patient für gesunde Personen, die nur PCR-positiv waren, ohne irgendwelche Symptome zu haben, unsinnig.

Da der Begriff "Patient" per se einen medizinischen Zustand umfasst, der eine professionelle medizinische Betreuung erfordert, kann eine RT-qPCR-positiv Person nur dann als Patient definiert werden, wenn sie Symptome hat. Letztere (Symptome) entsprechen dem Begriff "Infektion", da eine Person nur dann als infiziert gelten kann, wenn ihr Körper auf einen eingedrungenen und sich vermehrenden Erreger reagiert.

Definition des CDC für Covid-19 Patienten (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>)

Bei Menschen, die sich mit COVID-19 infiziert haben, wurde ein breites Spektrum von Symptomen berichtet, das von leichten bis zu schweren Erkrankungen reicht. Die Symptome können 2-14 Tage nach dem Kontakt mit dem Virus auftreten. Jeder kann leichte bis schwere Symptome haben. Menschen mit diesen Symptomen können COVID-19 haben:

Symptome

- Fieber oder Schüttelfrost
- Husten
- Kurzatmigkeit oder Atembeschwerden
- Müdigkeit
- Muskel- oder Körperschmerzen
- Kopfschmerzen
- Neuer Verlust von Geschmack oder Geruch
- Halsschmerzen
- Verstopfung oder laufende Nase
- Übelkeit oder Erbrechen
- Diarrhöe

Ein "PCR-positiver Patient" ist also eine Person **mit Symptomen** (hier Symptome einer Atemwegserkrankung/Symptome einer Virusinfektion),

Im Original:

People with COVID-19 have had a wide range of symptoms reported – ranging from mild symptoms to severe illness. Symptoms may appear 2-14 days after exposure to the virus. Anyone can have mild to severe symptoms. People with these symptoms may have COVID-19: Fever or chills

- Cough
- Shortness of breath or difficulty breathing
- Fatigue
- Muscle or body aches
- Headache
- New loss of taste or smell
- Sore throat
- Congestion or runny nose
- Nausea or vomiting
- Diarrhea

Folglich ist eine Person ohne eines der genannten Symptome weder infiziert noch ein Patient, unabhängig von den RT-qPCR-Ergebnissen.

Infektion:

Zusammenfassung aus den nachstehenden Quellen:

Eine Infektion ist definiert als eine Situation, in der mindestens die folgenden drei Aspekte zusammen auftreten:

- Invasion des Körpers durch Mikroorganismen (Keime) wie Bakterien oder Viren
- Diese eingedrungenen Mikroorganismen vermehren sich im Körper
- Und der Körper reagiert auf sie (Symptome)

Per Definition von einer Infektion oder einer infizierten Person zu sprechen, ist nur dann zutreffend, wenn alle drei oben genannten Aspekte gegeben sind.

Das bedeutet: ohne Symptome ("asymptomatisch") - bei der betroffenen Person kann keine Infektion definiert werden

Quellen:

1. <https://www.rxlist.com/infection/definition.htm>:

Das Eindringen und die Vermehrung von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Parasiten, die normalerweise nicht im Körper vorhanden sind.

2. Wikipedia:

Eine Infektion ist das Eindringen von Krankheitserregern in das Körpergewebe eines Organismus, ihre Vermehrung und die Reaktion des Wirtsgewebes auf die Infektionserreger und die von ihnen

produzierten Toxine.[1] Eine Infektionskrankheit, auch übertragbare Krankheit oder übertragbare Krankheit genannt, ist eine Krankheit, die durch eine Infektion verursacht wird.

Infektion

<https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/infection>

Eindringen und Vermehrung von Mikroorganismen in Körpergewebe, wie bei einer Infektionskrankheit. Der Infektionsprozess ähnelt einer kreisförmigen Kette, wobei jedes Glied einen der am Prozess beteiligten Faktoren darstellt. Eine Infektionskrankheit tritt nur auf, wenn jedes Glied vorhanden ist und in der richtigen Reihenfolge.

Diese Verbindungen sind

- (1) der Erreger, der in ausreichender Zahl und Virulenz vorhanden sein muss, um normales Gewebe zu zerstören;
- (2) Reservoir, in denen der Erreger gedeihen und sich vermehren kann, z. B. Körpergewebe und Ausscheidungen von Menschen, Tieren und Insekten sowie kontaminierte Lebensmittel und Wasser;
- (3) eine Pforte, durch die der Erreger den Wirt verlassen kann, wie z. B. die Atemwege oder der Darmtrakt;
- (4) einen Übertragungsweg, z. B. durch die Hände, Luftströmungen, Vektoren, Fomiten oder andere Mittel, durch die die Erreger von einem Ort oder einer Person zu einer anderen übertragen werden können, und
- (5) eine Eintrittspforte, durch die die Erreger in den Körper eines (6) empfänglichen Wirtes gelangen können.

Offene Wunden und der Atem-, Darm- und Fortpflanzungstrakt sind Beispiele für Eintrittspforten. Der Wirt muss für die Krankheit empfänglich sein, d. h. er darf keine Immunität gegen die Krankheit besitzen oder muss über keine ausreichende Widerstandskraft verfügen, um die Invasion der Krankheitserreger zu überwinden. Der Körper reagiert auf das Eindringen der Erreger mit der Bildung von ANTIKÖRPERN und einer Reihe von physiologischen Veränderungen, die als INFLAMMATION bezeichnet werden.

Im Original:

infection

invasion and multiplication of microorganisms in body tissues, as in an infectious disease. The infectious process is similar to a circular chain with each link representing one of the factors involved in the process. **An infectious disease occurs only if each link is present and in proper sequence.**

These links are

- (1) the causative agent, which **must be of sufficient number** and **virulence** to destroy normal tissue;
- (2) reservoirs in which the organism can thrive and reproduce; for example, body tissues and the wastes of humans, animals, and insects, and contaminated food and water;
- (3) a portal through which the pathogen can leave the host, such as the respiratory tract or intestinal tract;
- (4) a mode of transfer, such as the hands, air currents, vectors, fomites, or other means by which the pathogens can be moved from one place or person to another; and
- (5) a portal of entry through which the pathogens can enter the body of (6) a susceptible host.

Open wounds and the respiratory, intestinal, and reproductive tracts are examples of portals of entry. The host must be susceptible to the disease, not having any immunity to it, or lacking adequate resistance to overcome the invasion by the pathogens. The body responds to the invasion of causative organisms by the formation of [ANTIBODIES](#) and by a series of physiologic changes known as [INFLAMMATION](#).

<https://www.cdc.gov/infectioncontrol/spread/index.html>

Wie kommt es zu Infektionen?

Eine Infektion entsteht, wenn Keime in den Körper eindringen, sich vermehren und eine Reaktion des Körpers auslösen.

Drei Dinge sind notwendig, damit eine Infektion entsteht:

- Quelle: Orte, an denen Infektionserreger (Keime) leben (z. B. Waschbecken, Oberflächen, menschliche Haut)
- Anfällige Person mit einer Möglichkeit für Keime, in den Körper einzudringen
- Übertragung: ein Weg, auf dem die Keime zur anfälligen Person gelangen

Im Original:

How Do Infections Occur?

An infection occurs when **germs enter the body, increase in number, and cause a reaction of the body.**

Three things are necessary for an infection to occur:

- **Source:** Places where infectious agents (germs) live (e.g., sinks, surfaces, human skin)
- **Susceptible Person** with a way for germs to enter the body
- **Transmission:** a way germs are moved to the susceptible person

Patient:

Definition als Zusammenfassung aus den untenstehenden Quellen:

Ein Patient ist eine Person, die von professionellen Gesundheitsdienstleistern betreut wird, die Symptome von Krankheiten oder Verletzungen aufweist oder andere Einschränkungen der vollständigen Gesundheit zeigt.

Nach der Definition kann eine gesunde Person („asymptomatisch“) ohne medizinische Probleme nicht als "Patient" bezeichnet werden.

Wikipedia:

Als **Patient** bzw. **Patientin** (aus lateinisch *patiens* ‚leidend, erdulden‘, Partizip Präsens Aktiv von *pati* ‚leiden, erdulden‘) wird ein Mensch bezeichnet, der ärztliche Dienstleistungen oder Dienstleistungen anderer Personen, die eine Heilbehandlung durchführen, in Anspruch nimmt. Dabei kann es sich um die Vorbeugung, Feststellung oder medizinische Behandlung von Krankheiten oder Folgen eines Unfalls handeln.

Im Englischen Wikipedia noch:

Das Wort Patient bedeutete ursprünglich "jemand, der leidet". Dieses englische Substantiv stammt vom lateinischen Wort *patiens* ab, dem Partizip Präsens des Deponens *patior*, was "ich leide" bedeutet, und ist mit dem griechischen Verb πάσχειν (= *paskhein*, leiden) und dem verwandten Substantiv πάθος (= *pathos*) verwandt.

Im Original:

The word **patient** originally meant 'one who suffers'. This English noun comes from the Latin word *patiens*, the present participle of the deponent verb, *patior*, meaning 'I am suffering,' and akin to the Greek verb πάσχειν (= *paskhein*, to suffer) and its cognate noun πάθος (= *pathos*).

Medicine net:

<https://www.medicinenet.com/patient/definition.htm>

Patient: Eine Person, die medizinisch versorgt wird. Die Person kann auf diese Versorgung warten, sie kann sie erhalten oder sie kann sie bereits erhalten haben. Über die genaue Bedeutung des Begriffs "Patient" herrscht große Uneinigkeit.

- Er wird unterschiedlich definiert, zum Beispiel als:
- Eine Person, die medizinische Versorgung benötigt.
- Eine Person, die medizinisch oder zahnmedizinisch versorgt oder behandelt wird.
- Eine Person, die wegen einer bestimmten Krankheit oder eines bestimmten Zustands von einem Arzt behandelt wird.
- Eine Person, die auf eine medizinische Behandlung oder Pflege wartet oder sich einer solchen unterzieht
- Eine Person, die benötigte professionelle Dienstleistungen erhält, die von einem zugelassenen Heilpraktiker zur Erhaltung, Verbesserung oder zum Schutz der Gesundheit

oder zur Linderung von Krankheit, Behinderung oder Schmerzen erbracht werden. (US Centers for Medicare & Medicaid Services)

- Ein kranker, verletzter oder verwundeter Soldat, der von medizinisch ausgebildetem Personal medizinisch versorgt oder behandelt wird. (US Army Medical Command)

Vom lateinischen Verb "patior", das "leiden" bedeutet, sowohl im Sinne von Schmerz empfinden als auch im Sinne von Nachsicht. Die beiden Verwendungen des Wortes "geduldig" - als Substantiv, das "jemand, der leidet" bezeichnet, und als Adjektiv, das "mit Nachsicht ertragen" bedeutet - gehen also auf denselben Ursprung zurück.

Im Original:

Patient: A person under health care. The person may be waiting for this care or may be receiving it or may have already received it. There is considerable lack of agreement about the precise meaning of the term "patient."

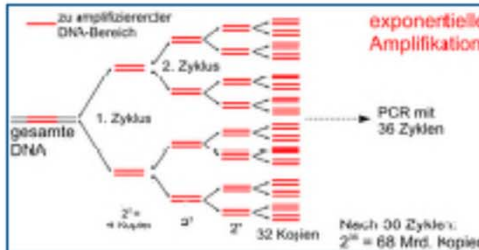
It is diversely defined as, for examples:

- A person who requires medical care.
- A person receiving medical or dental care or treatment.
- A person under a physician's care for a particular disease or condition.
- A person who is waiting for or undergoing medical treatment and care
- An individual who is receiving needed professional services that are directed by a licensed practitioner of the healing arts toward maintenance, improvement or protection of health or lessening of illness, disability or pain. (US Centers for Medicare & Medicaid Services)
- A sick, injured or wounded soldier who receives medical care or treatment from medically trained personnel. (US Army Medical Command)

From the Latin verb "patior" meaning "to suffer" both in the sense of feeling pain and in the sense of forbearance. Thus, the two uses of the word "patient" -- as a noun denoting "someone who suffers" and as an adjective meaning "to bear with forbearance" -- stem from the same origin.



Polymerase-Kettenreaktion

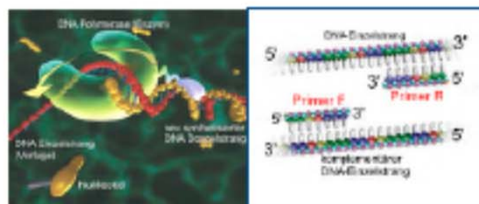


Polymerase-Kettenreaktion (PCR)?

Mit PCR (engl. polymerase chain reaction) wird ein vorbestimmter Abschnitt einer Erreger-DNA vervielfältigt. Als «Kopiermaschine» braucht es ein Enzym namens **Polymerase**, welches in einer Kettenreaktion aus sich wiederholenden Temperatur-Zyklen den gewünschten DNA-Abschnitt immer wieder verdoppelt und so eine messbare DNA-Menge generiert.

Vorteile: In 45 min können in einem Volumen von 20-50 µl bis zu zehn Erreger nachgewiesen werden.

Nachteile: Es können nur Erreger nachgewiesen werden, deren Gen-Sequenz bekannt ist. Ob ein Erreger infektiös (virulent, «lebendig») ist oder nicht bleibt unbekannt.



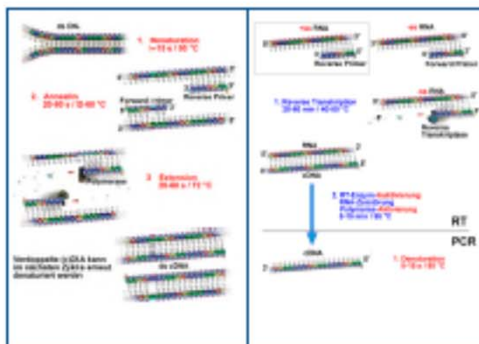
DNA-Polymerase und Oligonukleotide

Für die Vervielfältigung der DNA (**Amplifikation**) wird das Enzym **DNA-Polymerase** benötigt. Als Vorlage dient ein DNA-Einzelstrang des nachzuweisenden Erregers. Die passenden Nucleotide (dNTPs) werden durch die DNA-Polymerase zum Komplementärstrang verbunden.

Die DNA-Polymerase bindet aber nur dort an den DNA-Einzelstrang, wo eine kurze Doppelstrangstruktur als Startpunkt vorliegt. Dieser wird in der PCR mit der Zugabe von **Primer** bestimmt, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt definieren.

Ein Primer ist ein kurzes DNA-Stück bestehend aus 15-30 Nucleotiden, ein so genanntes **Oligonukleotid**. Für beide komplementären DNA-Einzelstränge des Erregers wird je ein Primer (Forward (F) & Reverse (R)) mit Hilfe von Software festgelegt.

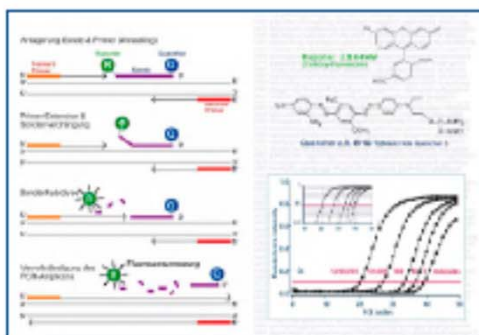
Die dazu benötigte DNA-Sequenz des nachzuweisenden Erregers wird im Internet aus öffentlichen Datenbanken kopiert. Die Oligonukleotide werden über Internet bei spezialisierten Firmen bestellt und synthetisiert.



PCR & RT-PCR – Die Kettenreaktion

Die PCR besteht aus einer Serie (Kettenreaktion) von 30 bis 45 Temperatur-Zyklen und wird in einem Thermocycler durchgeführt. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

- **Denaturierung:** Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA auf 95 °C erhitzt um die Stränge zu trennen. Es stehen zwei Vorlagen (Matrizen).
 - **Annealing (Anlagerung):** Die Temperatur wird Primer-abhängig gesenkt damit sich die spez. Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern können.
 - **Extension (Elongation):** Die DNA-Polymerase bindet bei 60°C an die kurzen doppelsträngigen Bereiche und repliziert den komplementären Strang.
- Da die Genome vieler Virenarten aus RNA bestehen, muss diese für die PCR zuerst in DNA umgeschrieben werden. Dieser Vorgang wird **Reverse Transkription (RT)** genannt und kann im selben Ansatz der PCR vorgeschaltet werden.



Quantitative real-time PCR

Bei der real-time PCR findet zusätzlich eine **Quantifizierung** des amplifizierten DNA-Abschnittes statt. Dazu werden nach jedem PCR-Zyklus **Fluoreszenz-Messungen** durchgeführt, wobei die Zunahme der kopierten DNA mit der Zunahme der Fluoreszenz korreliert.

Als Fluoreszenz-Quelle können DNA-Farbstoffe (z.B. **SYBR Green**) verwendet werden, welche nur mit doppelsträngige DNA interkalieren (binden). Nach Anregung kann deren zunehmende Fluoreszenz gemessen werden. Es kann jedoch nicht zwischen spez./unspez. PCR-Produkten unterschieden werden.

Eine spezifischere Methode beruht auf den Zusatz einer zwischen den Primer liegenden Sonde (z.B. **TaqMan**). Diese ist an den Enden mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (R), und einem Fluoreszenz-absorbierenden Quencher (Q) markiert.

Durch Verwendung einer speziellen DNA-Polymerase mit **5'-3'-Exonuklease-Aktivität**, wird die Sonde während der Synthese des Gegenstranges vom 5'-Ende her abgebaut, wodurch Quencher und Fluorophor voneinander entfernt werden. Die steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden.

VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit

It has a detection limit of ≥ 10 RNA copies per reaction for *ORF1ab* and *N* genes (Figures 1 and 2).

Dieser Test hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 RNA Kopien je Reaktion für die ORF 1ab und N Gene (Abbildungen 1 und 2)

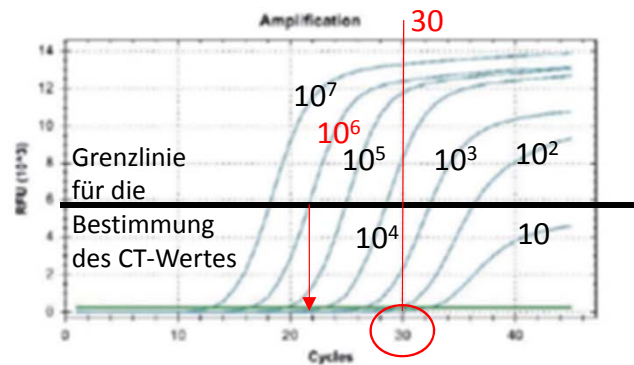


Figure 1.

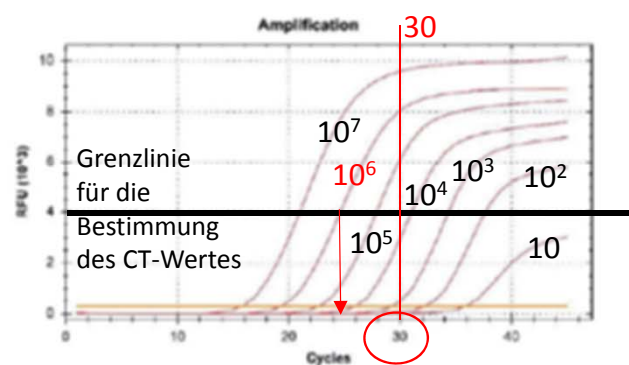


Figure 2.

Figure 1. Dilution series of ORF1ab gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (FAM channel).

Figure 2. Dilution series of N gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (ROX channel).

Für diesen Typ des Viasure-Testkits können bei einer CT von 30 (roter Kreis, Maximum des CT – Wertes gemäß den Angaben im schriftlichen Gutachten) weniger als 10^4 RNA-Kopien mit dem Zielgen ORF1ab (Abbildung 1) und weniger als 10^5 Genomkopien mit dem N-Gen (Abbildung 2) nachgewiesen werden.

Laut RKI entsprechen mindestens 10^6 RNA-Kopien/ml einer plausiblen Korrelation mit einer Infektiosität (Nachweis von infektiösem Virus in Zellkultur).

Diese Kopienanzahl wird hier bei einem CT von weniger als 22 für das ORF1ab-Gen (Abbildung 1, Pfeil) und weniger als 25 für das N-Gen (Abbildung 2, Pfeil) gesehen.

Ein CT von 30 oder höher als Kriterium für "Infektiosität" ist also weit jenseits der realen Grenze UND der Testspezifikationen, dies ist bei allen kommerziellen Testkits vergleichbar

SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics

Olha Puhach¹, Benjamin Meyer² & Isabella Eckerle^{1,3,4}✉

Abstract

SARS-CoV-2 viral load and detection of infectious virus in the respiratory tract are the two key parameters for estimating infectiousness. As shedding of infectious virus is required for onward transmission, understanding shedding characteristics is relevant for public health interventions. Viral shedding is influenced by biological characteristics of the virus, host factors and pre-existing immunity (previous infection or vaccination) of the infected individual. Although the process of human-to-human transmission is multifactorial, viral load substantially contributed to human-to-human transmission, with higher viral load posing a greater risk for onward transmission. Emerging SARS-CoV-2 variants of concern have further complicated the picture of virus shedding. As underlying immunity in the population through previous infection, vaccination or a combination of both has rapidly increased on a global scale after almost 3 years of the pandemic, viral shedding patterns have become more distinct from those of ancestral SARS-CoV-2. Understanding the factors and mechanisms that influence infectious virus shedding and the period during which individuals infected with SARS-CoV-2 are contagious is crucial to guide public health measures and limit transmission. Furthermore, **diagnostic tools to demonstrate the presence of infectious virus from routine diagnostic specimens are needed.**

Sections

Introduction

Measuring SARS-CoV-2 viral load

Viral load and shedding dynamics

SARS-CoV-2 transmission

SARS-CoV-2 diagnostics in public health

Conclusions

¹Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland. ²Centre for Vaccinology, Department of Pathology and Immunology, University of Geneva, Geneva, Switzerland. ³Geneva Centre for Emerging Viral Diseases, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland. ⁴Division of Infectious Diseases, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland. ✉e-mail: Isabella.Eckerle@unige.ch

Introduction

At the end of 2019, a novel coronavirus emerged, later termed severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which is the causative agent of coronavirus disease 2019 (COVID-19). SARS-CoV-2 primarily targets multiciliated cells in the upper respiratory tract (URT), but was also reported to infect cells outside the URT¹. It can spread to the lower respiratory tract (LRT), where it infects alveoli, leading to reduced gas exchange, inflammation and pulmonary pathologies that are typical of COVID-19 (ref.²). Individuals who are infected shed the virus through the URT, with emission of infectious virus leading to secondary transmission and thus further spread of the virus.

Because of their nonspecific clinical presentation, precise diagnostic tools are needed to identify SARS-CoV-2 infections. Specific real-time PCR (RT-PCR) assays were quickly available after the emergence of the virus, later followed by antigen-detecting (rapid) diagnostic tests (Ag-RDTs) and serological assays. **Although detection of viral RNA in respiratory specimens by RT-PCR is highly sensitive and specific, it does not distinguish between replication-competent virus and residual RNA.** In the absence of a diagnostic test, infectiousness is often established using one of two proxies: the presence of viral RNA above a defined **cycle threshold (Ct) value**, or a positive Ag-RDT. RT-PCR is a useful tool for initial diagnosis, whereas Ag-RDTs can serve as an indicator for ending the isolation period. **This is because viral RNA (which would be picked up by RT-PCR) remains detectable in the absence of infectious virus,** whereas positivity of Ag-RDTs better correlates with the presence of infectious virus.

Aside from the respiratory tract, SARS-CoV-2 RNA has been detected in peripheral blood, stool, urine and ocular secretions^{3–7}. Virus isolation from non-respiratory specimens was unsuccessful in most studies^{4,8,9}, with very few reported cases of infectious virus presence in non-respiratory specimens^{10–13}. Furthermore, viral loads from respiratory tract samples were found to be much higher than from other materials, the latter often with RNA viral loads that are incompatible with the presence of infectious virus. Such specimens are not considered relevant for transmission and therefore, we concentrate on SARS-CoV-2 virus shedding only through the respiratory tract.

Here, we elucidate the relationship between SARS-CoV-2 viral load and infectious virus presence, the biological and host factors that determine infectious virus shedding, measurement of infectious virus and the role diagnostics can have as a proxy for infectious virus shedding.

Measuring SARS-CoV-2 viral load

The gold standard for laboratory diagnosis of a respiratory tract infection is demonstration of viral RNA with a virus-specific (semi-)quantitative RT-PCR from material collected from the respiratory tract. The most commonly used materials are swab specimens from the nasopharynx or oropharynx, but swabs of the nasal cavity, saliva or gargled liquid solution have also been suggested as alternative materials, with the advantage of being a less uncomfortable procedure for the participant. Viral load as determined by RT-PCR is either expressed as the number of viral RNA copies per millilitre of viral transport medium or per swab, or by the arbitrary test-specific Ct value. By contrast, infectiousness is determined by qualitative or quantitative assessment of infectious virus in a clinical specimen by replication of virus in cell culture. The limitations to measuring viral shedding are described in Box 1. In this Review, we refer to viral particles that can cause infection as infectious virus, and to viral RNA levels (which are widely used as surrogates for infectious virus) as viral load.

Detection of infectious virus

The gold standard for determining the presence of infectious (that is, replication competent) virus in respiratory specimens is the recovery of virus in cell culture, a procedure that is commonly termed virus isolation (Fig. 1).

In the case of SARS-CoV-2, various cell lines and primary cells can be used for virus isolation, including those that express angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2; the receptor required for virus entry) or transmembrane protease 2 (TMPRSS2; which is also important for virus entry)¹⁴. A cell line derived from African green monkey kidney cells, Vero E6, is commonly used for virus isolation, propagation and titration¹⁵. Other human cell lines that have been successfully used for SARS-CoV-2 isolation are a colorectal adenocarcinoma cell line (Caco-2), a lung adenocarcinoma cell line (Calu-3), a lung adenocarcinoma cell line ectopically overexpressing ACE2 (A549) and a human hepatocellular carcinoma cell line (Huh7)^{16,17}.

The presence of infectious virus in the cell culture is qualitatively assessed using light microscopy, which can be used to identify cells undergoing the cytopathic effects (and death) caused by SARS-CoV-2 infection, consisting of syncytium formation, cell rounding, detachment and degeneration¹⁷. Infection is usually confirmed by a second method, either by a specific RT-PCR for viral RNA from the supernatant of infected cells, indicating virus replication by an increase of viral load over time in comparison to the baseline sample, or by immunostaining for viral proteins^{15,18}.

This qualitative measurement of virus presence cannot, however, quantify the infectious virions in the inoculated specimens, although samples with lower viral load commonly show delayed development of a cytopathic effect¹⁹. Instead, methods such as plaque assays, focus-forming assays or 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) can be used to quantify infectious virus in a patient sample.

The above methodologies are reliable tools to detect infectious virus in clinical specimens of individuals who are infected with SARS-CoV-2, although there are limitations. Detection of viable virus particles is highly influenced by the quality of the sample, and infectious viral particles can quickly lose their infectiousness in unsuitable storage conditions. To preserve infectious virus in specimens, swab samples from patients infected with SARS-CoV-2 should be immediately submerged in a viral transport medium suitable for cell culture and stored at –80 °C as early as possible after collection. Prolonged exposure to higher temperatures or repeated freeze–thaw cycles can drastically influence the quality of the sample, leading to potentially complete loss of infectious viral particles. Therefore, many factors can influence the reproducibility of the results between different laboratories. Furthermore, cell lines used for isolation can show a high variability between laboratories even when they are presumably the same. Consumables used during cell culture, such as culture medium or additives such as fetal bovine serum and antibiotics, could potentially also impact virus isolation success. In human primary airway epithelial cells, which mimic the primary site of entry in the human respiratory tract, the probability of isolating infectious virus was reduced compared with that of Vero E6 cells, indicating that infectious virus determined using Vero E6 cells might be overestimated for assessing transmission risks *in vivo*²⁰.

Importantly, all cell culture work with SARS-CoV-2 is done under biosafety level 3 conditions, so only specially trained personnel in laboratories with advanced infrastructure can perform these experiments. Thus, detection of viable virus through virus isolation is not suitable for diagnostics and is restricted to research only.

Box 1

Limitations to measuring viral load

Specimen selection site

The anatomical site chosen to collect the swab specimen for detection of SARS-CoV-2 might influence viral load detection. Higher RNA viral load was reported from nasopharyngeal than oropharyngeal swabs^{28,124,181}. As a result, nasopharyngeal samples show the highest diagnostic accuracy compared with other upper respiratory tract samples¹⁸². Similarly, higher virus isolation success was reported from nasopharyngeal swabs than from saliva, nasal or sublingual swabs¹²⁴. However, another study found higher RNA viral loads in the throat and sputum than from nasal swabs³⁰. Two studies indicate that virus can be detected earlier in the throat²⁹ or saliva³³, but reaches significantly higher levels and remains detectable for longer in the nose^{29,33}. A meta-analysis, which evaluated different clinical sampling methods using nasopharyngeal swab as a reference, demonstrated that pooled nasal and throat swabs showed the best diagnostic performance¹⁸³. Notably, this analysis revealed higher heterogeneity of results in studies using nasal or saliva specimens than using pooled nasal and throat swabs¹⁸³.

The effect of the swabbing method (self-administered or performed by trained person) on measured viral loads cannot be overlooked: the sensitivity of antigen-detecting (rapid) diagnostic tests achieved by health-care professionals was higher than for self-tests^{57,184}.

Impact of individual infection kinetics

To date, there is a limited number of studies that describe the longitudinal dynamics of SARS-CoV-2 shedding^{29,33}. Most of the studies used only a single time point to collect respiratory swabs from individuals who were infected for measurement of viral load.

As a result, different times from symptom onset can be a confounding factor when comparing viral load between different patients, which might also explain the variation of available data on viral load.

Influence of epidemic period

RNA viral loads across the specimens collected at single time points were found to indicate the trajectory of the epidemic, as a high proportion of individuals who were recently infected with low cycle threshold values correlates with a higher reproduction number, indicative of a growing epidemic¹⁸⁵. Similarly, the rise and fall of RNA viral load correlated with the number of COVID-19 cases and hospital admissions across the population as it was identified using SARS-CoV-2 RNA measurement in wastewater samples¹⁸⁶. Moreover, variation in estimates of the mean incubation period was shorter before the epidemic peak in China than after the peak¹⁸⁷. Therefore, sampling at single time points can be biased by the epidemic period and might reflect more epidemiological dynamics than individual shedding kinetics.

Influence of SARS-CoV-2 variant of concern

Available data on SARS-CoV-2 variants of concern demonstrated that, although the overall pattern of viral load dynamics is conserved between the variants, infection with different SARS-CoV-2 variants of concern led to highly distinct infectious virus amounts and RNA viral loads^{25,86,87,90,92,94} and variations in SARS-CoV-2 incubation period¹¹³. Therefore, extrapolation of our understanding from shedding of current or earlier SARS-CoV-2 variants to newly emerged variants may be of only limited value.

Detection of RNA viral load

Techniques for detecting viral RNA by RT-PCR were quickly established at the beginning of the pandemic^{21,22} (Fig. 1). **The high specificity and sensitivity of RT-PCR make it the gold standard for diagnosing SARS-CoV-2 infections.** Quantitative RT-PCR assays provide a Ct value, which is inversely correlated with the concentration of the target viral RNA in the clinical sample (that is, the higher the value, the lower the target RNA in the sample). By using an external standard with a defined number of RNA copies, Ct values can be transformed into absolute viral RNA copy numbers or international units per millilitre of viral transport medium or per total swab.

Although RT-PCR cannot directly determine infectiousness owing to its inability to differentiate between replication-competent (infectious) virus and residual (non-infectious) viral RNA, a correlation between RNA viral load and the presence of infectious virus has been sought. Several studies have attempted to correlate the quantity of viral RNA with infectiousness by isolating virus across a range of Ct values. Indeed, there was a stepwise decrease in the probability of virus isolation with increasing Ct values in samples collected during the first 8 days post-onset of symptoms (dpos)^{18,23}. **However, other studies have found that the correlation between infectious virus and RNA viral load was low** and that viral load (or Ct values as a proxy) is only

a weak predictor of infectious virus presence in the first 5 dpos^{4,20,24,25}. Furthermore, when taking a certain Ct value or RNA copy number as a threshold, it is not possible to determine whether the RNA viral load is increasing or already decreasing; therefore, a low viral load could be measured at the end of infection or in the early (pre-)symptomatic phase before reaching peak viral load.

In a routine diagnostic context, analytical sensitivity and limits of detection may vary between the tests and laboratories where they are applied. **An analytical performance comparison between different RT-PCR assays showed variation between the measured Ct values and the detection rate²⁶.** Therefore, application of RNA standards and calculation of RNA genome copy number based on a standard curve can improve comparability between laboratories and assays. To facilitate easier calibration and control of nucleic acid amplification techniques, **an international standard with assigned potency in the form of an inactivated SARS-CoV-2 isolate was introduced by the World Health Organization (WHO)²⁷.**

As with the detection of infectious virus, several other parameters can influence whether viral load can be detected. The site of specimen collection can impact the findings on viral load; although some studies report higher RNA viral load in nasal or nasopharyngeal swabs^{28,29}, others show higher RNA viral load in throat samples³⁰. Moreover, the transport

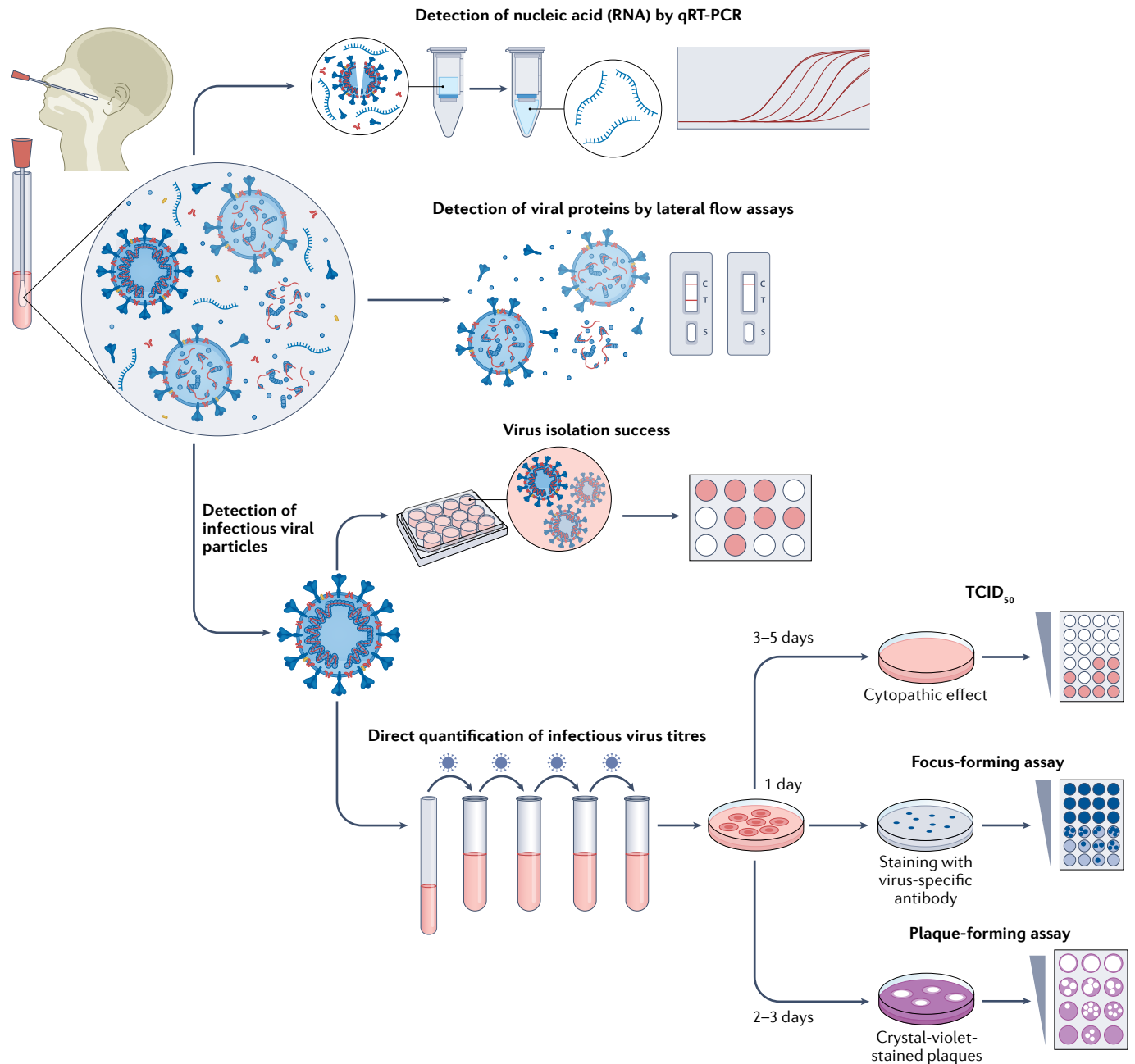


Fig. 1 | Methods to measure infectious virus and RNA viral load. Swab specimens from the nasopharynx or oropharynx are used for detection of SARS-CoV-2 viral loads. Detection of viral nucleic acids (RNA) is performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Viral RNA is extracted from lysed virus, reverse transcribed and amplified by qPCR using primers specific for one or more target regions in the viral genome. The amplification cycle at which samples cross the threshold (cycle threshold) defines the amount of viral RNA. RNA viral load can be expressed as the number of viral RNA copies per millilitre, or by the arbitrary test-specific cycle threshold value. Lateral flow assays detect the presence of specific viral proteins in the lysed viral particles. SARS-CoV-2 nucleocapsid is used in most antigen-detecting (rapid) diagnostic tests. The presence of infectious (replication-competent) virus in respiratory specimens can only be determined by the recovery of virus in cell culture by isolation or by quantification of infectious virus titres using 50% tissue culture infectious

dose (TCID₅₀), focus-forming assays or plaque-forming assays. Virus isolation is performed by applying infectious medium on the monolayer of cells; isolation success is determined by the presence of a cytopathic effect approximately 3–5 days post-infection. White colour indicates the presence of a cytopathic effect in cells. For quantification of infectious virus titres, serial dilutions of respiratory samples are performed and used for inoculation on the monolayer of cells. In TCID₅₀, 3–5 days post-infection, viral-induced cytopathic effect is classically defined using microscopy. In focus-forming assays, cells are fixed 1 day post-infection and immunostaining with virus-specific antibodies is performed to detect groups of infected cells (foci). The foci, indicating the presence of infectious virus, are displayed in blue. In plaque-forming assays, plates are fixed 2–3 days post-infection and stained with crystal violet; wells with individual plaques are used to determine viral titres. The plaques, indicating the presence of infectious virus, are displayed in white.

media used for the sample, storage condition and quality of the sample may further influence the detection of viral RNA and their usefulness and limitations when extrapolating to potential infectiousness.

Although new variants have impacted some gene targets, in most instances, they did not have a major effect on molecular diagnostics, owing to the use of dual-target assays (in which at least two viral genes are detected simultaneously)³¹.

Antigen-detecting rapid diagnostic tests

Most lateral flow tests are designed to detect SARS-CoV-2 nucleocapsid protein, as a proxy for infectious virus, in nasal or nasopharyngeal swabs^{32–36} (Fig. 1). **Indeed, most studies on Ag-RDT detection show good concordance with RT-PCR positivity when Ct values are below 25–30, a viral load compatible with the presence of infectious virus**, whereas higher Ct values give less reliable results^{34,37–41}.

Early time points during infection often give negative results with Ag-RDT in individuals who have tested positive by PCR^{29,42}. On average, the first positive Ag-RDT results are obtained about 1–2 days later than positive PCR results³⁷, whereas the highest sensitivity in patients was shown during the first 7 dpos in the studies with ancestral SARS-CoV-2 (refs.^{42–44}). Antigen tests show highest sensitivity for specimens containing infectious virus and with Ct values below 25 (refs.^{45–49}), and their positivity highly correlates with the presence of infectious virus^{34,45,47,50}. By contrast, Ag-RDTs are less sensitive to low RNA viral loads (which have higher Ct values)⁵¹. Several studies have demonstrated a strong correlation between Ag-RDT positivity and the period in which infectious virus can be detected, indicating that Ag-RDTs can add an additional safety layer for deciding when to end isolation^{29,39}.

However, some inconsistencies between studies and tests have been noted. For instance, there have been reports (across a range of studies and Ag-RDTs) of failure to detect viral antigens in specimens with a low Ct value and/or containing infectious virus (beyond the early acute phase)^{46,50}. Moreover, there are seldom reports of Ag-RDTs remaining positive after more than 10 dpos^{42,46,50}. As most studies failed to isolate infectious virus after more than 10 dpos, it remains unclear whether Ag-RDT positivity beyond 10 dpos correlates with infectious virus shedding. One study showed that antigen tests predict infectiousness more accurately at 1–5 dpos, than at 6–11 dpos⁵². Notably, there was a good correlation between Ag-RDT positivity and infectious virus isolation within the first 11 dpos⁵².

Conflicting results were found for sensitivity and specificity of Ag-RDTs for detection of SARS-CoV-2 variants, with large variations between manufacturers, the type of setting in which the Ag-RDTs were used (self-tests versus tests collected by a health-care professional) and the type of sample used for detection (nasal versus oral)^{53–57}. With increasing hybrid immunity and the presence of mucosal antibodies, Ag-RDTs may further lose sensitivity⁵⁸.

Viral load and shedding dynamics

Viral loads are used as a proxy to characterize infectious viral shedding. The exact time for which individuals remain infectious is laborious to estimate and is likely to vary between patients. Viral factors, such as viral variant, and host factors, such as patient age and sex and immune status, influence shedding dynamics.

Viral load as a key determinant of viral shedding

After the emergence of SARS-CoV-2 in late 2019, the first details on viral load and infectious virus shedding were measured in a cluster of infections that occurred in January 2020 in Germany, assessing

nine immunocompetent individuals with a mild course of disease⁴. Peak RNA viral loads were reached in the early symptomatic period at 5 dpos, a finding that was confirmed by other studies reporting peak viral loads at the time of symptom onset or even shortly before^{4,7,28,59}. RNA viral loads gradually declined over the course of the disease in the nasopharyngeal and throat swabs, reaching low or undetectable levels 2 weeks after symptom onset^{4,23,59,60} (Fig. 2). Declining RNA viral load is associated with resolution of clinical symptoms and gradual increase in antibody titres, for both binding and neutralizing antibodies^{18,23}. However, ongoing detection of viral RNA has been described for prolonged periods up to 28 dpos in otherwise healthy individuals⁶¹, and some studies have reported low-level detection of RNA by RT-PCR even for months⁶². Participants who continue to shed viral RNA for more than 4 weeks after initial detection by RT-PCR represent a minority of non-severe cases, estimated to be around 3%⁶³, 14%⁶⁴ or less than 20%⁶⁵.

Infectious virus shedding of the ancestral SARS-CoV-2 strain, as determined by virus isolation in cell culture, was reported to correlate with high RNA viral load in the early acute phase after symptom onset²³. Importantly, daily longitudinal sampling of respiratory specimens from individuals with mild disease or asymptomatic infection revealed that infectious virus can already be detected before the onset of symptoms³³. Successful infectious virus isolation was reported within the first 8–10 dpos, but culture probability after this time period rapidly declined^{4,7,23,29,66,67}. Studies that assessed infectious virus quantitatively found that infectious virus titres declined over the first 10 dpos^{25,29}. In addition, a reduced chance of virus isolation coincided with the time of seroconversion in hospitalized patients and, as a result, infectious virus could no longer be isolated from seroconverted patients with detectable antibody titres^{18,68,69}. Although similar seroconversion studies performed on mildly symptomatic patients are missing, the number of immunologically naive individuals is declining and this broadly existing underlying immunity makes such an assessment more complex.

Most studies on infectious virus shedding in the acute symptomatic period were on immunocompetent patients that had mild-to-moderate disease, representing the majority of COVID-19 cases in the community. Therefore, the assessment of the presence of infectious virus in the URT from those studies was used to define the duration of the period of infectiousness and contributed to best public health practices for isolation and quarantine^{62,70}. Although the pattern of infection is broadly similar in patients with mild and severe disease, key differences do exist. The first week of illness is comparable in terms of RNA viral load between patients with mild and severe disease. However, patients with severe disease have elevated RNA viral loads in the second week of illness, and RNA was detected for prolonged periods⁷¹. Moreover, infectious virus was recovered from hospitalized patients for prolonged periods of up to 32 dpos^{18,72,73}; however, the median time from symptom onset to viral clearance in culture was similar to that of patients with mild or moderate disease^{18,73}. Severe COVID-19 is also characterized by high and persistent RNA viral load in the LRT, whereas non-severe cases have similar viral loads in the URT and LRT⁷⁴.

Prolonged detection of viral RNA was also reported in immunocompromised patients; for example, 224 days after the beginning of the infection, virus was still detected in a man infected with HIV, including the detection of subgenomic RNA (sgRNA) indicating active viral replication⁷⁵. Also, infectious virus was recovered up to 61 dpos in nasopharyngeal swabs collected from immunocompromised patients⁷⁶, and low RNA viral loads were still detected at 60 dpos in another study⁷⁷. Infectious virus was isolated from bronchoalveolar fluids from patients receiving chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy

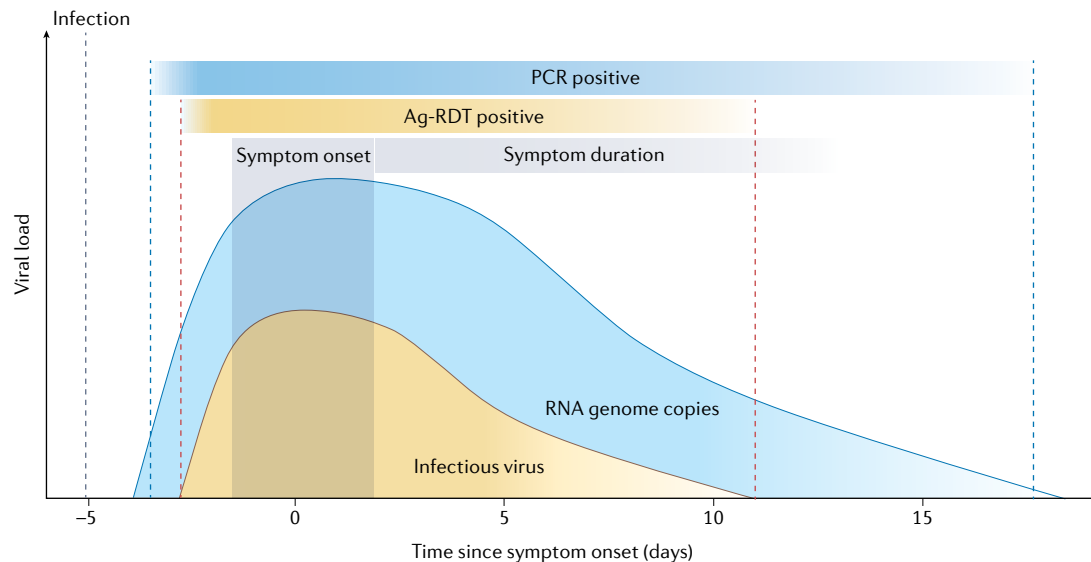


Fig. 2 | Kinetics of RNA viral loads and infectious virus for ancestral SARS-CoV-2 in patients with mild-to-moderate disease. According to different studies, the incubation period for ancestral SARS-CoV-2 was estimated to lie between 4.6 and 6.4 days. On average, symptoms continue to persist for 10 days. RNA can already be detected before the onset of symptoms; RNA levels peak around the onset of symptoms and then gradually decline. Median clearance for RNA viral load is 16 days post-onset of symptoms. Infectious virus titres are highest around symptom onset, and infectious virus can be isolated up to 8 or 10 days post-onset of symptoms. RNA can be detected for prolonged periods

by real-time PCR, when infectious virus is no longer detectable, whereas virus detection by antigen-detecting (rapid) diagnostic tests (Ag-RDTs) was shown to be a better correlate for infectiousness. Gradients reflect variability between individuals (lighter shade towards the end of infection shows that viral loads continue to be detected in some but not all individuals). The grey dashed line marks the initial infection, the blue dashed lines mark the PCR-positive period and the red dashed lines mark Ag-RDT positivity. Details of the underlying studies used to generate Fig. 2 can be found in Supplementary Table 1.

up to 28 days after admission to an intensive care unit⁷⁸. A case report on an immunocompromised patient showed isolation of infectious virus up to 78 dpos⁷⁹. The reports of infectious virus isolation from severely ill or immunocompromised patients are limited (owing to the low number of patients), so it is difficult to define the proportion of cases with prolonged shedding.

The characteristics of viral shedding of other respiratory viruses are outlined in Box 2.

Viral shedding of SARS-CoV-2 variants

Viral evolution of SARS-CoV-2 over time has led to the emergence of numerous variants. Combined with increasing population immunity due to vaccination or natural infection, this has led to a need to reassess our knowledge of viral shedding patterns.

The WHO designated variants as variants of concern (VOCs) if they were associated with one or more of the following: elevated transmissibility or a detrimental change in COVID-19 epidemiology; increased virulence or a change in clinical disease presentation; or decreased effectiveness of public health measures or available diagnostics, vaccines or therapeutics⁸⁰. To date, five VOCs are recognized: Alpha, Beta, Gamma, Delta and Omicron. In contrast to ancestral SARS-CoV-2, VOCs display some differences in evasion from immunity, viral loads, shedding period or even incubation period, resulting in drastically different levels of transmission^{81–85} (Fig. 3).

All VOCs have shown changes in viral load compared with ancestral SARS-CoV-2. One study reported that infection with Alpha leads to approximately tenfold higher RNA viral load and an increased probability of cell culture isolation compared with the ancestral virus⁸⁶.

However, another study did not find a substantial difference in the infectious virus titre between Alpha and ancestral SARS-CoV-2 (ref.³³). Delta reportedly led to an even higher increase in RNA viral load: one study reported a 1,000× increase relative to the ancestral virus⁸⁷, and other studies reported 1.7× (ref.⁸⁸) or 6.2× higher⁸⁹ viral load than Alpha. Furthermore, Delta demonstrated elevated probability of cell culture isolation⁹⁰ and higher infectious virus titres than Alpha⁹¹. Although Omicron was shown to be highly transmissible, lower RNA viral loads⁹², lower cell culture isolation probability⁹³ and lower infectious virus titres²⁵ were observed in patients infected with Omicron BA.1 than in those infected with Delta. Even within the Omicron clade, there are differences between sub-lineages, with infection with Omicron BA.2 leading to higher levels of RNA viral loads and longer time to viral clearance than with Omicron BA.1 (refs.^{94–96}).

Similarly, VOCs have shown differences in the duration of viral shedding. Analysis of Ct values in respiratory specimens found that Delta showed longer persistence of viral RNA than ancestral SARS-CoV-2 (ref.⁹⁷). Another study demonstrated that there was not significant difference in the mean duration of viral RNA presence in Delta and Omicron BA.1 infections⁹². The duration of infectious virus shedding appears to be similar to that observed with ancestral SARS-CoV-2, with culturable virus obtained at 5 dpos⁸⁵ and no replication-competent virus isolated beyond 10 dpos in patients infected with Delta and Omicron BA.1 (refs.^{84,98}). It is important to note that pre-existing immunity to SARS-CoV-2, either from infection or vaccination, might influence the duration of infectious virus shedding (alongside immune status and disease severity, as discussed above), which may have driven some of these differences during the course of the pandemic.

Influence of age and sex on viral shedding

There is some evidence that age-associated and sex-associated differences in innate and adaptive immunity, as well as higher ACE2 expression in adults than in children, result in an increased risk for severe disease in older male patients^{99–101}. Moreover, a few studies have found that age and sex influence viral loads and shedding dynamics. In cases of infection with ancestral SARS-CoV-2, resolution of RNA shedding was faster in participants <18 years of age and slower in participants >50 years of age⁶¹. According to one study, viral RNA can be detected for longer times in male patients infected with ancestral SARS-CoV-2 (ref.¹⁰²), and RNA viral loads were elevated in male patients infected with either Alpha or Delta variants compared with female patients⁸⁸. However, a possible association of viral load dynamics with age or sex is highly debated, as other studies demonstrated that they have no influence on infectious virus²⁵ or RNA viral loads⁵⁹.

Early studies in ancestral SARS-CoV-2 did not find a difference in virus isolation success¹⁰³ or RNA viral loads between children and adults^{104–106}, but sample sizes were small. Slightly lower RNA viral loads and a more rapid clearance of viral RNA was observed in children than in adults when analysing much larger cohorts, whereas the patterns of shedding curves over time were similar between children and adults¹⁰⁷. Furthermore, large-scale analysis of viral loads across different age groups showed no differences of distribution of RNA viral load between children and adults¹⁰⁸ or only slightly lower viral loads (<0.5 log₁₀ units) in children <5 years of age⁸⁶.

Symptoms as a correlate for shedding

One of the key epidemiological parameters for SARS-CoV-2 transmission is the incubation period, defined as the time from exposure or infection to the onset of symptoms. Studies on ancestral SARS-CoV-2

Box 2

Shedding of respiratory viruses

The dynamics of viral shedding differs between respiratory viruses, which influences their transmission and has an effect on diagnostics and measures applied to contain the outbreaks.

SARS-CoV

The epidemic of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) started in November 2002 in the Guangdong province of China and rapidly spread outside China. The virus was airborne and could also be spread via droplets of saliva, but is only moderately transmissible among humans¹⁸⁸. Only low viral loads were detected in the early symptomatic period, generally peaking in the upper respiratory tract (URT) around 10–14 days post-onset of symptoms (dpos)^{189,190}, and then dropping to low levels at 3–4 weeks post-infection¹⁹¹. In patients infected with SARS-CoV, viral RNA was detectable for a maximum of 8 weeks in samples collected from the URT¹⁹¹ and for 52 days in sputum samples¹⁹², whereas infectious virus was isolated up to 28 dpos from stool and respiratory specimens and up to 36 dpos from urine samples^{191,193}. SARS-CoV replicated less efficiently at low temperatures; thus, virus replication was more efficient in the lower respiratory tract (LRT) than in the URT¹⁹⁴. Notably, asymptomatic or pre-symptomatic viral shedding and transmission were not recorded for SARS-CoV^{190,195}; the peaks of transmission occurred around 2 and 10 dpos¹⁹⁵. As a result, outbreaks were successfully contained through isolation of symptomatic patients infected with SARS-CoV, which reduced onward transmission¹⁹⁶.

MERS-CoV

Middle East respiratory coronavirus (MERS-CoV) was isolated from a patient with pneumonia in Saudi Arabia in 2012 and was shown to be the causative agent of a cluster of severe respiratory tract infections in the Middle East¹⁹⁷. The disease caused by MERS-CoV is characterized by a wide range of clinical severities and by predominantly respiratory symptoms, such as acute viral pneumonia, with a high case fatality ratio¹⁹⁸. The virus is capable of

airborne transmission and has low transmissibility among humans, with a maximum estimated reproduction number below 1 (ref.¹⁹⁸). Higher RNA viral loads were detected in the LRT than in the URT. Estimated mean shedding duration is 15.3 days in the URT and 16.3 days in the LRT⁶². Prolonged PCR positivity and higher RNA viral loads in the URT and LRT were associated with increased disease severity^{62,199}. Viral RNA was also detected in the urine, stool and serum²⁰⁰. One study reported detection of viral RNA in the blood for 34 days and showed that presence of viral RNA in the blood is associated with higher mortality²⁰¹; however, another study failed to isolate virus from PCR-positive serum samples²⁰⁰.

Influenza virus

In symptomatic patients, RNA viral loads start to be detectable by real-time PCR 2 days before the onset of symptoms and peak at 1 dpos²⁰². Human challenge trials with influenza A viruses show that viral loads already sharply increase at 1 day post-inoculation, reach a peak at 2 days post-inoculation and become undetectable at 8 days post-inoculation. The mean duration of viral shedding for influenza viruses is 4.8 days, and the maximum duration is between 6 and 7 days^{203,204}. Kinetics of infectious viral titres were similar to the viral load trends detected by real-time PCR for different strains of influenza²⁰⁵. Lower RNA viral loads and shorter infectious viral shedding were noted in asymptomatic patients²⁰².

Human respiratory syncytial virus

This virus is the most frequent causative agent of LRT infections, leading to morbidity and mortality particularly in young children and older adults²⁰⁶. The virus is transmitted by contact with nasal secretions or large aerosols. Viral loads and symptoms increased simultaneously, reaching a peak at 5.4 days²⁰⁷. In human challenge trials, respiratory syncytial virus titres were detectable for an average of 4.6 days. Viral RNA could be still detected up to 9 dpos, whereas infectious virus titres could be detected from 1 to 8 dpos in adults²⁰⁸ and up to 9 dpos in children²⁰⁹.

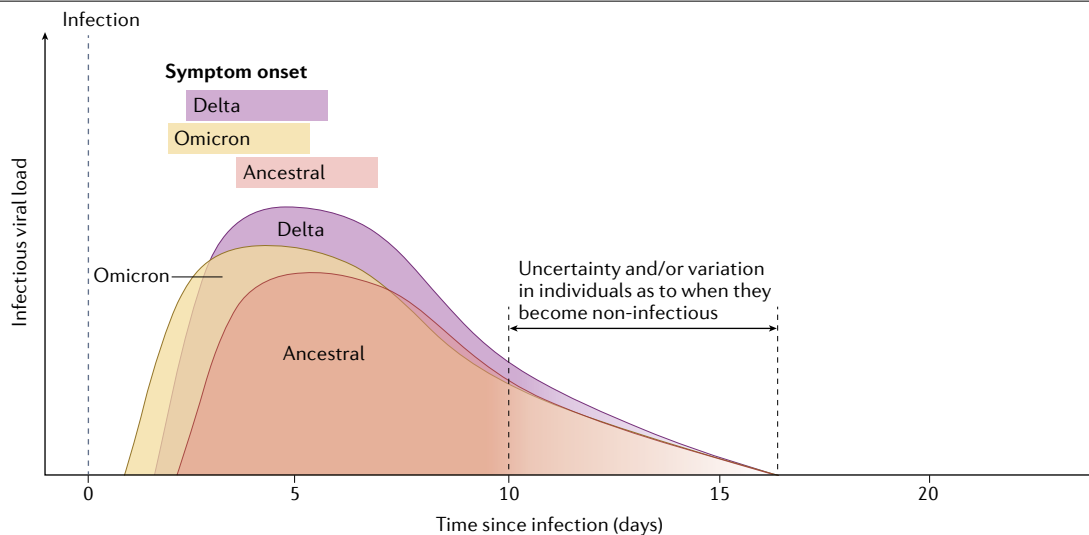


Fig. 3 | Infectious viral load and symptom onset in SARS-CoV-2 Delta and Omicron BA.1 variants of concern. Overall patterns of shedding dynamics are conserved between SARS-CoV-2 variants. In comparison to ancestral SARS-CoV-2, Delta and Omicron BA.1 have shorter incubation periods, estimated as approximately 3.7–4 days for Delta and approximately 3–3.4 days for Omicron BA.1. Higher infectious viral loads were detected in patients infected with Delta than in patients infected with Omicron BA.1 or ancestral SARS-CoV-2. Only

a limited number of studies have determined when virus shedding for Delta and Omicron BA.1 ends, so this time point is not well defined. Owing to the low number of studies comparing the end of the infectious period between different SARS-CoV-2 variants of concern, the end point of infectivity is not well defined (shown as a colour gradient). Details of the underlying studies used to generate Fig. 3 can be found in Supplementary Table 2.

have estimated that the incubation period on average is between 4.6 and 6.4 days^{59,109–111} (Fig. 2). A human challenge trial with ancestral SARS-CoV-2 demonstrated that symptoms start to appear 2–4 days after inoculation, and RNA viral loads reach their peak 4–5 days after inoculation²⁹. Thus, artificial inoculation of the virus confirmed the timing of peak viral loads observed in naturally infected individuals, whereas onset of symptoms was faster in the human challenge cases. In contrast to natural infection, in artificial inoculation, virus-containing drops with high viral load are directly applied in the nose and therefore reach the nasal epithelium more quickly, which might lead to the more rapid appearance of symptoms. For Delta, the estimated incubation period was between 3.7 and 4 days^{81–83,97}, whereas infection with Omicron BA.1 was characterized by an even shorter incubation period of 3–3.4 days^{83,112,113} (Fig. 3). However, as the time point of infection is rarely known outside of human challenge trials, dpos is most commonly used when analysing viral load and infectious virus.

Considering that high viral loads can be detected in the URT of infected individuals regardless of their clinical manifestations, the presence of symptoms is an unreliable indicator of infectiousness. Notably, individuals infected with SARS-CoV-2 can be infectious before the onset of symptoms⁵⁹, and it was estimated that about half of secondary transmissions take place in the pre-symptomatic phase^{59,114}. Moreover, according to population surveys, asymptomatic cases represent around 40% of all SARS-CoV-2 infections with ancestral SARS-CoV-2 (refs. ^{115–117}), and tracing of close contacts of confirmed cases of SARS-CoV-2 found that up to 23% of infections were asymptomatic¹¹⁸.

There are conflicting findings regarding viral shedding differences in symptomatic and asymptomatic patients. Comparison of viral loads between symptomatic and asymptomatic patients remains challenging, as the time of exposure cannot be clearly identified in asymptomatic individuals, and dpos cannot be used when comparing

viral loads with symptomatic individuals. Furthermore, individuals who do not show clinical symptoms at the time of testing can represent either true asymptomatic individuals or pre-symptomatic individuals who will develop symptoms later. Thus, only well-controlled studies with a follow-up of assessed individuals can make a clear distinction between pre-symptomatic and asymptomatic individuals. A study on ancestral SARS-CoV-2, which followed COVID-19 confirmed cases hospitalized for isolation and recorded symptoms daily, found similar initial Ct values between asymptomatic and symptomatic individuals¹¹⁹. Similarly, no significant difference in RNA viral loads between symptomatic and asymptomatic patients was found in other studies in which patients were followed longitudinally and the presence of symptoms was either monitored by health-care professionals¹²⁰ or was self-reported¹¹⁵. By contrast, other studies, in which symptoms were also recorded by clinicians, reported lower RNA viral loads in asymptomatic participants^{121,122}. In addition, one study found a faster clearance of viral RNA in asymptomatic than in symptomatic individuals¹²³, and another recorded a longer median duration of viral RNA shedding among asymptomatic patients¹¹⁹.

There are limited data regarding the presence of infectious virus in asymptomatic patients. One study showed lower virus isolation success from asymptomatic patients¹²⁴, but only a small number of patients were included. Therefore, more studies evaluating infectious virus in asymptomatic patients would help to elucidate the differences in their infectivity compared with symptomatic patients.

SARS-CoV-2 transmission

Viral loads have a key role in the SARS-CoV-2 transmission. As previously discussed, host (role of vaccination or previous infection) and viral factors (SARS-CoV-2 variants) greatly influence viral load dynamics and therefore further influence viral transmission.

Influence of viral load on transmission

SARS-CoV-2 can be transmitted via larger droplets and aerosols produced when breathing, speaking, sneezing or coughing and to a lesser extent also by contaminated surfaces. As an infection can only be induced by infectious viral particles and not by remnant RNA or protein alone, the presence of infectious SARS-CoV-2 is required for secondary transmission. Although transmission is a multifactorial process that is also influenced, for example, by environmental and behavioural factors (such as humidity, air quality, exposure time or closeness of contact), the viral load of SARS-CoV-2 in the URT is considered to be a proxy for transmission risk.

An epidemiological study that included viral load analysis found that viral load of an index case strongly correlates with onward transmission, with higher viral loads for ancestral SARS-CoV-2 presenting a greater secondary attack rate risk¹²⁵. In this study, viral load was identified as the main driver of transmission, with a more pronounced effect in household settings than in non-household settings (hospitals and nursing homes, among others). Transmission probability peaks around symptom onset, when infectious virus titres are estimated to be the highest during the course of infection. As viral load decreases with time, the probability of transmission also gradually declines in cases of infection with ancestral SARS-CoV-2 (ref.¹²⁶). On this note, a study of health-care workers infected with ancestral virus documented no transmission from index cases later than 6 dpos, which is in line with findings showing reduced virus isolation success towards the end of week 1 of symptomatic disease¹²⁷.

However, there are limitations when using viral load of an index case as a proxy for transmission. To date, the infectious dose of SARS-CoV-2 required to lead to a secondary transmission is not yet known, and the association between presence of infectious virus in the respiratory tract and infectiousness of the same individuals is poorly understood. In the only available human challenge trial that was conducted with ancestral SARS-CoV-2, an initial infectious dose of 10 TCID₅₀ did not lead to an infection in 16 of 36 participants²⁹. Other factors, such as symptoms, type of contact, protective measures, vaccination status and other host factors may have an additionally strong effect on transmission^{128–133}.

Viral load can markedly vary between individuals (as a result of individual susceptibility and of immunity from previous infections or vaccination), which leads to differences in their propensity to transmit the virus. Indeed, differences have been observed in the duration of infectious virus detection and in nasal and oral viral loads for both ancestral SARS-CoV-2 and Alpha³³. Inter-individual variability was suggested to have a role in the observed heterogeneity of viral load dynamics, as some early immune signatures were significantly associated with higher oropharyngeal RNA viral loads in patients¹³⁴. Therefore, observed heterogeneity between individuals has an important role in ongoing viral transmission³³.

Such differences can lead to heterogeneity in virus transmission. Modelling with ancestral SARS-CoV-2 and Alpha estimated that individuals who are highly infectious, known as superspreaders, shed 57-fold more virus over the course of infection than those with lowest infectiousness³³. By contrast, most patients with COVID-19 do not infect other individuals as they expel few to no viral particles from their airways¹³⁵. Indeed, only a minority (about 8%) of patients positive for SARS-CoV-2 infected with ancestral SARS-CoV-2 or Alpha have significantly higher infectious virus titres than the rest of the population (as shown in a study measuring virus isolation probability in a large cohort of patients)⁸⁶. Moreover, only 15%¹¹⁴ to 19%¹³⁶ of individuals that

were infected led to 80% of secondary transmissions of ancestral SARS-CoV-2. Similar trends were confirmed for Omicron BA.1 and BA.2, for which only 9%¹³⁷ to 20%¹³⁸ of the infectious contacts were responsible for 80% of all transmissions.

Superspreading events are therefore characterized by infectious individuals having close contact with a high number of susceptible individuals and by a higher probability of transmission per contact. Aside from biological factors influencing these events, sociobehavioural and environmental factors contribute to the likelihood of superspreading (for example, large indoor gatherings with poor ventilation and no other infection prevention measures). Moreover, particular locations can represent a higher risk of transmission (for example, many superspreading events take place in crowded indoor settings, such as cruise ships, family gatherings, parties, elderly care centres and hospitals)¹³⁹.

The role of pre-existing immunity on viral shedding and transmission

All currently licensed SARS-CoV-2 vaccines are administered intramuscularly, leading to a rise in serum antibodies and protection from severe disease and death due to COVID-19, but not to long-term protection from infection^{140–142}. The levels of circulating antibodies generated following vaccination decline over time, but can be elevated by a booster dose^{143,144}. Furthermore, currently available vaccines were developed against the ancestral SARS-CoV-2 strain using the spike protein of the first sequenced virus, and the degree of protection from severe disease against other genetic variants was shown to vary¹⁴⁵. Moreover, vaccination leads to limited induction of neutralizing antibodies on mucosal surfaces, which may have a role in mitigating virus replication and prevention of more pronounced disease^{146,147}. For instance, secretory component antibodies, which are specific to mucosal surfaces, were detected in the saliva in 58% of participants 2 weeks post-vaccination with mRNA vaccines in one study, but the levels were significantly lower than in convalescent participants, and their neutralizing capacity significantly decayed 6 months post-vaccination¹⁴⁸. A study on a small group of individuals uninfected or infected with Delta demonstrated that mucosal antibody responses induced by vaccination were low or undetectable, but breakthrough infections led to substantial increases of antibody titres in saliva¹⁴⁹. However, the role of pre-existing mucosal immunity on infectious virus shedding and the possible correlation between the mucosal antibodies and viral loads in humans has not been elucidated.

As a result of waning antibodies and the emergence of VOCs with immune-evading properties, breakthrough infections have been increasingly reported among vaccinated individuals, mainly since the emergence of the Delta and Omicron VOCs. It has been debated whether vaccination with current SARS-CoV-2 vaccines impacts viral load (and therefore shedding) in breakthrough infections. The effect of vaccination on viral load and shedding is therefore of interest as it would mean that vaccination not only protects the vaccinee but can also help to mitigate virus spread by reducing infectious virus titres or shortening infectious shedding periods, thus having an impact beyond protection of the individual.

Overall, vaccination has been found to lead to reduced viral load (Fig. 4), although this decreases with time. Vaccination with ChAdOx1 vaccine (the Oxford–AstraZeneca vaccine) or BNT162b2 (the Pfizer/BioNTech vaccine) leads to lower RNA viral loads in individuals infected with Alpha, but the effect was weaker for breakthrough infections with Delta^{150,151}. Immunization with BNT162b2 led to reduced RNA viral loads in Delta breakthrough infections, although this effect declined

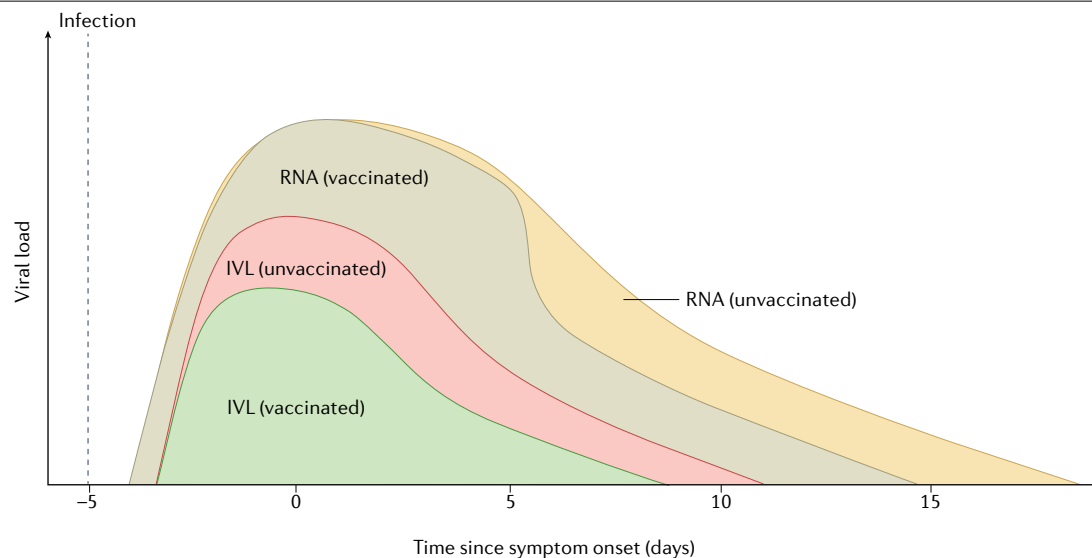


Fig. 4 | Influence of vaccination on viral load. Similar RNA viral loads were detected in vaccinated and unvaccinated patients infected with the Delta variant of concern during the first 5 days post-onset of symptoms. However, faster clearance of viral RNA was shown in vaccinated patients. Infectious viral loads (IVLs) were significantly lower in vaccinated individuals and declined

faster than in unvaccinated individuals infected with Delta. Dynamics of viral loads in vaccinated individuals may vary widely in case of infection with another variant. Details of the underlying studies used to generate Fig. 4 can be found in Supplementary Table 3.

2 months after vaccination and ultimately faded 6 months after vaccination¹⁵². Immunization with ChAdOx1 vaccine also led to a reduction of RNA viral load in breakthrough infections with Alpha VOC¹⁵³. Faster clearance of RNA viral loads was detected in the group of vaccinated patients who mostly received mRNA vaccines^{154,155}, and lower probability of isolation of infectious virus from patients vaccinated with mRNA or adenoviral vector vaccines was observed^{156,157}. Even though not all studies could demonstrate a reduction of RNA viral loads in Delta breakthrough infections^{150,154}, infectious virus titres were reported to be lower in individuals vaccinated with mRNA or adenoviral vector vaccines despite similar levels of viral RNA^{25,93,157}. Vaccination was also found to influence infectious virus isolation. Viable virus in cell culture was detected for significantly longer median time periods in unvaccinated patients infected with Delta than in vaccinated patients infected with Delta^{155,158}. **However, no significant differences in RNA viral loads were found between unvaccinated, fully vaccinated or boosted patients infected with Omicron BA.1 or BA.2 (refs. 93,159), whereas infectious virus titres, measured quantitatively at 5 dpos, were lower in Omicron BA.1 breakthrough infections only after a booster dose²⁵. Other studies showed that vaccination status did not influence infectious virus isolation success⁹³ or the time from initial positive PCR assay to culture conversion in patients infected with Omicron BA.1 (ref. 85).** These studies indicate that triple vaccination reduces infectious viral load but not the time period during which infectious virus can be isolated from Omicron breakthrough infections.

There are limited data on the effect of previous infection on viral shedding. A study performed on ancestral SARS-CoV-2 demonstrated lower RNA viral loads among seropositive individuals than among seronegative individuals¹⁶⁰. Although higher levels of reinfection with Omicron BA.1 were demonstrated among unvaccinated patients previously infected with other SARS-CoV-2 variants¹⁶¹, there are no relevant data on the effect of previous infections on viral load dynamics.

Together, these findings suggest that vaccinated individuals are less infectious than unvaccinated individuals, although the duration of this effect has not been studied systematically. Nevertheless, there are some conflicting data on the effect of vaccination on onward transmission. An epidemiological study performed in the UK found that, despite RNA viral load declining faster among fully vaccinated than unvaccinated patients infected with Delta, the peak RNA viral loads were similar, and the secondary attack rate among household contacts exposed to fully vaccinated or unvaccinated index cases did not differ¹⁵¹. By contrast, data from Israel showed that less Delta transmission took place in households with vaccinated participants than with unvaccinated participants¹³⁰. Another study from the UK showed that both BNT162b2 and ChAdOx1 vaccines led to the reduction of onward transmission from vaccinated index patients, although a stronger reduction was detected for Alpha than for Delta¹²⁹, probably owing to the higher viral loads in the case of infection with Delta, as shown previously^{88,89,129}. Finally, another study found that vaccination was associated with reduced onward transmission of Delta breakthrough infection due to shorter duration of viable virus shedding¹⁵⁸.

Overall, even though the currently used vaccines are still based on the ancestral virus spike protein and elicit mainly a systemic rather than a mucosal immune response, some effect on viral load, infectious virus shedding and transmission has been observed^{129,130,162}. Furthermore, with increasing rates of breakthrough infections in the Omicron waves since the end of 2021, many individuals display hybrid immunity consisting of vaccination combined with one or more natural infections before or after vaccination^{163,164}. It is thought that such hybrid immunity may provide better control of virus replication in the mucosa^{149,163,165}.

With the constant emergence of novel variants that can evade existing immunity, our understanding of the effect of vaccination on viral shedding should be constantly updated¹⁶⁶. Better understanding of the role of mucosal immunity, and potentially vaccines that elicit

Glossary

Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy

A way to treat cancer by using T cells expressing genetically engineered receptors to target cancer cells.

Cycle threshold (Ct) value

The number of amplifications required for a target gene to cross the threshold determined by real-time PCR. Arbitrary test-specific Ct values inversely correlate with viral load.

Focus-forming assays

Assays that count the number of 'foci', defined as a cluster of adjacent cells expressing viral antigen stained by a specific antibody.

Immunostaining

A method for the detection of specific proteins in individual cells or tissues using antibodies. In the case of SARS-CoV-2, anti-nucleocapsid antibodies are used to detect virus in infected cells.

Index case

The infected individual who is triggering an outbreak or a cluster by transmitting an infectious agent to others. There might be multiple index cases in an outbreak or epidemiological study.

local rather than systemic immune responses, are needed to aim for viral load reduction as a means to control SARS-CoV-2 circulation^{167–169}.

Influence of SARS-CoV-2 VOCs on transmission

There are several possible underlying causes of increased transmissibility of newly emerging variants, which allow VOCs to quickly outcompete previously circulating strains, including increased viral loads, a lower infectious dose required to establish infection and prolonged period of infectiousness¹⁷⁰. Furthermore, the immune-evading properties of new variants lead to higher susceptibility of infection for vaccinated and previously infected individuals and result in higher transmissibility, as was observed with Omicron^{166,171}.

The rapid emergence of SARS-CoV-2 variants with altered biological properties has shown that knowledge on viral loads, viral kinetics and infectious virus shedding is variant specific, and each emerging variant requires a reassessment. Although understanding of mutational profiles and associated phenotypes of SARS-CoV-2 variants has improved, reasons for enhanced transmissibility are manifold and not all understood yet. To date, shedding characteristics and transmission properties cannot be easily predicted based on sequences. Unlike immune-evasion mechanisms, shedding dynamics, such as kinetics of infectious virus titres or incubation periods of the SARS-CoV-2

variants, cannot be predicted from specific mutation patterns. With a still highly dynamic situation in terms of viral evolution of SARS-CoV-2, understanding viral kinetics and their effect on transmission remains of high public health interest.

SARS-CoV-2 diagnostics in public health

Our ability to define the presence of infectious virus is key to guiding public health measures, as it will enable the isolation of infectious individuals to limit secondary transmission. Unfortunately, no point-of-care diagnostic test currently exists to determine infectious SARS-CoV-2 in a patient sample¹⁷², and virus culture as described above is not suited for diagnostic purposes. Thus, a range of approaches have been suggested to find a proxy for infectiousness to guide isolation periods.

One example is the detection of sgRNA transcripts, which are generated during virus replication, and specifically the synthesis of negative-strand RNA. Although sgRNAs are transcribed in infected cells, they are not packaged in the virions and can therefore serve as an indicator of active replication and thus of infectious virus. Specific RT-PCR assays were developed to detect sgRNAs in addition to the diagnostic detection of genomic SARS-CoV-2 RNA, but such assays have not made their way into routine diagnostic use owing to their lower sensitivity than conventional RT-PCR assays. Some studies found that detection of sgRNA correlates with detection of infectious virus^{4,173,174}, and that sgRNA was rarely detectable 8 dpos⁶⁷. However, sgRNA was detected in diagnostic samples up to 17 days after initial detection of infection¹⁷⁵ or in culture-negative samples¹⁷⁶, probably owing to the stability and nuclease resistance of double-membrane vesicles containing sgRNAs. Thus, although the absence of sgRNA would indicate absence of viral replication, the presence of sgRNA does not necessarily indicate infectiousness¹⁹.

Ct values have also been used as a proxy for infectiousness, as described above. However, as already discussed, low-quality specimens resulting from technical mistakes during the collection process can falsely indicate an absence of infectious virus. Furthermore, owing to the quick increase of RNA viral load at the beginning of the infection, a low viral load, especially in the absence of symptoms or in the early symptomatic period, does not preclude that an individual will not soon enter the infectious period with the highest transmission risk. At such a period, viral loads reach their peak levels, causing the majority of transmission events^{59,126}.

Even though Ag-RDTs are less sensitive than RT-PCR, they are less expensive, can be performed outside of laboratory settings and give faster results, and so are useful tools to guide isolation and limit transmission¹⁷⁷. RT-PCR tests have a limit of detection of 10^2 – 10^3 genome copies per millilitre, whereas Ag-RDTs have a limit of detection corresponding to 10^4 – 10^6 genome copies per millilitre^{177–180}. Infectious individuals typically have RNA viral loads of $>10^6$ genome copies per millilitre, which corresponds largely with a Ct of 25 in most RT-PCR assays⁴, indicating that Ag-RDT is a good proxy for infectiousness¹⁷⁷. However, the obvious limitations of Ag-RDT, such as lower sensitivity of infectious virus detection towards the end of infection^{47,52}, should not be neglected. Ag-RDTs have also shown variation in their sensitivity and specificity for detection of SARS-CoV-2 VOCs^{53,54}, which is a challenge as new variants emerge.

Overall, all of the currently available diagnostic methods have certain limitations for detection of infectious virus. However, even if these tests serve only as imperfect tools when used as proxies for infectiousness, their implementation as part of a public health strategy is not intended to prevent every single infection, but rather to reduce the

number of infectious people in the community and thus to decrease the number of secondary transmissions.

Conclusions

Entering the third year of the pandemic, much knowledge on SARS-CoV-2 viral loads, infectious virus shedding and windows of infectiousness has been gained, although emerging SARS-CoV-2 variants and an increasing population immunity add more complexity to the situation.

Although much progress has been made during the pandemic in the field of diagnostics, **to date, no diagnostic tests exist that reliably determine the presence of infectious virus**. Continuing evaluation of viral-shedding characteristics under these changing circumstances and understanding the biological properties of novel SARS-CoV-2 variants when it comes to viral shedding remain of importance to guide public health practices.

Published online: 02 December 2022

References

- Puelles, V. G. et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* **383**, 590–592 (2020).
- Lamers, M. M. & Haagmans, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **20**, 270–284 (2022).
- Peng, L. et al. SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. *J. Med. Virol.* **92**, 1676–1680 (2020).
- Wölfel, R. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* **581**, 465–469 (2020).
- Zhang, W. et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 386–389 (2020).
- Pérez-Bartolomé, F. & Sánchez-Quiros, J. Ocular manifestations of SARS-CoV-2: literature review. *Arch. Soc. Esp. Ophthalmol.* **96**, 32–40 (2021).
- Vetter, P. et al. Daily viral kinetics and innate and adaptive immune response assessment in COVID-19: a case series. *mSphere* <https://doi.org/10.1128/mSphere.00827-20> (2020).
- Jeong, H. W. et al. Viable SARS-CoV-2 in various specimens from COVID-19 patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **26**, 1520–1524 (2020).
- Cerrada-Romero, C. et al. Excretion and viability of SARS-CoV-2 in feces and its association with the clinical outcome of COVID-19. *Sci. Rep.* **12**, 7397 (2022).
- Dergham, J. & Delerue, J. Isolation of viable SARS-CoV-2 virus from feces of an immunocompromised patient suggesting a possible fecal mode of transmission. *J. Clin. Med.* <https://doi.org/10.3390/jcm10122696> (2021).
- Xiao, F. et al. Infectious SARS-CoV-2 in feces of patient with severe COVID-19. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 1920–1922 (2020).
- Sun, J. et al. Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 991–993 (2020).
- Colavita, F. et al. SARS-CoV-2 isolation from ocular secretions of a patient with COVID-19 in Italy with prolonged viral RNA detection. *Ann. Intern. Med.* **173**, 242–243 (2020).
- Matsuyama, S. et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **117**, 7001–7003 (2020).
- Case, J. B., Bailey, A. L., Kim, A. S., Chen, R. E. & Diamond, M. S. Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2. *Virology* **548**, 39–48 (2020).
- Baggen, J., Vanstreels, E., Jansen, S. & Daelemans, D. Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. *Nat. Microbiol.* **6**, 1219–1232 (2021).
- Chu, H. et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe* **1**, e14–e23 (2020).
- van Kampen, J. J. A. et al. Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat. Commun.* **12**, 267 (2021).
- Bruce, E. A. et al. Predicting infectivity: comparing four PCR-based assays to detect culturable SARS-CoV-2 in clinical samples. *EMBO Mol. Med.* **14**, e15290 (2022).
- Essaidi-Laziosi, M. & Perez Rodriguez, F. J. Estimating clinical SARS-CoV-2 infectiousness in Vero E6 and primary airway epithelial cells. *Lancet Microbe* **2**, e571 (2021).
- Liu, R. et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin. Chim. Acta* **505**, 172–175 (2020).
- Corman, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eur. Surveill.* <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045> (2020).
- Bullard, J. et al. Predicting infectious severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from diagnostic samples. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 2663–2666 (2020).
- Jefferson, T., Spencer, E. A., Brassey, J. & Heneghan, C. Viral cultures for coronavirus disease 2019 infectivity assessment: a systematic review. *Clin. Infect. Dis.* **73**, e3884–e3899 (2021).
- Puhach, O. et al. Infectious viral load in unvaccinated and vaccinated individuals infected with ancestral, Delta or Omicron SARS-CoV-2. *Nat. Med.* **28**, 1491–1500 (2022).
- van Kasteren, P. B. et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J. Clin. Virol.* **128**, 104412 (2020).
- Bentley, E. et al. Collaborative study for the establishment of a WHO international standard for SARS-CoV-2 RNA (WHO, 2020).
- Zou, L. et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1177–1179 (2020).
- Killingley, B. et al. Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge in young adults. *Nat. Med.* **28**, 1031–1041 (2022).
- Yu, F. et al. Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 793–798 (2020).
- European Centre for Disease Prevention and Control & World Health Organization Regional Office for Europe. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants: second update, August 2022 (WHO, 2022).
- Ke, R. et al. Longitudinal analysis of SARS-CoV-2 vaccine breakthrough infections reveals limited infectious virus shedding and restricted tissue distribution. *Open Forum Infect. Dis.* **9**, ofac192 (2022).
- Ke, R. et al. Daily longitudinal sampling of SARS-CoV-2 infection reveals substantial heterogeneity in infectiousness. *Nat. Microbiol.* **7**, 640–652 (2022).
- Pekosz, A. et al. Antigen-based testing but not real-time polymerase chain reaction correlates with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral culture. *Clin. Infect. Dis.* **73**, e2861–e2866 (2021).
- Monel, B. et al. Release of infectious virus and cytokines in nasopharyngeal swabs from individuals infected with non-Alpha or Alpha SARS-CoV-2 variants: an observational retrospective study. *EBioMedicine* **73**, 103637 (2021).
- Kirby, J. E. et al. SARS-CoV-2 antigen tests predict infectivity based on viral culture: comparison of antigen, PCR viral load, and viral culture testing on a large sample cohort. *Clin. Microbiol. Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.07.010> (2022).
- Pickering, S. et al. Comparative performance of SARS-CoV-2 lateral flow antigen tests and association with detection of infectious virus in clinical specimens: a single-centre laboratory evaluation study. *Lancet Microbe* **2**, e461–e471 (2021).
- Tariq, M. et al. Viable severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolates exhibit higher correlation with rapid antigen assays than subgenomic RNA or genomic RNA. *Front. Microbiol.* **12**, 718497 (2021).
- Chu, V. T. et al. Comparison of home antigen testing with RT-PCR and viral culture during the course of SARS-CoV-2 infection. *JAMA Intern. Med.* **182**, 701–709 (2022).
- Albert, E. et al. Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag rapid test device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 472.e7–472.e10 (2021).
- Ford, L. et al. Epidemiologic characteristics associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) antigen-based test results, real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) cycle threshold values, subgenomic RNA, and viral culture results from university testing. *Clin. Infect. Dis.* **73**, e1348–e1355 (2021).
- Berger, A. et al. Diagnostic accuracy of two commercial SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid tests at the point of care in community-based testing centers. *PLoS ONE* **16**, e0248921 (2021).
- Brümmer, L. E. et al. Accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: a living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* **18**, e1003735 (2021).
- Ngo Nsoga, M. T. et al. Diagnostic accuracy of Panbio rapid antigen tests on oropharyngeal swabs for detection of SARS-CoV-2. *PLoS ONE* **16**, e0253321 (2021).
- Korenkov, M. et al. Evaluation of a rapid antigen test to detect SARS-CoV-2 infection and identify potentially infectious individuals. *J. Clin. Microbiol.* **59**, e0089621 (2021).
- Yamayoshi, S. et al. Comparison of rapid antigen tests for COVID-19. *Viruses* **12**, 1420 (2020).
- McKay, S. L. et al. Performance evaluation of serial SARS-CoV-2 rapid antigen testing during a nursing home outbreak. *Ann. Intern. Med.* **174**, 945–951 (2021).
- Nordgren, J. et al. SARS-CoV-2 rapid antigen test: high sensitivity to detect infectious virus. *J. Clin. Virol.* **140**, 104846 (2021).
- Fernandez-Montero, A. & Argemi, J. Validation of a rapid antigen test as a screening tool for SARS-CoV-2 infection in asymptomatic populations. Sensitivity, specificity and predictive values. *EClinicalMedicine* **37**, 100954 (2021).
- Currie, D. W. et al. Relationship of SARS-CoV-2 antigen and reverse transcription PCR positivity for viral cultures. *Emerg. Infect. Dis.* **28**, 717–720 (2022).
- Corman, V. M. et al. Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid point-of-care antigen tests: a single-centre laboratory evaluation study. *Lancet Microbe* **2**, e311–e319 (2021).
- Lopera, T. J. & Alzate-Ángel, J. C. The usefulness of antigen testing in predicting contagiousness in COVID-19. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0196221 (2022).
- Osterman, A. et al. Impaired detection of Omicron by SARS-CoV-2 rapid antigen tests. *Med. Microbiol. Immunol.* **211**, 105–117 (2022).
- Galliez, R. M. et al. Evaluation of the Panbio COVID-19 antigen rapid diagnostic test in subjects infected with Omicron using different specimens. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0125022 (2022).
- Raich-Regué, D. et al. Performance of SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic tests for Omicron and other variants of concern. *Front. Microbiol.* **13**, 810576 (2022).
- Van Ogtrop, M. L., van de Laar, T. J. W., Eggink, D., Vanhommerig, J. W. & van der Reijden, W. A. Comparison of the performance of the Panbio COVID-19 antigen test in SARS-CoV-2 B.1.1.7 (Alpha) variants versus non-B.1.1.7 variants. *Microbiol. Spectr.* **9**, e0088421 (2021).

57. Lindner, A. K. et al. Head-to-head comparison of SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid test with self-collected nasal swab versus professional-collected nasopharyngeal swab. *Eur. Respir. J.* **57**, 2003961 (2021).
58. Meiners, L. & Horn, J. SARS-CoV-2 rapid antigen test sensitivity and viral load in freshly symptomatic hospital employees, December 2020 to February 2022. Preprint at <https://doi.org/10.2139/ssrn.4099425> (2022).
59. He, X. et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 672–675 (2020).
60. Néant, N. et al. Modeling SARS-CoV-2 viral kinetics and association with mortality in hospitalized patients from the French COVID cohort. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **118**, e2017962118 (2021).
61. Owusu, D. et al. Persistent SARS-CoV-2 RNA shedding without evidence of infectiousness: a cohort study of individuals with COVID-19. *J. Infect. Dis.* **224**, 1362–1371 (2021).
62. Cevik, M. et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe* **2**, e13–e22 (2021).
63. Chen, X. et al. Associations of clinical characteristics and treatment regimens with the duration of viral RNA shedding in patients with COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.* **98**, 252–260 (2020).
64. Kim, S. M. & Hwang, Y. J. Prolonged SARS-CoV-2 detection and reversed RT-PCR results in mild or asymptomatic patients. *Infect. Dis.* **53**, 31–37 (2021).
65. Talmy, T. & Tsur, A. Duration of SARS-CoV-2 detection in Israel Defense Forces soldiers with mild COVID-19. *J. Med. Virol.* **93**, 608–610 (2021).
66. Singanayagam, A. et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill.* <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483> (2020).
67. Perera, R. et al. SARS-CoV-2 virus culture and subgenomic RNA for respiratory specimens from patients with mild coronavirus disease. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 2701–2704 (2020).
68. Killerby, M. E. et al. Shedding of culturable virus, seroconversion, and 6-month follow-up antibody responses in the first 14 confirmed cases of coronavirus disease 2019 in the United States. *J. Infect. Dis.* **224**, 771–776 (2021).
69. Glans, H. et al. Shedding of infectious SARS-CoV-2 by hospitalized COVID-19 patients in relation to serum antibody responses. *BMC Infect. Dis.* **21**, 494 (2021).
70. Badu, K. et al. SARS-CoV-2 viral shedding and transmission dynamics: implications of WHO COVID-19 discharge guidelines. *Front. Med.* **8**, 648660 (2021).
71. Munker, D. et al. Dynamics of SARS-CoV-2 shedding in the respiratory tract depends on the severity of disease in COVID-19 patients. *Eur. Respir. J.* **58**, 2002724 (2021).
72. Folgueira, M. D. & Luczkowiak, J. Prolonged SARS-CoV-2 cell culture replication in respiratory samples from patients with severe COVID-19. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 886–891 (2021).
73. Kim, M. C. et al. Duration of culturable SARS-CoV-2 in hospitalized patients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **384**, 671–673 (2021).
74. Chen, P. Z. et al. SARS-CoV-2 shedding dynamics across the respiratory tract, sex, and disease severity for adult and pediatric COVID-19. *eLife* <https://doi.org/10.7554/eLife> (2021).
75. Cunha, M. D. P. et al. Atypical prolonged viral shedding with intra-host SARS-CoV-2 evolution in a mildly affected symptomatic patient. *Front. Med.* **8**, 760170 (2021).
76. Aydinli, T. et al. Shedding of viable SARS-CoV-2 after immunosuppressive therapy for cancer. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2586–2588 (2020).
77. Caillaud, S., Benotmane, I., Gautier Vargas, G., Perrin, P. & Fafi-Kremer, S. SARS-CoV-2 viral dynamics in immunocompromised patients. *Am. J. Transpl.* **21**, 1667–1669 (2021).
78. Roedel, K. et al. Viral dynamics of SARS-CoV-2 in critically ill allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immunocompetent patients with COVID-19. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **203**, 242–245 (2021).
79. Leung, W. F. et al. COVID-19 in an immunocompromised host: persistent shedding of viable SARS-CoV-2 and emergence of multiple mutations: a case report. *Int. J. Infect. Dis.* **114**, 178–182 (2022).
80. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: assessing SARS-CoV-2 circulation, variants of concern, non-pharmaceutical interventions and vaccine rollout in the EU/EEA, 15th update (European Centre for Disease Prevention and Control, 2021).
81. Grant, R. et al. Impact of SARS-CoV-2 Delta variant on incubation, transmission settings and vaccine effectiveness: results from a nationwide case–control study in France. *Lancet Reg. Health Eur.* **13**, 100278 (2022).
82. Ogata, T. & Tanaka, H. Shorter incubation period among unvaccinated Delta variant coronavirus disease 2019 patients in Japan. *Int. J. Environ. Res. Public Health* <https://doi.org/10.3390/ijerph19031127> (2022).
83. Backer, J. A. et al. Shorter serial intervals in SARS-CoV-2 cases with Omicron BA.1 variant compared with Delta variant, the Netherlands, 13 to 26 December 2021. *Eur. Surveill.* <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.6.2200042> (2022).
84. Takahashi, K. et al. Duration of infectious virus shedding by SARS-CoV-2 Omicron variant-infected vaccinees. *Emerg. Infect. Dis.* **28**, 998–1001 (2022).
85. Boucau, J. et al. Duration of shedding of culturable virus in SARS-CoV-2 Omicron (BA.1) infection. *N. Engl. J. Med.* **387**, 275–277 (2022).
86. Jones, T. C. et al. Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. *Science* <https://doi.org/10.1126/science.aba5273> (2021).
87. Li, B. et al. Viral infection and transmission in a large, well-traced outbreak caused by the SARS-CoV-2 Delta variant. *Nat. Commun.* **13**, 460 (2022).
88. Bolze, A. et al. SARS-CoV-2 variant Delta rapidly displaced variant Alpha in the United States and led to higher viral loads. *Cell Rep. Med.* **3**, 100564 (2022).
89. Earnest, R. et al. Comparative transmissibility of SARS-CoV-2 variants Delta and Alpha in New England, USA. *Cell Rep. Med.* **3**, 100583 (2022).
90. Luo, C. H. et al. Infection with the SARS-CoV-2 Delta variant is associated with higher recovery of infectious virus compared to the Alpha variant in both unvaccinated and vaccinated individuals. *Clin. Infect. Dis.* **75**, e715–e725 (2021).
91. Despres, H. W. et al. Measuring infectious SARS-CoV-2 in clinical samples reveals a higher viral titer: RNA ratio for Delta and Epsilon vs. Alpha variants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* <https://doi.org/10.1073/pnas.2116518119> (2022).
92. Hay, J. A. et al. Quantifying the impact of immune history and variant on SARS-CoV-2 viral kinetics and infection rebound: a retrospective cohort study. *eLife* **11**, e81849 (2022).
93. Fall, A. et al. The displacement of the SARS-CoV-2 variant Delta with Omicron: an investigation of hospital admissions and upper respiratory viral loads. *EbioMedicine* <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104008> (2022).
94. Lentini, A. & Pereira, A. Monitoring of the SARS-CoV-2 Omicron BA.1/BA.2 lineage transition in the Swedish population reveals increased viral RNA levels in BA.2 cases. *Med* **3**, 636–664 (2022).
95. Qassim, S. H. et al. Effects of BA.1/BA.2 subvariant, vaccination, and prior infection on infectiousness of SARS-CoV-2 Omicron infections. *J. Travel Med.* **29**, taac068 (2022).
96. Marking, U. et al. Correlates of protection, viral load trajectories and symptoms in BA.1, BA.1.1 and BA.2 breakthrough infections in triple vaccinated healthcare workers. Preprint at [medRxiv https://doi.org/10.1101/2022.04.02.22273333](https://doi.org/10.1101/2022.04.02.22273333) (2022).
97. Wang, Y. et al. Transmission, viral kinetics and clinical characteristics of the emergent SARS-CoV-2 Delta VOC in Guangzhou, China. *EClinicalMedicine* **40**, 101129 (2021).
98. Siedner, M. J. et al. Duration of viral shedding and culture positivity with postvaccination SARS-CoV-2 Delta variant infections. *JCI Insight* <https://doi.org/10.1172/jci.insight.155483> (2022).
99. Pierce, C. A. et al. Immune responses to SARS-CoV-2 infection in hospitalized pediatric and adult patients. *Sci. Transl. Med.* **12**, eabd5487 (2020).
100. Takahashi, T. et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature* **588**, 315–320 (2020).
101. Bunyavanich, S., Do, A. & Vicencio, A. Nasal gene expression of angiotensin-converting enzyme 2 in children and adults. *JAMA* **323**, 2427–2429 (2020).
102. Zheng, S. et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January–March 2020: retrospective cohort study. *BMJ* **369**, m1443 (2020).
103. L'Huillier, A. G. & Torriani, G. Culture-competent SARS-CoV-2 in nasopharynx of symptomatic neonates, children, and adolescents. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 2494–2497 (2020).
104. Baggio, S. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral load in the upper respiratory tract of children and adults with early acute coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* **73**, 148–150 (2021).
105. Chung, E. et al. Comparison of symptoms and RNA levels in children and adults with SARS-CoV-2 infection in the community setting. *JAMA Pediatr.* **175**, e212025 (2021).
106. Han, M. S. et al. Clinical characteristics and viral RNA detection in children with coronavirus disease 2019 in the Republic of Korea. *JAMA Pediatr.* **175**, 73–80 (2021).
107. Bellon, M. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral load kinetics in symptomatic children, adolescents, and adults. *Clin. Infect. Dis.* **73**, e1384–e1386 (2021).
108. Madera, S. et al. Nasopharyngeal SARS-CoV-2 viral loads in young children do not differ significantly from those in older children and adults. *Sci. Rep.* **11**, 3044 (2021).
109. Lauer, S. A. et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann. Intern. Med.* **172**, 577–582 (2020).
110. Elias, C., Sekri, A., Leblanc, P., Cucherat, M. & Vanhems, P. The incubation period of COVID-19: a meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* **104**, 708–710 (2021).
111. Dhoubi, W. et al. The incubation period during the pandemic of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.* **10**, 101 (2021).
112. Brandal, L. T. et al. Outbreak caused by the SARS-CoV-2 Omicron variant in Norway, November to December 2021. *Eur. Surveill.* **26**, 2101147 (2021).
113. Wu, Y. et al. Incubation period of COVID-19 caused by unique SARS-CoV-2 strains: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw. Open* **5**, e2228008 (2022).
114. Sun, K. et al. Transmission heterogeneities, kinetics, and controllability of SARS-CoV-2. *Science* **371**, eabe2424 (2021).
115. Lavezzo, E. et al. Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo'. *Nature* **584**, 425–429 (2020).
116. Gudbjartsson, D. F. et al. Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic population. *N. Engl. J. Med.* **382**, 2302–2315 (2020).
117. Glenet, M. et al. Asymptomatic COVID-19 adult outpatients identified as significant viable SARS-CoV-2 shedders. *Sci. Rep.* **11**, 20615 (2021).
118. Wang, Y. et al. Characterization of an asymptomatic cohort of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infected individuals outside of Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 2132–2138 (2020).
119. Long, Q. X. et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat. Med.* **26**, 1200–1204 (2020).
120. Lee, S. et al. Clinical course and molecular viral shedding among asymptomatic and symptomatic patients with SARS-CoV-2 infection in a community treatment center in the Republic of Korea. *JAMA Intern. Med.* **180**, 1447–1452 (2020).

121. Zhou, R. et al. Viral dynamics in asymptomatic patients with COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.* **96**, 288–290 (2020).
122. Hall, S. M. et al. Comparison of anterior nares CT values in asymptomatic and symptomatic individuals diagnosed with SARS-CoV-2 in a university screening program. *PLoS ONE* **17**, e0270694 (2022).
123. Kissler, S. M. et al. Viral dynamics of acute SARS-CoV-2 infection and applications to diagnostic and public health strategies. *PLoS Biol.* **19**, e3001333 (2021).
124. Tallmadge, R. L. et al. Viral RNA load and infectivity of SARS-CoV-2 in paired respiratory and oral specimens from symptomatic, asymptomatic, or postsymptomatic individuals. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0226421 (2022).
125. Marks, M. et al. Transmission of COVID-19 in 282 clusters in Catalonia, Spain: a cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **21**, 629–636 (2021).
126. Marc, A. et al. Quantifying the relationship between SARS-CoV-2 viral load and infectiousness. *eLife* <https://doi.org/10.7554/eLife.69302> (2021).
127. Cheng, H. Y. et al. Contact tracing assessment of COVID-19 transmission dynamics in Taiwan and risk at different exposure periods before and after symptom onset. *JAMA Intern. Med.* **180**, 1156–1163 (2020).
128. Muggleston, M. A. et al. Presymptomatic, asymptomatic and post-symptomatic transmission of SARS-CoV-2: joint British Infection Association (BIA), Healthcare Infection Society (HIS), Infection Prevention Society (IPS) and Royal College of Pathologists (RCPath) guidance. *BMC Infect. Dis.* **22**, 453 (2022).
129. Eyre, D. W. et al. Effect of Covid-19 vaccination on transmission of Alpha and Delta variants. *N. Engl. J. Med.* **386**, 744–756 (2022).
130. Prunas, O. et al. Vaccination with BNT162b2 reduces transmission of SARS-CoV-2 to household contacts in Israel. *Science* **375**, 1151–1154 (2022).
131. Lyngse, F. P. et al. Household transmission of SARS-CoV-2 Omicron variant of concern subvariants BA.1 and BA.2 in Denmark. *Nat. Commun.* **13**, 5760 (2022).
132. Leung, N. H. L. Transmissibility and transmission of respiratory viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 528–545 (2021).
133. Alihsan, B. et al. The efficacy of facemasks in the prevention of COVID-19: a systematic review. Preprint at *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2022.07.28.22278153> (2022).
134. Hu, Z. et al. Early immune markers of clinical, virological, and immunological outcomes in patients with COVID-19: a multi-omics study. *Elife* **11**, e77943 (2022).
135. Chen, P. Z. et al. Heterogeneity in transmissibility and shedding SARS-CoV-2 via droplets and aerosols. *eLife* <https://doi.org/10.7554/eLife.65774> (2021).
136. Adam, D. C. et al. Clustering and superspreading potential of SARS-CoV-2 infections in Hong Kong. *Nat. Med.* **26**, 1714–1719 (2020).
137. Guo, Z. et al. Superspreading potential of infection seeded by the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant in South Korea. *J. Infect.* **85**, e77–e79 (2022).
138. Guo, Z. et al. Superspreading potential of COVID-19 outbreak seeded by Omicron variants of SARS-CoV-2 in Hong Kong. *J. Travel Med.* **29**, taac049 (2022).
139. Althouse, B. M. et al. Superspreading events in the transmission dynamics of SARS-CoV-2: opportunities for interventions and control. *PLoS Biol.* **18**, e3000897 (2020).
140. Baden, L. R. et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **384**, 403–416 (2021).
141. Lopez Bernal, J. et al. Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B.1.617.2 (Delta) variant. *N. Engl. J. Med.* **385**, 585–594 (2021).
142. Feikin, D. R. et al. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression. *Lancet* **399**, 924–944 (2022).
143. Belik, M. et al. Comparative analysis of COVID-19 vaccine responses and third booster dose-induced neutralizing antibodies against Delta and Omicron variants. *Nat. Commun.* **13**, 2476 (2022).
144. Pegu, A. et al. Durability of mRNA-1273 vaccine-induced antibodies against SARS-CoV-2 variants. *Science* **373**, 1372–1377 (2021).
145. Lipsitch, M., Krammer, F., Regev-Yochay, G., Lustig, Y. & Balicer, R. D. SARS-CoV-2 breakthrough infections in vaccinated individuals: measurement, causes and impact. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 57–65 (2022).
146. Mostaghimi, D., Valdez, C. N., Larson, H. T., Kalinich, C. C. & Iwasaki, A. Prevention of host-to-host transmission by SARS-CoV-2 vaccines. *Lancet Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00472-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00472-2) (2021).
147. Russell, M. W., Moldoveanu, Z., Ogra, P. L. & Mestecky, J. Mucosal immunity in COVID-19: a neglected but critical aspect of SARS-CoV-2 infection. *Front. Immunol.* **11**, 611337 (2020).
148. Sheikh-Mohamed, S. et al. Systemic and mucosal IgA responses are variably induced in response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination and are associated with protection against subsequent infection. *Mucosal Immunol.* **15**, 799–808 (2022).
149. Collier, A. Y. et al. Characterization of immune responses in fully vaccinated individuals after breakthrough infection with the SARS-CoV-2 Delta variant. *Sci. Transl. Med.* **14**, eabn6150 (2022).
150. Pouwels, K. B. et al. Effect of Delta variant on viral burden and vaccine effectiveness against new SARS-CoV-2 infections in the UK. *Nat. Med.* **27**, 2127–2135 (2021).
151. Singanayagam, A. et al. Community transmission and viral load kinetics of the SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) variant in vaccinated and unvaccinated individuals in the UK: a prospective, longitudinal, cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **22**, 183–195 (2021).
152. Levine-Tiefenbrun, M. et al. Viral loads of Delta-variant SARS-CoV-2 breakthrough infections after vaccination and booster with BNT162b2. *Nat. Med.* **27**, 2108–2110 (2021).
153. Emary, K. R. W. et al. Efficacy of ChAdOx1nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.17): an exploratory analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* **397**, 1351–1362 (2021).
154. Chia, P. Y. et al. Virological and serological kinetics of SARS-CoV-2 Delta variant vaccine breakthrough infections: a multicentre cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* **28**, 612.e1–612.e7 (2021).
155. Garcia-Knight, M. et al. Infectious viral shedding of SARS-CoV-2 Delta following vaccination: a longitudinal cohort study. *PLoS Pathog.* **18**, e1010802 (2022).
156. Peña-Hernández, M. A. et al. Comparison of infectious SARS-CoV-2 from the nasopharynx of vaccinated and unvaccinated individuals. Preprint at *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.12.28.21268460> (2022).
157. Shamier, M. C. et al. Virological characteristics of SARS-CoV-2 vaccine breakthrough infections in health care workers. Preprint at *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.08.20.21262158> (2021).
158. Jung, J. et al. Transmission and infectious SARS-CoV-2 shedding kinetics in vaccinated and unvaccinated individuals. *JAMA Netw. Open* **5**, e2213606 (2022).
159. Hirotsu, Y. et al. Similar viral loads in Omicron infections regardless of vaccination status. Preprint at *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2022.04.19.22274005> (2022).
160. Letizia, A. G. et al. SARS-CoV-2 seropositivity and subsequent infection risk in healthy young adults: a prospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* **9**, 712–720 (2021).
161. Pulliam, J. R. C. et al. Increased risk of SARS-CoV-2 reinfection associated with emergence of Omicron in South Africa. *Science* **376**, eabn4947 (2022).
162. Harris, R. J. et al. Effect of vaccination on household transmission of SARS-CoV-2 in England. *N. Engl. J. Med.* **385**, 759–760 (2021).
163. Bates, T. A. et al. Vaccination before or after SARS-CoV-2 infection leads to robust humoral response and antibodies that effectively neutralize variants. *Sci. Immunol.* **7**, eabn8014 (2022).
164. Wratil, P. R. et al. Three exposures to the spike protein of SARS-CoV-2 by either infection or vaccination elicit superior neutralizing immunity to all variants of concern. *Nat. Med.* **28**, 496–503 (2022).
165. Malato, J. et al. Risk of BA.5 infection among persons exposed to previous SARS-CoV-2 variants. *N. Engl. J. Med.* **387**, 953–954 (2022).
166. Cao, Y. et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nature* **608**, 593–602 (2022).
167. Hassan, A. O. et al. A single-dose intranasal ChAd vaccine protects upper and lower respiratory tracts against SARS-CoV-2. *Cell* **183**, 169–184 (2020).
168. Lapuente, D. et al. Protective mucosal immunity against SARS-CoV-2 after heterologous systemic prime-mucosal boost immunization. *Nat. Commun.* **12**, 6871 (2021).
169. Afkhami, S. et al. Respiratory mucosal delivery of next-generation COVID-19 vaccine provides robust protection against both ancestral and variant strains of SARS-CoV-2. *Cell* **185**, 896–915 (2022).
170. Grubaugh, N. D. & Hodcroft, E. B. Public health actions to control new SARS-CoV-2 variants. *Cell* **184**, 1127–1132 (2021).
171. Carreño, J. M. et al. Activity of convalescent and vaccine serum against SARS-CoV-2 Omicron. *Nature* **602**, 682–688 (2022).
172. Ashcroft, P., Lehtinen, S. & Bonhoeffer, S. Test-trace-isolate-quarantine (TTIQ) intervention strategies after symptomatic COVID-19 case identification. *PLoS ONE* **17**, e0263597 (2022).
173. Santos Bravo, M. et al. Viral culture confirmed SARS-CoV-2 subgenomic RNA value as a good surrogate marker of infectivity. *J. Clin. Microbiol.* **60**, e0160921 (2022).
174. Kim, J. Y. et al. Diagnostic usefulness of subgenomic RNA detection of viable SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Clin. Microbiol. Infect.* **28**, 101–106 (2022).
175. Alexandersen, S. & Chamings, A. SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nat. Commun.* **11**, 6059 (2020).
176. Bonenfant, G. et al. Surveillance and correlation of SARS-CoV-2 viral RNA, antigen, virus isolation, and self-reported symptoms in a longitudinal study with daily sampling. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciac282> (2022).
177. Peeling, R. W., Heymann, D. L., Teo, Y. Y. & Garcia, P. J. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. *Lancet* **399**, 757–768 (2022).
178. Pilarowski, G. et al. Performance characteristics of a rapid severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antigen detection assay at a public plaza testing site in San Francisco. *J. Infect. Dis.* **223**, 1139–1144 (2021).
179. Leber, W. et al. Comparing the diagnostic accuracy of point-of-care lateral flow antigen testing for SARS-CoV-2 with RT-PCR in primary care (REAP-2). *EClinicalMedicine* **38**, 101011 (2021).
180. Kohmer, N. et al. The comparative clinical performance of four SARS-CoV-2 rapid antigen tests and their correlation to infectivity in vitro. *J. Clin. Med.* <https://doi.org/10.3390/jcm10020328> (2021).
181. Wang, W. et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA* **323**, 1843–1844 (2020).
182. Lee, R. A., Herigon, J. C., Benedetti, A., Pollock, N. R. & Denking, C. M. Performance of saliva, oropharyngeal swabs, and nasal swabs for SARS-CoV-2 molecular detection: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* **59**, e02881-20 (2021).
183. Tsang, N. N. Y. et al. Diagnostic performance of different sampling approaches for SARS-CoV-2 RT-PCR testing: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **21**, 1233–1245 (2021).
184. Peto, T. COVID-19: rapid antigen detection for SARS-CoV-2 by lateral flow assay: a national systematic evaluation of sensitivity and specificity for mass-testing. *EClinicalMedicine* **36**, 100924 (2021).
185. Hay, J. A. et al. Estimating epidemiologic dynamics from cross-sectional viral load distributions. *Science* **373**, eabh0635 (2021).

186. Peccia, J. et al. Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1164–1167 (2020).
187. Xin, H. et al. The incubation period distribution of coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **73**, 2344–2352 (2021).
188. Yu, I. T. et al. Evidence of airborne transmission of the severe acute respiratory syndrome virus. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1731–1739 (2004).
189. Cheng, P. K. et al. Viral shedding patterns of coronavirus in patients with probable severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **363**, 1699–1700 (2004).
190. Peiris, J. S. et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* **361**, 1767–1772 (2003).
191. Chan, P. K. S. et al. Laboratory diagnosis of SARS. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 825–831 (2004).
192. Liu, W. et al. Long-term SARS coronavirus excretion from patient cohort, China. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1841–1843 (2004).
193. Xu, D. et al. Persistent shedding of viable SARS-CoV in urine and stool of SARS patients during the convalescent phase. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**, 165–171 (2005).
194. V'kovski, P. et al. Disparate temperature-dependent virus–host dynamics for SARS-CoV-2 and SARS-CoV in the human respiratory epithelium. *PLoS Biol.* **19**, e3001158 (2021).
195. Pitzer, V. E., Leung, G. M. & Lipsitch, M. Estimating variability in the transmission of severe acute respiratory syndrome to household contacts in Hong Kong, China. *Am. J. Epidemiol.* **166**, 355–363 (2007).
196. Riley, S. et al. Transmission dynamics of the etiological agent of SARS in Hong Kong: impact of public health interventions. *Science* **300**, 1961–1966 (2003).
197. Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. & Fouchier, R. A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1814–1820 (2012).
198. Breban, R., Riou, J. & Fontanet, A. Interhuman transmissibility of Middle East respiratory syndrome coronavirus: estimation of pandemic risk. *Lancet* **382**, 694–699 (2013).
199. Oh, M. D. et al. Viral load kinetics of MERS coronavirus infection. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1303–1305 (2016).
200. Corman, V. M. et al. Viral shedding and antibody response in 37 patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 477–483 (2016).
201. Min, C.-K. et al. Comparative and kinetic analysis of viral shedding and immunological responses in MERS patients representing a broad spectrum of disease severity. *Sci. Rep.* **6**, 25359 (2016).
202. Ip, D. K. et al. Viral shedding and transmission potential of asymptomatic and paucisymptomatic influenza virus infections in the community. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 736–742 (2017).
203. Carrat, F. et al. Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies. *Am. J. Epidemiol.* **167**, 775–785 (2008).
204. Pawelek, K. A. et al. Modeling within-host dynamics of influenza virus infection including immune responses. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002588 (2012).
205. Ip, D. K. M. et al. The dynamic relationship between clinical symptomatology and viral shedding in naturally acquired seasonal and pandemic influenza virus infections. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 431–437 (2016).
206. Nair, H. et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **375**, 1545–1555 (2010).
207. Bagga, B. et al. Comparing influenza and RSV viral and disease dynamics in experimentally infected adults predicts clinical effectiveness of RSV antivirals. *Antivir. Ther.* **18**, 785–791 (2013).
208. DeVincenzo, J. P. et al. Viral load drives disease in humans experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 1305–1314 (2010).
209. Kutter, J. S. et al. Small quantities of respiratory syncytial virus RNA only in large droplets around infants hospitalized with acute respiratory infections. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **10**, 100 (2021).

Acknowledgements

The authors thank E. Boehm for help with literature search and proofreading. The work was funded by the COVID-19 National Research Program (grant number 198412) of the Swiss National Science Foundation.

Author contributions

O.P. and I.E. wrote the manuscript. B.M. created the figures. All authors contributed to the discussion of the content, and reviewed and edited the manuscript before submission.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>.

Correspondence should be addressed to Isabella Ecklerle.

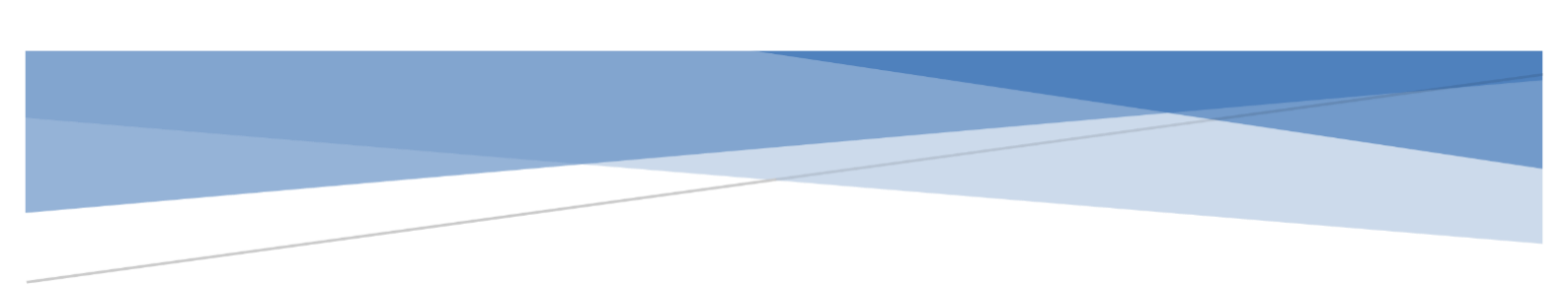
Peer review information *Nature Reviews Microbiology* thanks Nancy Leung, Quanyi Wang and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

© Springer Nature Limited 2022



**Valutazione dell'idoneità della tecnica RT-qPCR per
rilevare una possibile infezione e infettività delle
persone rispetto al SARS-CoV-2.**

parere scientifico

Kämmerer, Ulrike

Prefisso

La reazione a catena della polimerasi (Polymerase Kettenreaktion; PCR) è un metodo molecolare straordinario, che consente di rilevare in laboratorio minuscole tracce di un acido nucleico ricercato (DNA o RNA, a seconda della variante della PCR). Questa tecnica è un aiuto prezioso nell'analisi di modelli genetici in campioni microscopici nella ricerca, ma anche nella diagnostica di routine, come nelle indagini forensi, nel monitoraggio della contaminazione di grandi lotti di alimenti e bevande, nella ricerca di tracce di specie animali non autorizzate, ad esempio in prodotti a base di carne/salumi (parola chiave carne di cavallo nel macinato) o nel monitoraggio dei prodotti sanguigni per genomi virali di HIV e virus dell'epatite.

Tuttavia, questa estrema sensibilità rende la tecnica anche molto suscettibile a contaminazioni (vedi „Phantom von Heilbronn“ al punto 3.5) o a interpretazioni eccessive dei risultati, se la PCR viene utilizzata come unico criterio senza ulteriore contesto. Ad esempio, una firma genetica trovata su una persona ricercata in una scena del crimine può essere considerata solo come un indizio e non permette di dimostrare con certezza che la persona fosse fisicamente presente, né se la traccia genetica trovata provenga da una persona viva o deceduta. Per confronto: la sensibilità della PCR è così elevata che è paragonabile a un etilometro che rilevi ancora 0,000000008 di tasso alcolico nel sangue e dichiari la persona “ubriaca”, creando problemi a un automobilista durante un controllo, anche se non ha consumato nemmeno una goccia di alcol né mostra alcun segno di consumo.

La tecnica della PCR (anche RT-PCR o RT-qPCR) può, indipendentemente dall'estrema sensibilità, sempre e solo amplificare e rilevare il segmento genetico ricercato. Tuttavia, non è possibile determinare con questa tecnica se esso provenga da un organismo vitale o capace di replicarsi.

La reazione a catena della polimerasi quantitativa con trascrittasi inversa (RT-qPCR) utilizzata nella ricerca dei casi di SARS-CoV-2 è una variante della PCR, in cui il materiale di partenza, l'RNA, viene prima trascritto in DNA, per poi essere amplificato nella PCR in modo tale che, a ogni ciclo di copia, segnali luminosi consentano di risalire alla quantità dei genomi duplicati.

Come unico strumento diagnostico per un'infezione attiva o addirittura la contagiosità con SARS-CoV-2, questa tecnica molecolare è già inadeguata per una sperimentazione di massa per numerose ragioni. Tuttavia, con la tecnica PCR, si può supportare una diagnosi differenziale in presenza di una sintomatologia preesistente, rilevando la firma genetica di un possibile agente patogeno, che il clinico può poi correlare ai sintomi del paziente. Tuttavia, una PCR non deve e non può mai essere l'unico criterio diagnostico per una possibile malattia.

Nel dibattito sull'idoneità della RT-qPCR per identificare pazienti Covid-19, spesso un test PCR positivo in una persona sana e asintomatica viene utilizzato per definirla un “paziente asintomatico”. Tuttavia, secondo le definizioni generalmente valide dei termini, una persona

senza sintomi clinici ("asintomatica") non è né infetta né un paziente, si veda ANNEX 1 (definizioni dei termini) e i punti 1.5 e 1.6.

Nota: molti link nel testo non funzionano direttamente, ma devono essere copiati e incollati nel browser.

Indice

1. Definizione e descrizione di termini importanti	4
2. Considerazioni generali sul valore diagnostico rispetto alla questione dell'infettività	6
2.1.1 Ufficio federale svizzero per la protezione della popolazione	7
2.1.2. Dr. Antony Fauci	7
2.1.3 Prof.ssa Marion Koopmans	9
2.1.4 Ministero della Salute Svedese	10
2.1.5 National Centre for Infectious Disease di Singapore	11
2.1.6 Pubblicazione su Nature di Wölfel, Drosten sui casi Webasto	11
2.1.7 Articolo su Nature Reviews di Isabella Eckerle (Ginevra)	12
2.1.8 Zentrum für Evidenzbasierte Medizin	13
2.1.9 Informazioni dalla Cleveland Clinic	14
2.1.10 Informazioni ufficiali del Governo Canadese	15
2.1.11 Linea guida del CDC sull'Influenza	15
2.1.12 Ministero della Salute Australiano e valutazione dei "Fact-checker"	16
2.1.13. Sito del RKI sulla valutazione della PCR come non infettiva	18
La preparazione dei campioni esclude il rilevamento di virus replicabili	19
2.3. Conclusione intermedia:	20
2.1. Illustrazione	22
3. Fattori che influenzano l'affidabilità del test PCR	23
3.1. Progettazione della PCR e specificità	23
3.2. Numero dei geni target indipendenti	24
3.3. Numero di cicli effettuati (valore Ct) nella qPCR	27
3.3.1 Importanza del valore Ct	27
3.3.2 Prove della rilevanza del valore CT	29
3.4. Probabilità pre-test	36
3.4.1. Spiegazione di Correctiv	36
3.4.2. Spiegazione fornita dal RKI sui test rapidi antigenici (Annex 7)	38
3.4.3. Pubblicazione sul problema della probabilità pre-test nella PCR	40
3.5. Valutazione intermedia	40

3.6. Controlli adeguati	41
3.6.1. Fornitura di controlli adeguati	43
3.6.2. Test a circuito chiuso: anomalie al primo approccio.....	44
3.7. Esclusione di contaminazioni dei reagenti e problemi nei processi operativi.....	46
3.7.1 Contaminazione all'interno del laboratorio dovuta a errori nei processi.....	46
3.7.2. Contaminazione dei materiali/reagenti dal produttore.....	48
3.7.3. Valutazione intermedia	49
3.8. Kit PCR commerciali	49
4. Correlazione tra rilevamento positivo di acidi nucleici nella RT-qPCR, malattia e infettività	50
4.1. Valutazione del Deutsches Ärzteblatt.....	51
4.2. Comunicazione ufficiale del CDC.....	51
4.3. Ufficio Sanitario di Francoforte.....	51
4.4. Pubblicazione del CDC.....	52
4.5. Informazioni della WHO per i laboratori di analisi	52
4.6. Pubblicazione su Lancet	53
4.7. Dichiarazioni di Christian Drosten.....	54
4.7.1 Perizia di Drosten per il Tribunale	54
4.7.2. NDR Podcast 94	54
4.7.3. Pubblicazione su Science.....	54
5. Dichiarazioni sulla diagnostica PCR dai protocolli del RKI	55
6. Conclusione e Sintesi	63
7. Allegati.....	64

1. Definizione e descrizione di termini importanti

1.1 Reazione a Catena della Polimerasi (PCR)

La **Reazione a Catena della Polimerasi (PCR)** è una tecnica molecolare avanzata che permette di amplificare un frammento definito di DNA, solitamente di lunghezza compresa tra **100 e 1000 basi**. Questo processo si basa sull'uso di un enzima, la polimerasi, e richiede due brevi frammenti di DNA a singolo filamento, chiamati **primer**, che delimitano la regione da amplificare.

I **primer** sono costituiti da una sequenza di basi nucleotidiche (solitamente tra **18 e 25**) specifiche per le regioni del DNA che fiancheggiano il segmento di interesse. La loro specificità è essenziale per garantire che la PCR amplifichi esclusivamente la sequenza desiderata. La progettazione dei primer utilizza banche dati genetiche e software specializzati (es. Primer-Blast), e la loro sintesi viene effettuata da aziende specializzate. Prima dell'uso, i primer

vengono testati per confermare la loro specificità in condizioni sperimentali diverse, utilizzando controlli **positivi e negativi**.

Il processo della PCR avviene in cicli ripetuti, composti da tre fasi principali:

1. **Denaturazione:** La miscela viene riscaldata a oltre **90°C**, separando i due filamenti del DNA in singoli filamenti.
2. **Annealing:** La temperatura viene abbassata per permettere l'adesione dei primer alle regioni complementari dei filamenti di DNA separati.
3. **Estensione:** La polimerasi estende i filamenti di DNA partendo dai primer, ricostruendo il filamento complementare per creare un doppio filamento, a una temperatura di circa **72°C**.

Ogni ciclo di PCR raddoppia la quantità di DNA target, portando a un'amplificazione **esponenziale**. Ad esempio, da un singolo filamento di DNA, si ottengono **1.024 copie dopo 10 cicli**, oltre **1 milione dopo 20 cicli** e più di **1 miliardo dopo 30 cicli**.

1.2 PCR Quantitativa (qPCR)

La **PCR quantitativa (qPCR)** è una variante della PCR che consente di monitorare l'amplificazione del DNA in tempo reale. Essa utilizza una **sonda** marcata con un **fluoroforo** e un **quencher**, progettata per legarsi a una regione specifica del DNA target. Durante l'estensione, la polimerasi degrada la sonda, liberando il fluoroforo, il cui segnale viene rilevato da uno strumento dedicato.

La quantità di fluorescenza aumenta con il progredire dei cicli, e il ciclo in cui il segnale supera una soglia prestabilita è definito valore **CT (Cycle Threshold)**. Un valore CT basso indica un'elevata quantità iniziale di DNA target, mentre un valore CT alto può indicare una scarsa quantità o la presenza di amplificazioni non specifiche.

1.3 Reazione di Trascrittasi Inversa (RT)

La **reazione di trascrittasi inversa (RT)** è necessaria quando il materiale genetico iniziale è RNA, come nel caso del SARS-CoV-2, un virus a RNA. L'enzima trascrittasi inversa converte l'RNA in DNA complementare (**cdNA**), che può poi essere amplificato tramite PCR.

Per valutare l'affidabilità di un test basato su RT-qPCR, si esaminano la **sensibilità** e la **specificità** del sistema utilizzando campioni noti contenenti sia il gene target corretto che geni simili ma non target.

1.4 Sensibilità e Specificità

La **sensibilità** della PCR (in tutte le sue varianti) indica la capacità del test di rilevare anche minime quantità del gene target, mentre la **specificità** riflette la capacità del test di evitare falsi positivi rilevando geni simili ma non target. Errori come contaminazioni possono comunque portare a falsi positivi, che possono essere minimizzati attraverso rigorose **procedure operative standard (SOP)** e controlli esterni regolari.

1.5 Infezione

Un'infezione è definita dalla presenza simultanea di:

- Penetrazione di microrganismi (come batteri o virus) nell'organismo.
- Moltiplicazione dei microrganismi all'interno del corpo.
- Risposta dell'organismo, come sintomi.

I sintomi di un'infezione da SARS-CoV-2, secondo il **CDC**, possono includere:

- **Febbre o brividi**
- **Tosse**
- **Affaticamento**
- **Perdita di gusto o olfatto**
- **Mal di gola**
- **Naso chiuso o che cola**
- **Diarrea**

Per ulteriori descrizioni relative alla definizione del termine "infezione", vedere l'**Allegato 1**.

1.6 Paziente

Un **paziente** è definito come una persona che riceve assistenza da professionisti sanitari per sintomi di malattie, lesioni o altre condizioni di salute compromessa. Pertanto, una persona **asintomatica** e priva di problemi medici non può essere definita "paziente".

Per ulteriori descrizioni relative alla definizione del termine "paziente", vedere l'**Allegato 1**.

2. Considerazioni generali sul valore diagnostico rispetto alla questione dell'infettività

L'inventore del test PCR, il Premio Nobel Kary Mullis, scomparso nell'agosto 2019, ha sempre sottolineato che il suo test è progettato unicamente per rendere visibile, tramite amplificazione (replicazione), una molecola altrimenti invisibile all'occhio umano (l'acido

desossiribonucleico, DNA) o un frammento di DNA. Tuttavia, **non consente di stabilire se ciò che viene rilevato sia pericoloso o causi malattia.**

In particolare, un test PCR – anche se condotto correttamente – non può fornire alcuna indicazione sul fatto che una persona sia infettata da un agente patogeno attivo o meno. Infatti, il test non distingue tra "materia morta", come un frammento genomico del tutto innocuo risultato dal combattimento del sistema immunitario contro un raffreddore o un'influenza (frammenti che possono essere rilevati anche mesi dopo che il sistema immunitario ha risolto il problema), e "materia viva", ovvero un virus fresco e riproducibile.

Nota: La PCR viene utilizzata, ad esempio, in ambito forense per amplificare frammenti di DNA residuo da capelli o altri materiali di traccia, al fine di identificare l'origine genetica del/i colpevole/i ("impronta genetica"). Tuttavia, anche in questi casi, l'analisi PCR non può stabilire se la persona identificata fosse effettivamente presente sul luogo (o se si tratti di materiale contaminato, vedi punto 3.5.2 sul caso "Il fantasma di Heilbronn") e, se presente, se fosse viva o morta in quel momento.

2.1 Dichiarazioni ufficiali di istituzioni / esperti rilevanti

Sull'inadeguatezza della PCR come unico test diagnostico per determinare l'infettività o il rischio di trasmissione

Nota preliminare: Sul sito del Ministero federale della salute tedesco si afferma correttamente che la PCR viene utilizzata per determinare il tipo di agente patogeno nei pazienti malati. ([Ministero federale della salute](#)). Si legge nella sezione "Quali test sono adatti a cosa":

"I test PCR basati su laboratorio, considerati il gold standard della diagnostica, vengono utilizzati principalmente per determinare, in una persona con sintomi, se vi sia un'infezione da SARS-CoV-2. Un medico può richiedere un test PCR nell'ambito di un trattamento medico. Anche in persone asintomatiche, un test PCR può essere utile per confermare un test antigenico positivo."

Le fonti citate di seguito (A-J) confermano tutte che la PCR (in tutte le sue varianti) può rilevare il frammento genomico di un agente patogeno nella provetta (ad esempio, frammenti di RNA del virus SARS-CoV-2), ma non può stabilire se una persona sia infettata attivamente o infettiva. Solo l'infettività dimostrata può giustificare misure di isolamento, il che con la PCR non è MAI possibile.

Prove nel dettaglio:

2.1.1 Ufficio federale svizzero per la protezione della popolazione

Nel volantino informativo dell'**Ufficio federale svizzero per la protezione della popolazione (BABS)**, pubblicato dal Laboratorio di Spiez, il limite della PCR viene descritto come segue:

"Si possono rilevare solo agenti patogeni di cui è nota la sequenza genetica. Resta sconosciuto se un agente patogeno sia infettivo (virulento, 'vivo') o meno."

La pagina originale non è più disponibile, ma è archiviata sul Web (https://web.archive.org/web/20210706132230/https://www.labor-spiez.ch//pdf/de/dok/pos/88_021_Plakate_PCR_d.pdf).

Il documento è incluso come **ANNEX 2**.

2.1.2. Dr. Antony Fauci

Una dichiarazione fondamentale sull'idoneità del test PCR come parametro per il rischio di trasmissione delle malattie infettive è stata fatta dal **Dr. Antony Fauci, principale "esperto di epidemie e consulente del governo" negli Stati Uniti**, durante una trasmissione su MSNBC del 30 dicembre 2021 (The Rachel Maddow Show) (Washington DC 9:04 PM; [YouTube link](#), al minuto 6:35).

Domanda del giornalista:

"...il test PCR non è nemmeno un buon parametro per la trasmissibilità e l'isolamento? Come si può effettivamente determinare se si è contagiosi durante il ciclo di infezione da Covid? Come si misura ciò, se non con un test PCR o un test antigenico?"

Dr. Fauci:

*"Sì, questa è un'ottima domanda, perché **la PCR non misura il virus replicabile, ma le particelle virali, l'acido nucleico. In altre parole, potrei essere infettato, aver eliminato il virus replicabile, ma potrei continuare a risultare positivo al test PCR per diversi giorni dopo la guarigione, senza essere affatto trasmissibile. Quindi una PCR è utile per dire se si è infetti: se io sono infetto, sì, sono infetto, ma il semplice fatto che sia positiva - come ha detto il direttore del CDC - per diversi giorni o persino settimane dopo non fornisce alcuna indicazione se si è trasmissibili o meno.***

E penso che questa sia la comprensibile confusione che le persone hanno riguardo ai test. I test dicono se si è infetti o meno, ma non se si è infetti e trasmissibili.

L'unico modo per determinare se un'infezione è trasmissibile è dimostrare che il virus è vivo e si replica, ma il test non misura questo. Misura la presenza o l'assenza del virus, e il virus può essere morto, inattivo e non trasmissibile.

Testo originale in inglese:

Question of **Reporter:**
"*...is a PCR test not a good parameter either for transmissibility and isolation? How can people actually tell if they are contagious in the cycle of having covid? How do you measure that if not with either a PCR test or an antigen test?*"

Dr. **Fauci:**
"*Yes, that is a very good question **because PCR doesn't measure replication competent virus it measures viral particles, nucleic acid.** So in other words I could be infected, have cleared the replication competent virus from me **but I can continue to be positive with the PCR for several days after recovering and not being transmissible at all.** So a PCR is good to tell you if you are be - if I am infected yes I am infected but the very fact that it is positive - the CDC director said for several days and even weeks later **it doesn't give you any indication of whether or not you are transmissible.***

And I think that's the understandable confusion that people have about testing. Testing say whether you are infected or not versus are you infected plus transmissible.

***The only way you can tell if it is transmissible if you can show that there really is life replication virus in you and the test don't measure that.** They measure the presence or absence of the virus and the virus can be dead inactive virus that doesn't transmit.*

2.1.3 Prof.ssa Marion Koopmans

Anche **Marion Koopmans**, direttrice del Dipartimento di Scienze Virologiche dell'Università Erasmus e consulente dell'OMS, nonché una delle principali virologhe nella questione del Covid-19 e coautrice della pubblicazione RT-qPCR di Corman/Drosten su Eurosurveillance, ha confermato in un'intervista con NPO Radio 1 (26 novembre 2020, nell'ambito del suo podcast "Virusfeiten" [link al podcast](#)) che la **PCR non è adatta a determinare lo stato di infettività.** (L'intervista inizia al minuto **0:09** su [YouTube link](#)).

Passaggio decisivo dell'intervista con Marion Koopmans (MK):

MK:

"...Circolano alcune storie che dicono: 'Beh, il test PCR non è buono.'"

Intervistatore:

"Almeno, non dimostra necessariamente che si è contagiosi."

MK:

*"Sì, esattamente. Ed è corretto. Perché la PCR mostra che portate con voi l'RNA del virus. Questo è letteralmente ciò che fa la PCR. **E se questo RNA si trova in una particella virale ancora intatta e infettiva o se si tratta solo di frammenti di RNA che possono essere rilevati a lungo dopo un'infezione, non può essere distinto. Si può avere un'idea guardando 'quanto ce n'è?', ma questa differenza non è ben determinabile. Ciò significa che questo test è ottimo per dire 'l'avete avuto', ma è meno adatto per dire 'in questo momento siete ancora contagiosi.'"***

Intervistatore:

"State parlando del test PCR, vero?"

MK:

"Sì."

Testo originale:

MK:

"...er ciruleren wat verhalen waarin gezegd wordt, nou ja, de PCR test ist niet goed."

Intervistatore:

"Althans die toont niet perse aan dat je besmettelijk bent."

MK:

"Ja precies. En dat klopt ook. Want de PCR toont aan dat jij het virus RNA bij je hebt. Dat is letterlijk wat de PCR doet. En of dat RNA in een virus deeltje zit dat nog intact is en ook besmettelijk is, of dat het gewoon restjes RNA zijn, die je nog een tijd lang nadat iemand geïnfecteerd is geweest, kunt aantonen, dat onderscheid zie je niet. Je kunt een beetje een gevoel krijgen door te kijken 'hoeveel is het?', maar dat verschil is niet goed te maken. Dat betekent, die test is prima om te zeggen 'je hebt het gehad', maar die test is minder geschikt om te zeggen 'op dit moment ben je nog besmettelijk.'"

Intervistatore:

"Over de PCR test heb je het nu, huh?"

MK:

"Ja."

2.1.4 Ministero della Salute Svedese

Il **Ministero della Salute Svedese** dichiara sul suo sito ufficiale: <https://www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/publikationsarkiv/v/vagledning-om-kriterier-for-bedomning-av-smittfrihet-vid-covid-19/> "La tecnologia PCR utilizzata nei test per rilevare i virus non può distinguere tra virus in grado di infettare le cellule e virus neutralizzati dal sistema immunitario, **e pertanto questi test non possono essere utilizzati per determinare se qualcuno sia infettivo o meno.** L'RNA dei virus può spesso essere rilevato per settimane (a volte mesi) dopo l'infezione, ma ciò non significa che una persona sia ancora infettiva."

Testo originale:

"PCR-tekniken som används i test för att påvisa virus kan inte skilja på virus med förmåga att infektera celler och virus som oskadliggjorts av immunförsvaret och därför kan man inte använda dessa test för att avgöra om någon är smittsam eller inte. RNA från virus kan ofta påvisas i veckor (ibland månader) efter insjuknandet men innebär inte att man fortfarande är smittsam."

Questa valutazione è stata confermata il **19 aprile 2021**.

2.1.5 National Centre for Infectious Disease di Singapore

Già nel maggio 2020, il **National Centre for Infectious Disease di Singapore** ha pubblicato un position paper in cui, al punto 5, viene sottolineato che:

"È importante notare che il rilevamento di RNA virale tramite PCR non equivale a infettività o alla presenza di virus vitali."

Link al documento originale:

<https://www.ncid.sg/Documents/Period%20of%20Infectivity%20Position%20Statementv2.pdf>

Testo originale:

"...it is important to note that viral RNA detection by PCR does not equate to infectiousness or viable virus."

2.1.6 Pubblicazione su Nature di Wölfel, Drosten sui casi Webasto

In una pubblicazione su **Nature**, che analizza i primi casi di Covid-19 in Germania ([DOI link](#)), gli autori (tra cui **R. Wölfel, C. Drosten e V. Corman**) hanno identificato i casi positivi al SARS-CoV-2 utilizzando la TIB-Molbiol/Roche-PCR per il rilevamento dei geni E e RdRp, confrontando i risultati della PCR con il gold standard: l'isolamento del virus in coltura cellulare.

In merito alla PCR, gli autori hanno sviluppato un sistema diagnostico basato su RT-PCR per:

“...ottenere prove di una replicazione attiva del virus in assenza di istopatologia. Abbiamo condotto test RT-PCR per identificare RNA subgenomico virale direttamente nei campioni clinici. (...) L'RNA subgenomico virale viene trascritto solo nelle cellule infette, non viene confezionato nei virioni e indica quindi la presenza di cellule infette attivamente nei campioni.”

Testo originale:

“To obtain proof of active virus replication in the absence of histopathology, we conducted RT-PCR tests to identify viral subgenomic RNAs directly in clinical samples. (...) Viral subgenomic mRNA is transcribed only in infected cells and is not packaged into virions, and therefore indicates the presence of actively infected cells in samples.”

Questo significa che, sin dalle prime analisi, era noto e pubblicato che le **RT-qPCR comuni**, progettate per rilevare l'RNA genomico del SARS-CoV-2, **non potevano determinare la presenza di un virus replicante attivo nel campione**. Da quel momento, le raccomandazioni della WHO avrebbero dovuto spostarsi verso il rilevamento di RNA subgenomico, un metodo più preciso rispetto al rilevamento genomico ma che, comunque, indica solo la probabilità di replicazione virale a livello di RNA, senza fornire una prova definitiva della presenza di un virus infettivo.

2.1.7 Articolo su Nature Reviews di Isabella Eckerle (Ginevra)

In una revisione pubblicata il 2 dicembre 2022 su **Nature Reviews Microbiology** ([DOI link](#)), viene chiaramente evidenziato che la RT-PCR non è adatta a rilevare virus infettivi né a diagnosticare con certezza persone infette (contagiose). È significativo che questa pubblicazione sia stata coautorizzata da **Isabella Eckerle**, una stretta collaboratrice di Christian Drosten.

Citazioni principali:

1. Introduzione, primo paragrafo:

“Il rilevamento dell'RNA virale nei campioni respiratori tramite RT-PCR è altamente sensibile e specifico, ma non distingue tra virus replicabili e RNA residuo. Questo

perché l'RNA virale (rilevato dalla RT-PCR) rimane rilevabile in assenza di virus infettivi, mentre la positività dei test Ag-RDTs è meglio correlata alla presenza di virus infettivi.

Originale:

“Although detection of viral RNA in respiratory specimens by RT-PCR is highly sensitive and specific, it does not distinguish between replication-competent virus and residual RNA. This is because viral RNA (which would be picked up by RT-PCR) remains detectable in the absence of infectious virus, whereas positivity of Ag-RDTs better correlates with the presence of infectious virus.”

2. **Sotto il titolo “Detection of RNA viral load”:**

“Sebbene la RT-PCR non possa determinare direttamente l'infettività, data la sua incapacità di distinguere tra virus replicabili (infettivi) e RNA residuo (non infettivo), si è cercata una correlazione tra la carica virale di RNA e la presenza di virus infettivi.”

Originale:

“Although RT-PCR cannot directly determine infectiousness owing to its inability to differentiate between replication-competent (infectious) virus and residual (non-infectious) viral RNA, a correlation between RNA viral load and the presence of infectious virus has been sought.”

3. **Sotto il titolo “SARS-CoV-2 diagnostic in public health”:**

“Sfortunatamente, non esiste attualmente alcun test diagnostico Point-of-Care per determinare l'infettività del SARS-CoV-2 in un campione di paziente, e la coltura virale descritta sopra non è adatta a scopi diagnostici. Pertanto, è stata proposta una serie di approcci per trovare un valore approssimativo dell'infettività per guidare i periodi di isolamento.”

Originale:

“Unfortunately, no point-of-care diagnostic test currently exists to determine infectious SARS-CoV-2 in a patient sample, and virus culture as described above is not suited for diagnostic purposes. Thus, a range of approaches have been suggested to find a proxy for infectiousness to guide isolation periods.”

Nota:

Questa affermazione proviene dal dicembre 2022, quasi tre anni dopo l'introduzione della RT-qPCR come test diretto (Point of Care) per persone presumibilmente infette nei centri di test, come base per calcolare incidenze, valori R e misure conseguenti! Tale affermazione viene ulteriormente sottolineata nelle conclusioni dello studio:

4. **Nella sezione “Conclusions”:**

“Sebbene durante la pandemia siano stati fatti molti progressi nel campo della diagnostica, ad oggi non esistono test diagnostici che determinino in modo affidabile la presenza di virus infettivi.”

Originale:

“Although much progress has been made during the pandemic in the field of diagnostics, to date, no diagnostic tests exist that reliably determine the presence of infectious virus.”

2.1.8 Zentrum für Evidenzbasierte Medizin

Sotto il titolo „PCR-Positivi: Cosa significa?“ (originale: “PCR positives: what do they mean?“), in un articolo pubblicato il 17 settembre 2020 sul sito del [Centre for Evidence-Based Medicine \(link originale\)](#), viene discussa l'interpretazione dei risultati della RT-PCR per il rilevamento di SARS-CoV-2.

Facendo riferimento a una revisione condotta da Jefferson T – inizialmente un preprint e successivamente pubblicata nel dicembre 2021 sulla rivista “Clinical Infectious Diseases” ([Viral Cultures for Coronavirus Disease 2019 Infectivity Assessment: A Systematic Review - PubMed](#)) – viene tratto il seguente punto chiave:

*“Il rilevamento tramite PCR di virus è utile, purché la sua accuratezza sia comprensibile: offre la capacità di rilevare RNA in quantità minime, **ma potrebbe non essere chiaro se questo RNA rappresenti un virus infettivo.**”*

Testo originale:

*“PCR detection of viruses is helpful so long as its accuracy can be understood: it offers the capacity to detect RNA in minute quantities, **but whether that RNA represents infectious virus may not be clear.**”*

Conclusione esplicita del riassunto della pubblicazione:

“Per la trasmissione sono necessari virus vivi completi, non i frammenti identificati tramite PCR. I test di routine prospettici su campioni di riferimento e di coltura e la loro relazione con sintomi, segni e cofattori dei pazienti dovrebbero essere utilizzati per determinare l'affidabilità della PCR nella valutazione del potenziale infettivo. È improbabile che i campioni con un Ct alto abbiano un potenziale infettivo.”

Testo originale:

*“Conclusions: **Complete live viruses are necessary for transmission, not the fragments identified by PCR.** Prospective routine testing of reference and culture specimens and their relationship to symptoms, signs, and patient co-factors should be used to define the reliability of PCR for assessing infectious potential. Those with high Ct are unlikely to have infectious potential.”*

2.1.9 Informazioni dalla Cleveland Clinic

Per quanto riguarda la domanda sul motivo per cui un test PCR possa risultare positivo anche se le persone interessate non sono né sintomatiche né contagiose, una [pagina informativa della Cleveland Clinic](#) ([PCR Test for COVID-19: What It Is, How It's Done, What The Results Mean](#)) afferma:

"Questo significa che il test può continuare a rilevare frammenti del virus SARS-CoV-2 anche dopo che vi siete ripresi dal COVID-19 e non siete più contagiosi. Potreste quindi continuare a risultare positivi se in passato avete contratto il COVID-19, anche se non siete più in grado di trasmettere il virus SARS-CoV-2 ad altri."

Testo originale:

"This means that the test can continue to detect fragments of SARS-CoV-2 virus even after you've recovered from COVID-19 and are no longer contagious. So you may continue to test positive if you've had COVID-19 in the distant past, even though you can't spread the SARS-CoV-2 virus to others."

2.1.10 Informazioni ufficiali del Governo Canadese

Anche il [Governo Canadese](#), noto per le sue misure particolarmente severe contro il COVID-19, aveva già confermato, con ultima modifica al 10 giugno 2021, nel capitolo „Valori CT e Infettività“ (*originale: „Ct values und infectiousness“*), che una persona viene considerata infettiva:

„...se espelle particelle virali che sono integre e in grado di infettare altri. I test PCR non possono distinguere tra materiale genomico virale proveniente da particelle virali integre in persone infettive e frammenti di particelle virali presenti in individui che si sono ripresi.“

Testo originale:

"A person is deemed infectious if they shed virus particles that are intact and able to go on to infect others. PCR tests cannot distinguish viral genomic material coming from intact viral particles in persons who are infectious or viral particle fragments that are present in individuals who have recovered."

2.1.11 Linea guida del CDC sull'Influenza

Quanto affermato per la diagnosi PCR di SARS-CoV-2 era già valido in precedenza per l'influenza, secondo le linee guida del CDC. L'aspetto qui menzionato per SARS-CoV-2, e supportato da numerosi riferimenti, che un risultato positivo di un test PCR non equivale a un'infezione attiva né fornisce alcuna indicazione sul fatto che una persona sia infettiva (contagiosa), è stato esplicitamente sottolineato dal CDC nel contesto della diagnostica influenzale sul proprio sito web ([Information on Rapid Molecular Assays, RT-PCR, and other Molecular Assays for Diagnosis of Influenza Virus Infection | CDC](#)). Con ultima modifica al 21 ottobre 2019, la conclusione sotto la sezione „Interpretazione dei risultati dei test“ (interpretation of testing results) è la seguente:

„Un risultato positivo indica che nell'esemplare respiratorio analizzato sono state rilevate RNA o acidi nucleici del virus influenzale, confermando un'infezione da virus influenzale, ma ciò non significa necessariamente che sia presente un virus infettivo o che il paziente sia contagioso.“

Testo originale:

“A positive result indicates detection of influenza viral RNA or nucleic acids in the respiratory specimen tested, confirming influenza virus infection, but does not necessarily mean infectious virus is present or that the patient is contagious.”

Già nell'introduzione (Background) si legge:

„Il rilevamento di RNA o acidi nucleici del virus influenzale attraverso test molecolari non indica necessariamente il rilevamento di un virus vitale o di una replicazione in corso del virus influenzale.“

Testo originale:

“Notably, the detection of influenza viral RNA or nucleic acids by molecular assays does not necessarily indicate detection of viable virus or on-going influenza viral replication.”

2.1.12 Ministero della Salute Australiano e valutazione dei "Fact-checker"

Il senatore **Gerd Rennik** ha chiesto l'11 novembre 2021 all'**autorità australiana per i farmaci TGA (Therapeutic Goods Administration)** se il test PCR fosse in grado di «distinguere tra un virus vivo e uno morto». L'autorità ha risposto il 31 gennaio 2022, come riportato nell'Annex 6:

„I test PCR sono altamente sensibili e rilevano il materiale genetico del virus SARS-CoV-2, ma non possono distinguere tra il virus vivo e quello morto. (...)

Talvolta, quando il virus non è più vivo e non si replica più, frammenti genetici virali possono essere rilevati tramite PCR, dando risultati debolmente positivi.

Testo originale:

“While PCR tests are highly sensitive and detect the genetic material of the SARS-CoV-2 virus, they cannot differentiate between live and dead virus. (...) Sometimes, when the virus is no longer alive and replicating, viral genetic fragments can be detected by PCR and produce weak positive results.”

Nel „**Fact-check della DPA**“ del 20 maggio 2022 ([Australische Behörde betont Wert von PCR-Tests](#)), viene sottolineato sin dall'introduzione che:

„È indiscutibile che i test PCR utilizzati per determinare le infezioni da coronavirus non siano infallibili al 100%.“

Testo originale:

„Dass die PCR-Tests zur Feststellung von Corona-Infektionen nicht hundertprozentig fehlerfrei sind, ist unbestritten.“

Più avanti, viene ribadito:

„È noto che i test PCR possano produrre sia risultati falsi negativi che falsi positivi fin da quando esistono.“

Testo originale:

„Die Tatsache, dass es bei PCR-Tests sowohl zu falsch-negativen als auch zu falsch-positiven Testergebnissen kommen kann, ist bekannt, seit es solche Tests gibt.“

Anche i **"Fact-checker di Correctiv"**, in un articolo del 14 giugno 2022 ([Australische Arzneimittelbehörde erklärte PCR-Tests nicht für sinnlos](#)), riportano:

„Il Ministero della Salute australiano ha dichiarato che i test PCR rilevano la presenza di materiale genetico del coronavirus, anche se il virus non può più replicarsi. Questo è noto da tempo e non implica che i test siano privi di valore.“

Testo originale:

„Das australische Gesundheitsministerium hat erklärt, dass PCR-Tests das Vorhandensein von Erbmateriale des Coronavirus nachweisen, auch wenn das Virus

sich nicht mehr vermehren kann. Das ist lange bekannt und bedeutet nicht, dass die Tests keine Aussagekraft haben.“

Nel testo viene citato **Friedemann Weber**, direttore dell'Istituto di Virologia della Justus-Liebig-Universität di Gießen, che ha dichiarato a Correctiv:

„I PCR non possono effettivamente distinguere se un materiale genetico proviene da un virus in fase di replicazione oppure no. Tuttavia, quel materiale genetico deve essere stato prodotto in qualche modo, e ciò può derivare solo da un'infezione.“

Testo originale:

„PCR kann tatsächlich nicht erkennen, ob ein Genmaterial von einem sich vermehrenden Virus stammt oder nicht. Allerdings muss das Genmaterial ja irgendwie mal produziert worden sein. Und das kann eigentlich nur von einer Infektion stammen.“

Weber aggiunge che, **nella fase finale di un'infezione, il segnale PCR può effettivamente derivare da particelle inattivate dal sistema immunitario.**

„Ma anche in quel caso, è necessario che vi sia stata un'infezione in precedenza.“

Infine, nel "Fact-check" viene evidenziato che:

„Un test PCR positivo indica un'infezione con una probabilità del 98%.“

Tuttavia, questa probabilità del 98% si applica solo a un gruppo con un'alta incidenza di malattia, in base alla cosiddetta „probabilità pre-test“ o prevalenza (vedi anche il capitolo 3.4). Questo concetto è stato chiaramente illustrato nel 2022 da Christel Weiß, biostatistica di Mannheim, in un articolo pubblicato in Notfall Rettungsmed ([SpringerLink](#)).

Dettagli statistici:

- Con una sensibilità del 99% e una specificità del 99,5% per un test PCR, in una popolazione con alta prevalenza (20%), come in un gruppo ad alto rischio in una casa di cura, su 10.000 test ci si aspetta che 2020 risultino positivi, di cui 40 falsi positivi.
- Con una bassa prevalenza (1%), come nei test di massa su una popolazione sana (es. adolescenti), **un terzo dei risultati positivi sarà falso**. Nella tabella dell'articolo, su 10.000 adolescenti testati, si calcola che, tra 100 infetti reali, ci siano 99 positivi autentici e 49,5 falsi positivi.

Nella sintesi si ribadisce:

„Una positività rilevata da un test PCR non significa necessariamente che la persona sia contagiosa o malata.“

2.1.13. Sito del RKI sulla valutazione della PCR come non infettiva

Sul sito del **RKI (Robert Koch Institut)** dedicato al tema „Hinweise auf Testungen von Patientinnen und Patienten auf SARS-CoV-2“ ([linee guida sui test per pazienti con SARS-CoV-2, consultato il 02.08.2023](#)), nella sezione intitolata „Positive PCR-Ergebnisse bei Genesenen“ si legge:

„A differenza dei virus replicabili, l'RNA virale di SARS-CoV-2 può essere rilevata tramite RT-PCR in molti pazienti convalescenti anche settimane dopo l'insorgenza dei sintomi (Xiao et al., 2020; Zheng et al., 2020; Zhou et al., 2020). **È stato dimostrato già all'inizio della pandemia che questi risultati positivi della RT-PCR nei pazienti convalescenti non sono necessariamente associati alla contagiosità**, sia attraverso la conduzione parallela di test PCR e colture virali (Bullard et al., 2020; Covid-Investigation Team, 2020; Singanayagam et al., 2020; Wolfel et al., 2020) sia attraverso uno studio su larga scala del CDC coreano, che ha esaminato i contatti di pazienti convalescenti con un risultato positivo della PCR ripetuto (Korea Centers for Disease Control, 2020).“

Testo originale:

„Im Unterschied zu replikationsfähigem Virus ist SARS-CoV-2 virale RNA bei vielen konvaleszenten Patienten noch Wochen nach Symptombeginn in der RT-PCR nachweisbar (Xiao et al., 2020; Zheng et al., 2020; Zhou et al., 2020). Dass diese positiven RT-PCR-Ergebnisse bei konvaleszenten Patienten nicht zwingend mit Kontagiosität gleichzusetzen sind, wurde bereits zu Beginn der Pandemie demonstriert, zum einen durch die parallele Durchführung von PCR und Virusanzucht (Bullard et al., 2020; Covid-Investigation Team, 2020; Singanayagam et al., 2020; Wolfel et al., 2020) und zum anderen durch eine großangelegte Studie des koreanischen CDC, die unter anderem Kontaktpersonen von genesenen Patienten mit erneut positiver PCR untersuchte (Korea Centers for Disease Control, 2020).“

Questa dichiarazione conferma che, secondo il RKI, era noto già nelle fasi iniziali della pandemia che un risultato positivo della PCR non equivale necessariamente a contagiosità (Kontagiosität). Questo fatto contraddice chiaramente l'uso improprio dei risultati positivi della PCR per giustificare misure di isolamento.

La preparazione dei campioni esclude il rilevamento di virus replicabili

Un altro aspetto importante nella valutazione della domanda se un test RT-qPCR possa fornire informazioni sull'infettività di una persona risultata positiva, ossia fino a che punto il risultato positivo dell'RT-qPCR possa indicare la presenza di virus replicabili, riguarda la preparazione del campione per l'RT-qPCR.

Dal materiale prelevato tramite tampone deve essere isolato l'RNA del gene ricercato (in questo caso il genoma del virus SARS-CoV-2) per poterlo utilizzare nel rilevamento genetico tramite RT-qPCR. Un passaggio cruciale in questo processo è la denaturazione completa di tutto il materiale biologico e la separazione delle componenti principali: proteine, lipidi e acidi nucleici, per ottenere infine solo l'RNA come base di partenza per l'RT-qPCR. Il protocollo originale sviluppato da Chomczynski e Sacchi nel 1987 ([PubMed 1](#); [PubMed 2](#)) è tuttora parte integrante di quasi tutti i protocolli per la purificazione del materiale biologico al fine di isolare l'RNA, sia che venga eseguito in laboratorio sia che si utilizzino kit di estrazione acquistati. Le componenti della soluzione di estrazione originale includono fenolo/cloroformio e alcool isoamilico, oppure, in alcune soluzioni commerciali modificate, sostanze simili ma meno tossiche. Tutte queste soluzioni hanno in comune la capacità di distruggere completamente qualsiasi struttura biologica vivente o replicabile.

Questo implica che: **nel processo di laboratorio di preparazione di un campione prelevato con tampone, che precede necessariamente l'RT-qPCR, ogni materiale biologico – che si tratti di una cellula vitale, un virus replicabile o anche solo frammenti cellulari e residui genetici – viene denaturato a tal punto che non è più possibile determinare se il materiale provenga da un organismo integro e replicabile o da campioni già danneggiati o distrutti.** A causa di questo processo di estrazione e preparazione, non è in alcun modo possibile concludere, sulla base di un risultato positivo dell'RT-qPCR, che frammenti genomici rilevati indichino la presenza di virus replicabili nel campione prelevato con tampone. Si può rilevare solo l'RNA isolato, indipendentemente dalla sua origine.

2.3. Conclusione intermedia:

Anche qualora la PCR, inclusi tutti i passaggi preparatori (progettazione e stabilizzazione della PCR, prelievo del campione, preparazione e esecuzione della PCR), venga eseguita in maniera impeccabile e il test risulti positivo, ossia riconosca una sequenza genomica eventualmente presente in un virus "Corona" (SARS-CoV-2), questa tecnica **non può in alcun caso dimostrare che la persona risultata positiva sia infetta da un SARS-CoV-2 replicante e di conseguenza contagiosa = pericolosa per altri individui.**

Una maggiore plausibilità di un risultato positivo della PCR riguardante un'infezione virale, in particolare un virus replicante nei tessuti, sarebbe stata fornita dal rilevamento dell'RNA subgenomico, descritto nella pubblicazione citata al punto 2.1.F. **Poiché questo sgRNA si manifesta solo durante la formazione di nuovi virus in una cellula infetta, potrebbe essere considerato come indicatore (e non come prova) di un'infezione virale attiva.** Questo aspetto è ben descritto nella pubblicazione menzionata al punto 2.1.G, sotto la sezione "SARS-CoV-2 diagnostics in public health":

"Un esempio è il rilevamento di trascritti sgRNA, che vengono generati durante la replicazione virale, in particolare durante la sintesi dell'RNA a filamento negativo. Sebbene le sgRNA vengano trascritte nelle cellule infette, non sono incorporate nei virioni e possono quindi servire come **indicatore di una replicazione attiva e dunque di virus infettivi.** Sono stati sviluppati specifici test RT-PCR per rilevare le sgRNA in aggiunta al rilevamento diagnostico dell'RNA genomico del SARS-CoV-2, **ma tali test non sono stati introdotti nell'uso diagnostico di routine a causa della loro sensibilità inferiore rispetto ai test RT-PCR convenzionali.**

[...]

Pertanto, se l'assenza di sgRNA indica una mancanza di replicazione virale, **la presenza di sgRNA non indica necessariamente infettività."**

Testo originale:

"One example is the detection of sgRNA transcripts, which are generated during virus replication, and specifically the synthesis of negative-strand RNA. Although sgRNAs are transcribed in infected cells, they are not packaged in the virions and can therefore serve as an indicator of active replication and thus of infectious virus. Specific RT-PCR assays were developed to detect sgRNAs in addition to the diagnostic detection of genomic SARS-CoV-2 RNA, but such assays have not made their way into routine diagnostic use owing to their lower sensitivity than conventional RT-PCR assays.

[...]

Thus, although the absence of sgRNA would indicate absence of viral replication, the presence of sgRNA does not necessarily indicate infectiousness."

In generale, per determinare un'infezione attiva e valutare se una persona "produca" e rilasci virus contagiosi, è necessario impiegare metodi diagnostici concreti, oltre alla valutazione dei sintomi clinici, come l'isolamento di virus replicabili (Gold Standard). Su questo argomento, sotto la sezione "Detection of infectious Virus" nella pubblicazione citata al punto 2.1.G, si trova la seguente affermazione:

"Il gold standard per determinare la presenza di virus infettivi (cioè replicanti) nei campioni respiratori è il recupero del virus in colture cellulari, una procedura comunemente definita isolamento virale."

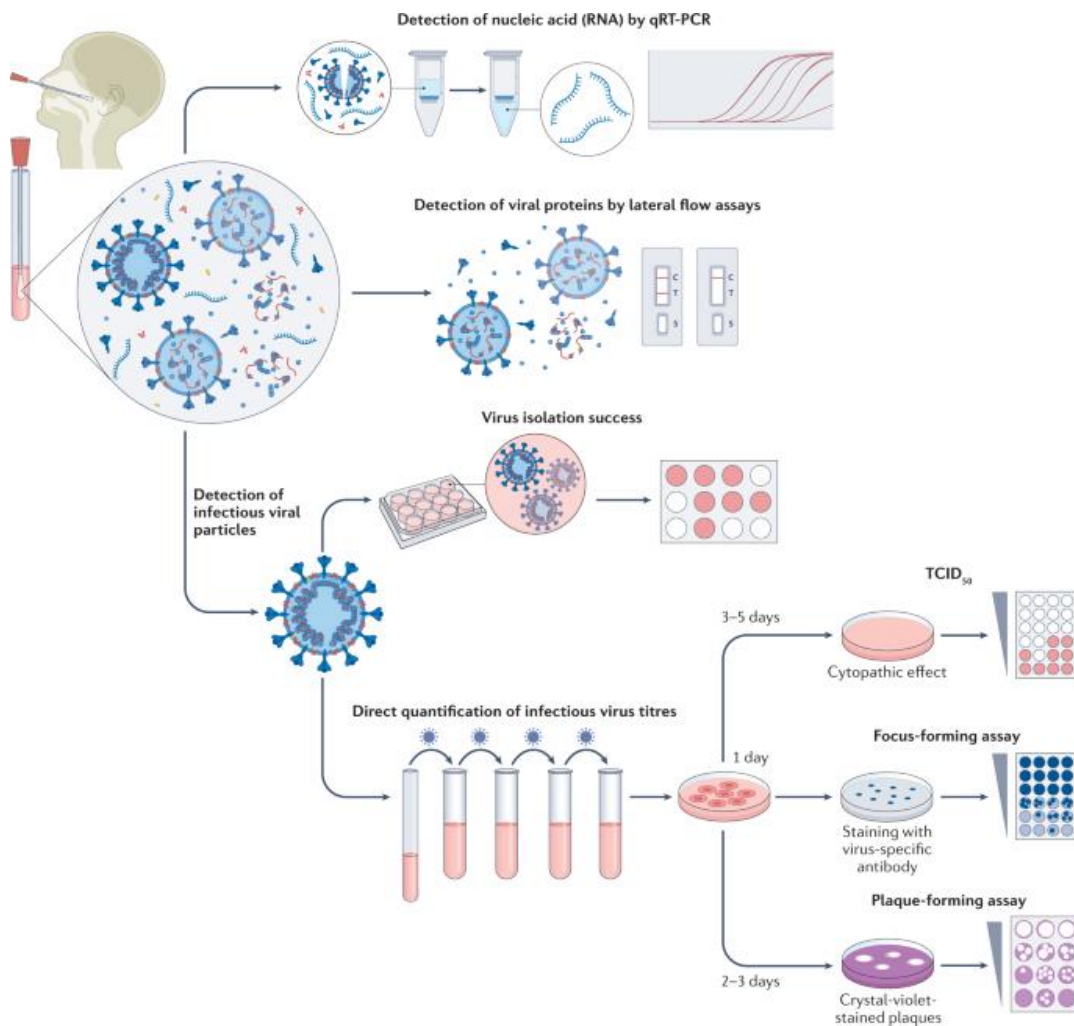
Testo originale:

"The gold standard for determining the presence of infectious (that is, replication competent) virus in respiratory specimens is the recovery of virus in cell culture, a procedure that is commonly termed virus isolation."

2.1. Illustrazione

A scopo di migliorare la comprensione, riportiamo qui di seguito l'**Illustrazione 1** tratta dal lavoro scientifico disponibile al link (<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>). Questa figura rappresenta visivamente le diverse metodologie di rilevamento:

- Il rilevamento dell'acido nucleico virale (RNA) tramite RT-qPCR (denominata qRT-PCR nella figura).
- Il rilevamento dei componenti proteici virali tramite test rapido dell'antigene (lateral-flow assay).
- Il rilevamento di virus infettivi tramite varie metodologie di isolamento in colture cellulari.



Legenda dell'illustrazione:

Per il rilevamento della carica virale di **SARS-CoV-2**, vengono utilizzati campioni prelevati tramite tampone dal rinofaringe o dall'orofaringe. I metodi illustrati includono: **Rilevamento di acidi nucleici virali (RNA) mediante PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR):** L'RNA virale viene estratto da virus lisati, trascritto in DNA complementare (cDNA) e amplificato mediante qPCR utilizzando primer specifici per una o più regioni bersaglio nel genoma virale. Il ciclo di amplificazione in cui il segnale della sonda supera la soglia definita (soglia del ciclo, o cycle threshold - Ct) indica la quantità di RNA virale presente. La carica virale può essere espressa come numero di copie di RNA virale per millilitro o in termini del valore Ct specifico per il test. **Lateral Flow Assays (test rapido dell'antigene):** Rilevano la presenza di proteine virali specifiche nei particelle virali lisate. Nei test diagnostici rapidi per l'antigene, si utilizza comunemente la proteina nucleocapsidica di SARS-CoV-2. **Rilevamento di virus infettivi (replicanti) tramite colture cellulari: Isolamento virale:** Il medium contenente il virus infettivo viene applicato su una monostrato di cellule. Il successo dell'isolamento è determinato dall'insorgenza di un effetto citopatico (CPE) circa 3-5 giorni dopo l'infezione. Le aree bianche indicano la presenza di effetti citopatici nelle cellule. **Quantificazione del titolo virale infettivo:** Si utilizzano diluizioni seriali dei campioni respiratori per inoculare cellule monostrato. Con il metodo **TCID₅₀** (dosi infettive al 50% in coltura cellulare), l'effetto citopatico indotto dal virus viene determinato al microscopio 3-5 giorni dopo l'infezione. **Focus-forming assays:** Le cellule infettate vengono fissate un giorno dopo l'infezione e sottoposte a immunocolorazione con anticorpi specifici per il virus per rilevare i gruppi di cellule infette (foci). I foci che indicano la presenza di virus infettivi sono rappresentati in **blu**. **Saggi di formazione di placche:** I piatti vengono fissati 2-3 giorni dopo l'infezione e colorati con cristallo violetto; le depressioni contenenti singole placche vengono utilizzate per determinare il titolo virale. Le placche che indicano la presenza di virus infettivi sono rappresentate in **bianco**.

3. Fattori che influenzano l'affidabilità del test PCR

In realtà, i risultati di un test PCR dipendono da una serie di parametri che, da un lato, possono introdurre notevoli incertezze e, dall'altro, possono essere influenzati in modo tale da generare un numero elevato o ridotto di risultati (apparentemente) positivi.

3.1. Progettazione della PCR e specificità

Una PCR può essere progettata in modo molto efficace utilizzando banche dati (ad esempio, GenBank, GISAID) e software consolidati (i cosiddetti programmi di ricerca dei primer). In questo processo, l'obiettivo del test (cosa deve essere rilevato e con quale precisione) determina i requisiti della regione target utilizzata e la corrispondenza dei primer.

Se l'obiettivo è effettuare una ricerca generale di rappresentanti di un ampio gruppo di virus simili (ad esempio, tutti i coronavirus), i primer vengono posizionati in quelle che vengono chiamate regioni conservate e specifiche del gruppo. Questo è paragonabile a dire a un software: "Riconosci in modo affidabile tutte le auto rosse in un parcheggio (ma non camion, motociclette o veicoli di altri colori)." Con questa impostazione, è possibile verificare se in un campione siano presenti tracce genetiche di un rappresentante del gruppo di virus ricercato (ad esempio, coronavirus).

Se si desidera rilevare solo un sottogruppo (ad esempio, i Sarbecovirus all'interno dei coronavirus), analogamente a un marchio specifico all'interno della categoria delle auto rosse, i primer possono essere progettati per essere specifici del sottogruppo. Questo approccio è stato utilizzato, ad esempio, per il gene "E" e il gene RdRp nella PCR raccomandata dall'OMS, progettata dalla Charité (Corman/Drosten), per identificare il gruppo dei Sarbecovirus, al quale appartiene il SARS-CoV-2.

Tuttavia, è anche possibile (non sempre, ma spesso) progettare una PCR altamente specifica in grado di rilevare e amplificare esclusivamente il gene ricercato (ad esempio, il gene virale di SARS-CoV-2). Analogamente, sarebbe come riconoscere un modello specifico all'interno del gruppo delle auto rosse di un determinato marchio. Per fare ciò, il design deve assicurare che la regione utilizzata non abbia omologie con virus strettamente correlati (ad esempio, SARS1 o virus dei pipistrelli correlati a SARS-CoV-2) o con altre firme genetiche già note (genoma umano o altri organismi).

I programmi di ricerca possono rendere questo processo molto affidabile. Nella qPCR si aggiunge un terzo frammento genetico, che deve reagire specificamente solo con la regione genica ricercata: la "sonda".

Di conseguenza, un buon design PCR prevede due elementi altamente specifici per una PCR standard e tre per una qPCR (primer/sonde), progettati per riconoscere esclusivamente le sequenze target desiderate, consentendo così il rilevamento estremamente specifico del gene bersaglio.

Anche per SARS-CoV-2 sarebbe stato possibile progettare una PCR così specifica, ma ciò non è stato fatto nei protocolli iniziali e fondamentali dell'OMS.

Dopo il design, è essenziale testare in laboratorio la coppia di primer e la sonda su campioni reali. A tal fine, sono necessari campioni sicuri contenenti il materiale genetico da identificare (ad esempio, campioni di persone sicuramente infettate da SARS-CoV-2 o, idealmente, un isolato virale completamente caratterizzato). Inoltre, è necessario disporre di un ampio spettro di virus e di altri agenti patogeni che possono causare sintomi simili nei pazienti, ma che non devono generare alcun segnale con la PCR utilizzata.

Quando tutte queste condizioni sono soddisfatte, e la PCR rileva esattamente il gene target desiderato dal progettista – sia esso un'intera famiglia di virus o un singolo patogeno specifico – e questo risultato è dimostrato senza ambiguità attraverso test sperimentali completi con controlli positivi e negativi, il design può essere considerato affidabile e specifico, idoneo a supportare una diagnosi clinica.

3.2. Numero dei geni target indipendenti

Nel protocollo pubblicato inizialmente dall'OMS il 13 gennaio 2020, intitolato "*Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time PCR*" ([link al documento](#)), viene descritta una sequenza di rilevamento tramite PCR di tre geni indipendenti del virus successivamente rinominato SARS-CoV-2. La sequenza faceva riferimento al gene E, al gene RdRp e successivamente al gene N. Tuttavia, già il 17 gennaio 2020 l'OMS modificò il protocollo con una nuova versione intitolata "*Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time PCR*" ([link al documento](#)), eliminando il gene N come target. Di conseguenza, invece delle tre regioni target originali, ne furono raccomandate solo due.

Il 2 marzo 2020, in un'ulteriore versione aggiornata del protocollo di test dell'OMS, intitolata "*Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases*" ([link al documento](#)), viene indicato quanto segue:

"...In aree in cui il virus COVID-19 è ampiamente diffuso, potrebbe essere adottato un algoritmo più semplice, in cui, ad esempio, lo screening tramite RT-PCR di un singolo target discriminatorio è considerato sufficiente..."
(traduzione dall'inglese, pagina 3, in basso).

Di conseguenza, molti laboratori adottarono un approccio semplificato analizzando un solo gene target, spesso focalizzandosi esclusivamente sul gene E, come descritto esplicitamente dal laboratorio di Augusta il 3 aprile 2020 ([link all'archivio web](#)).

L'importanza fondamentale del numero di geni target indipendenti analizzati nei test PCR, specialmente nei test singoli non specifici come quelli raccomandati dall'OMS tramite il

protocollo della Charité (successivamente adottato rapidamente e su larga scala da TIB MolBiol/Roche a livello globale), può essere illustrata da un esempio di calcolo pratico.

Secondo il protocollo iniziale dell'OMS per il rilevamento del SARS-CoV-2, erano previste tre regioni target: il gene **E**, il gene **RdRp** e il gene **N**. Questi geni sono stati rapidamente implementati in diversi sistemi di test, sia di laboratorio che commerciali.

Un primo *ring test* condotto dall'Istituto Instant e.V. ([link al rapporto](#)) ha determinato la specificità media dei test per queste regioni target:

Gene target del SARS-CoV-2	Numero di kit testati	Specificità con sola coltura cellulare	Specificità con Coronavirus correlati (HCoV 229E)	%	Specificità media assoluta	Tasso di errore medio (1-specificità)
E	24	99,46%	95,17%	97,31	0,9731	0,0269
RdRp	13	97,80%	90,66 %	94,23	0,9423	0,0577
N	21	98,20%	87,95 %	93,08	0,9308	0,0692

In una popolazione mista di 100.000 test, anche senza alcuna persona effettivamente infetta, il tasso medio di errore porterebbe ai seguenti risultati:

- **Con un test che rileva solo il gene E:**
 $100.000 \times 0,0269 = 2.690$ falsi positivi
- **Con test sequenziali che rilevano i geni E e RdRp:**
 $100.000 \times (0,0269 \times 0,0577) = 155$ falsi positivi
- **Con test che rilevano tutti e tre i geni (E, RdRp e N):**
 $100.000 \times (0,0269 \times 0,0577 \times 0,0692) = 10$ falsi positivi

Ciò significa che la direttiva dell'OMS del marzo 2020, prima della dichiarazione ufficiale della pandemia, di ridurre progressivamente il numero di geni target analizzati nei test da tre a uno (mantenendo al contempo i parametri originali della PCR del "protocollo Corman/Drosten" per SARS-CoV-2), ha portato a un aumento significativo dei falsi positivi. Nello specifico,

l'esempio sopra mostra un aumento da 10 falsi positivi (con tre target) a quasi 2.700 (con solo il gene E) per ogni 100.000 test effettuati.

Se i 100.000 test effettuati fossero rappresentativi di 100.000 cittadini di una città o distretto nell'arco di 7 giorni, l'impatto sulla "incidenza a 7 giorni" derivante dal numero di geni target analizzati si tradurrebbe in una differenza significativa:

- **10 casi** (con 3 "Target")
- **155 casi** (con 2 "Target")
- **2690 casi** (con 1 "Target").

Questa differenza influenzerebbe direttamente la gravità delle restrizioni alla libertà imposte ai cittadini.

Valutazione intermedia: L'esempio di calcolo dimostra come la manipolazione dei parametri relativi ai geni target da rilevare nei laboratori possa influenzare il numero giornaliero di casi positivi. Considerando le enormi conseguenze delle decisioni politiche basate sui numeri assoluti di test positivi e sulla "incidenza a 7 giorni" derivata, l'indicazione dell'OMS (e anche del RKI) di ridurre il numero di geni target è chiaramente risultata idonea ad amplificare artificialmente la "pandemia" tramite direttive di test errate, con un fattore di aumento fino a 300.

Questo approccio è privo di basi scientifiche, causando da un lato enormi restrizioni personali attraverso quarantene o isolamenti imposti a individui erroneamente "testati positivi" e, dall'altro, accettando deliberatamente le gravi limitazioni e i danni sociali ed economici derivanti dalla "incidenza a 7 giorni". Inoltre, questa metodologia ha gettato le basi per giustificare la "necessità di vaccinazione".

Se fosse stata applicata in modo coerente la corretta analisi basata su tre geni, o addirittura fino a sei (come inizialmente adottato in Thailandia), il tasso di test positivi e, di conseguenza, l'"incidenza a 7 giorni" si sarebbe ridotto quasi a zero.

3.3. Numero di cicli effettuati (valore Ct) nella qPCR

“Le persone infettive hanno in genere una carica virale RNA superiore a 10^6 copie genomiche per millilitro, che corrisponde in gran parte a un valore Ct di 25 nella maggior parte dei test RT-PCR.”

Questa definizione di un valore Ct significativo è esplicitamente riportata nella già citata revisione pubblicata il 2 dicembre 2022 su *Nature Reviews Microbiology*, nel capitolo **“SARS-CoV-2 Diagnostics in public health”**, e riassume in modo efficace gli aspetti discussi di seguito.

Nel testo originale: "*Infectious individuals typically have RNA viral loads of $>10^6$ genome copies per millilitre, which corresponds largely with a Ct of 25 in most RT-PCR assays.*"

3.3.1 Importanza del valore Ct

Oltre al numero di geni target rilevati, soprattutto quando viene analizzato solo uno o al massimo due, il numero di cicli di amplificazione nella qPCR necessari per dichiarare un test "positivo" e il conseguente valore Ct rappresentano un parametro cruciale. Più basso è il valore Ct di un campione nella qPCR, maggiore è la quantità iniziale di DNA presente nel campione.

Questo parametro si correla, in condizioni standardizzate, con la quantità iniziale di genomi virali presenti nel campione, ossia la cosiddetta *carica virale*. Questa carica virale, idealmente espressa come "numero di copie virali per millilitro di campione", è correlata nel caso di SARS-CoV-2 alla capacità di isolamento di virus infettivi in coltura cellulare, come già pubblicato nel marzo 2020 (*Figura 1e in Wölfel et al.*, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>).

È stata necessaria una quantità minima di **10^6 copie di RNA/ml** per isolare virus dalle colture cellulari. In un successivo studio condotto con la partecipazione di C. Drosten, pubblicato nel maggio 2021, si è osservato che erano necessarie in media **10^8 copie virali** per ottenere un risultato positivo in coltura cellulare (*Supplemental Figure S4*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34035154/>).

In quest'ultimo studio, si è inoltre rilevato che nessuna delle 25.381 persone testate presentava una carica virale inferiore a **10^5 copie genomiche/ml** nel campione (*Tabella S1*). Al contrario, la RT-qPCR basata sul protocollo originale (*Corman V et al.*, <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>) può restituire un risultato positivo già con circa **4 copie per reazione** (5 μ l, corrispondenti a circa **10^3 copie/ml**), mostrando una sensibilità di rilevamento fino a 1.000-10.000 volte superiore rispetto a quella necessaria per individuare una carica virale realmente infettiva.

Anche i **sistemi PCR commerciali, detti "kit"**, di cui al maggio 2022 esistevano già circa 630 versioni diverse a livello globale (<https://www.finddx.org/covid-19/test-directory>), spesso presentano limiti di rilevamento inferiori a 10 copie per reazione. Ad esempio, i kit della società TIB-MolBiol (https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_53-0777_96_Wuhan-R-gene_V200204_09155376001%20%282%29.pdf, sezione 5 "Specification"). Un esempio che evidenzia la differenza tra la sensibilità del rilevamento e un limite di rilevamento significativo è illustrato in **ANNEX 3**.

Dal punto di vista tecnico, si deve distinguere tra una "contaminazione" del tratto respiratorio superiore con una piccola quantità di virus incapaci di causare un'infezione e

una vera “infezione”, che implica la presenza di virus replicabili in grado di causare:

- a) una malattia sintomatica, e
b) infettività, ovvero la capacità di contagiare altre persone.**

*Nota: „Abbiamo imparato che, a differenza dei batteri, non esiste una colonizzazione normale delle mucose con coronavirus.“
(K. Henning nel podcast 58 con C. Drosten)*

Christian Drosten aveva già descritto questa distinzione tra contaminazione e infezione vera nel 2014, in un'intervista alla *Wirtschaftswoche* in relazione al MERS ([Link all'intervista](#)):

„Sì, ma il metodo [nota: si riferisce alla PCR] è così sensibile da poter rilevare anche una singola molecola genetica di questo virus. Per esempio, se un patogeno passa per un solo giorno sulla mucosa nasale di un'infermiera (nota: questo sarebbe il caso della “contaminazione” menzionata sopra), senza che lei si ammali o noti nulla, all'improvviso diventa un caso di MERS. In precedenza venivano riportati solo casi di pazienti gravemente malati; ora nella statistica dei casi compaiono anche quelli lievi o persone che sono sostanzialmente in salute.“

„Perché ciò che inizialmente interessa sono i veri casi [nota: questi sono gli “infetti”]. Dubito che operatori sanitari asintomatici o con sintomi lievi siano davvero portatori del virus. Ancora più dubbio è che possano trasmettere il virus ad altri.“

Ma proprio questo punto della trasmissione del virus (e quindi della propagazione della pandemia) è il fondamento delle misure adottate, come le ordinanze di quarantena/isolamento, i "lockdown" e le cosiddette regole distanza, igiene, mascherine.

3.3.2 Prove della rilevanza del valore CT

3.3.2.1. Studio canadese

Uno **studio canadese** di Jared Bullard e Guillaume Poliquin, pubblicato su *Clinical Infectious Diseases* nel 2020, consultabile al link <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa638>, ha evidenziato già a maggio 2020 che sopra un valore CT di 24 non è stato trovato alcun virus riproducibile. Ciò significa che i tentativi di coltivare virus replicabili da campioni di tampone che risultavano positivi a un test con un valore CT più alto sono falliti. Secondo questo studio, sopra un valore CT di 24 la quantità di materiale genetico virale rilevabile è così ridotta che il test positivo non può più essere interpretato come indicativo di un'infezione attiva.

3.3.2.2. Studio francese

Un ampio **studio di Jaffar et al.**, consultabile al link <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491>, ha stabilito la soglia di coltivabilità del SARS-CoV-2 da campioni di pazienti con un valore CT pari a 30.

3.3.2.3. Studio del CDC americano

In uno **studio del CDC americano** sul confronto tra test antigenici, RT-qPCR e coltivazione virale (consultabile al link <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491>), è stata riportata una coltivazione virale efficace per un intervallo di valori CT compreso tra 17,4 e 29,8. Tuttavia, solo i campioni con un valore CT fino a 25 provenivano interamente da individui sintomatici e presentavano coltivazioni virali di successo. Nel caso di valori CT compresi tra 25 e 29, solo il 18,5% (5 su 27) dei campioni ha mostrato una coltivazione positiva. Nel documento originale:

"Virus was isolated from specimens with Ct values ranging from 17.4–29.8; virus was isolated from all specimens with a Ct value <25 and from 18.5% (5/27) of specimens with a Ct value ≥25." (*pagina 9, sezione centrale*).

Nonostante questa analisi basata sulla coltivazione virale, tutti i campioni positivi per due sequenze bersaglio del gene *N*, con un valore CT fino a 40, sono stati considerati "realmente positivi".

3.3.2.4. Raccomandazioni di C. Drosten nel podcast NDR

Nel suo **podcast dell’NDR del 16 febbraio 2021, Christian Drosten** ha dichiarato esplicitamente che un aumento del valore CT da 25–27 oltre la soglia di 28 indica che le persone da cui sono stati ottenuti questi tamponi con un valore CT più alto non sono più infettive.

Nel documento originale:

"E anche qui si nota uno spostamento del valore CT da circa 25 a 27, 27, 28. Ed è una fascia in cui, secondo la nostra valutazione, l'infettività termina. Se si analizza un campione del paziente e ci si chiede se il paziente è ancora infettivo, risponderai: **no, questo non è più un intervallo infettivo.**" (*pagina 4, colonna destra superiore*).

Drosten si riferisce presumibilmente a uno studio sull'efficacia del vaccino in Israele, verificato tramite RT-qPCR, dal titolo [“Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine”](#). Anche il Robert Koch-Institut (RKI) ha menzionato questo studio in una comunicazione al Ministero Federale della Salute (AZ: ID3176 del 31 marzo 2021). Lo

studio dimostra che nei soggetti vaccinati, a partire dal giorno 12 dopo la prima dose del vaccino BNT162b2, **i valori CT per i tre geni testati (E, N, RdRp, utilizzando il kit Seegene Allplex) sono aumentati da una media di 25 a una media di 27.**

Nel confronto con **una coorte di individui non vaccinati e positivi al SARS-CoV-2, il successo del vaccino è stato quantificato tramite una riduzione del valore CT di 1,64–2,33. Tuttavia, questo successo è praticamente impercettibile, poiché i soggetti vaccinati risultano ancora chiaramente positivi al SARS-CoV-2 nei test PCR.**
Nel documento originale:

"Finally, applied on all infections (post-vaccination and unvaccinated, n=5,794), a multivariate linear regression model accounting for age, sex and vaccination quantify Ct regression coefficients ranging from 1.64 (N gene) to 2.33 (RdRp) for vaccination after 12 days or longer prior to infection sampling."

"As a difference of 1 Ct unit is equivalent to a factor of about 1.94 in viral particles per sample, these Ct differences represent a viral load ratio ranging from 2.96 to 4.68."

È notevole che anche in questa pubblicazione siano stati analizzati e valutati valori CT fino a 40 (Extended Data Figure 4 dello studio).

3.3.2.5. Raccomandazioni del CDC

Il **CDC**, in una raccomandazione del 16 aprile 2021, ha indicato che il valore CT nella PCR per SARS-CoV-2 non dovrebbe superare 28 per inviare prodotti di PCR da casi di "breakthrough vaccinali" (persone positive all'RT-qPCR dopo la vaccinazione completa) al laboratorio per la sequenziazione. (<https://www.cdc.gov/vaccines/covid-19/downloads/Information-for-laboratories-COVID-vaccine-breakthrough-case-investigation.pdf>)

3.3.2.6. Studio della Corea del Sud

Uno **studio condotto in Corea del Sud** ha stabilito un valore CT ≤ 25 come limite massimo per considerare clinicamente rilevanti i risultati positivi e ha utilizzato tale valore per confrontare l'accuratezza dei test antigenici. Citazione originale: „ [...] based on a **clinically significant Ct value of ≤ 25** (...)“ (S. 3 in <https://jkms.org/DOIx.php?id=10.3346/jkms.2021.36.e101>)

3.3.2.7. Articolo del New York Times

Secondo l'opinione condivisa di scienziati, inclusi Dr. Fauci del CDC statunitense e vari altri intervistati dal **New York Times nell'agosto 2020**, **qualsiasi risultato positivo ottenuto dopo 35 cicli non ha alcuna base scientifica o evidenza.** <https://www.nytimes.com/2020/08/29/health/coronavirus-testing.html> Il test RT-qPCR propagandato a livello globale dall'OMS per il rilevamento di SARS-CoV-2 era impostato su 45 cicli, senza definire un valore CT per considerare un risultato "positivo".

3.3.2.8. Nationales CDC Singapur

Il **National Center for Infectious Diseases di Singapore**, (<https://www.ncid.sg/Documents/Period%20of%20Infectivity%20Position%20Statementv2.pdf>) già a maggio 2020, ha pubblicato un documento in cui affermava che:

1. Il rilevamento dell'RNA virale tramite PCR non equivale a infettività né alla presenza di virus replicabili.

Citazione originale:

"It is important to note that viral RNA detection by PCR does not equate to infectiousness or viable virus."

2. Sopra un valore CT di 30, il test rileva ancora RNA virale, ma non più virus replicabili, e le persone testate non sono infettive.

Citazione originale:

"When the Ct value was 30 or higher (i.e., when viral load is low), no viable virus (based on being able to culture the virus) has been found."

Testo Originale:

*"6. A surrogate marker of 'viral load' with PCR is the cycle threshold value (Ct). A low Ct value indicates a high viral RNA amount, and vice versa. As noted above, **detection of viral RNA does not necessarily mean the presence of infectious or viable virus.** In a local study from a multicenter cohort of 73 COVID-19 patients, when the Ct value was 30 or higher (i.e. when viral load is low), no viable virus (based on being able to culture the virus) has been found."*

3.3.2.9. Homepage del RKI

Anche il **Robert Koch-Institut (RKI)**, già dall'11 agosto 2020, riportava:

(https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html#doc13490982bodyText4) "Primi risultati diagnostici presso l'RKI mostrano che la perdita della capacità di coltivazione in coltura cellulare era associata a una quantità di RNA, determinata tramite PCR real-time (RT-qPCR), inferiore a 250 copie/5 µL di RNA. Questa concentrazione corrispondeva in quel sistema di test a un valore CT > 30."

Citazione

Originale:

"Erste Ergebnisse aus der Diagnostik am RKI zeigen, dass der Verlust der Anzuchtbarkeit in Zellkultur mit einer per real-time PCR (Anmerkung: ist die RT-qPCR) ermittelten RNA Menge von <250 Kopien/5 µL RNA einherging. Diese RNA-Konzentration entsprach im verwendeten Testsystem einem Ct-Wert >30."

3.3.2.9. Studio aggiuntivo dalla Corea del Sud e discussione svizzera

Uno studio coreano (<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2027040>) ha fissato la soglia per la capacità di coltivazione virale a un valore CT di 28,4. Questo studio è stato discusso il 28 gennaio 2021 dall'ex capo del reparto di infettivologia dell'Ospedale Cantonale di San Gallo, Prof. em. Dr. med. Pietro Verjazza, in un articolo intitolato Infettività e positività PCR – non sono la stessa cosa. ([Infektiosität und PCR-Positivität - Nicht das Gleiche - infekt.ch](http://infektiositaet.ch)) Verjazza ha evidenziato un grafico dello studio, che mostra come anche per pazienti sintomatici ma negativi alla coltura cellulare, il risultato PCR fosse positivo con valori CT superiori a 28. Inoltre, è stato osservato che persino con valori CT tra 22 e 28 alcune persone non avevano una coltura cellulare positiva, e quindi non ospitavano virus realmente replicabili.

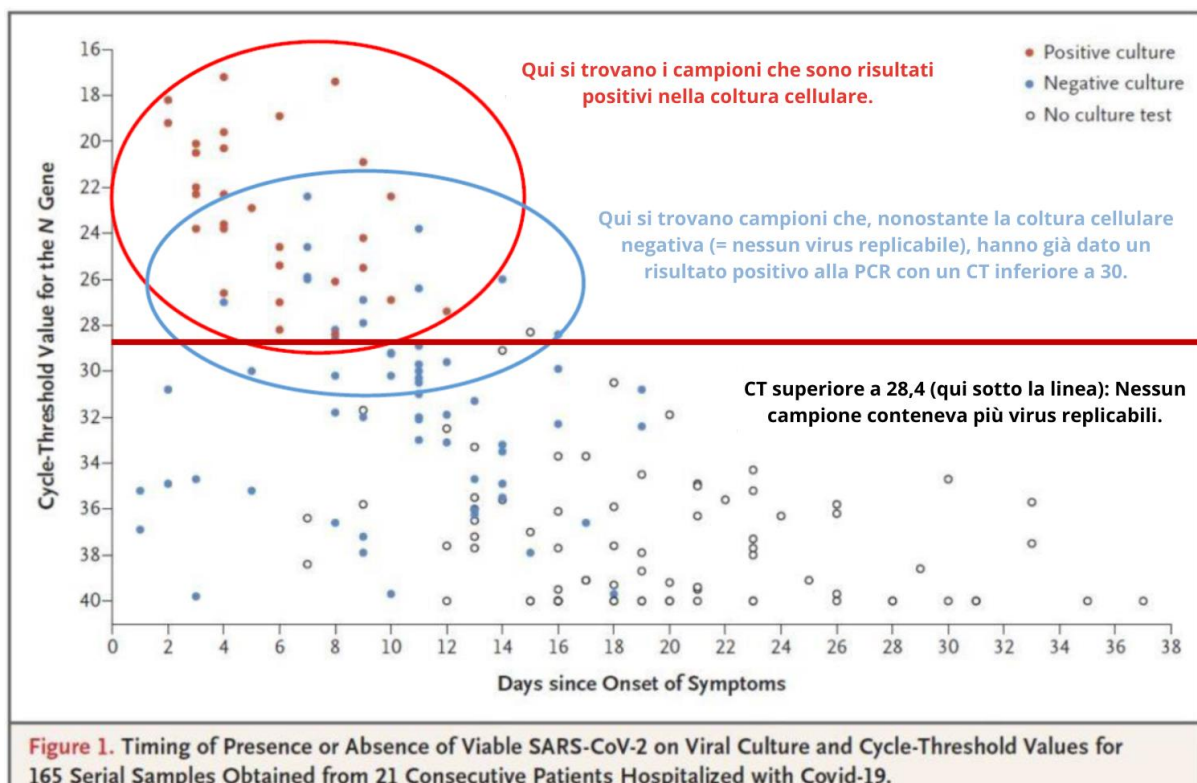


Figura tratta dallo studio sudcoreano (DOI: 10.1056/NEJMc2027040) con integrazioni proprie. In questa figura è chiaramente visibile la correlazione tra la positività della coltura cellulare, utilizzata come indicatore della presenza di virus capaci di replicarsi, e il valore soglia dei cicli (CT).

3.3.2.10. Studio di Francoforte

In uno **studio condotto a Francoforte** (<https://www.mdpi.com/2077-0383/10/2/328>) è emerso che, su 64 campioni RT-qPCR positivi (un solo gene testato), solo in 33 casi (=52%) è stato possibile coltivare il virus in coltura cellulare. Questi campioni infettivi risultavano positivi fino a un valore medio di CT pari a 26 (Figura Supplementare 1), mentre nei campioni con CT più elevato non è stato possibile coltivare virus.

3.3.2.11. Ufficio Nazionale di Statistica Inglese (ONS)

Il valore soglia di CT 25 è stato introdotto già a dicembre 2020 dall'**Office of National Statistics (ONS)** inglese, considerando negativi i risultati con CT superiore a 25. Nel foglio di calcolo Excel (tabella 2 - Dati) disponibile al link sotto, si afferma:

"L'analisi mostra che le persone con una maggiore concentrazione di materiale genetico virale (casi positivi con CT bassi, sotto 25) hanno maggiori probabilità di essere infettive in un contesto familiare rispetto a quelle con concentrazioni più basse (casi positivi con CT elevati, sopra 25)."

Testo originale: „*The analysis shows: - People with a higher concentration of viral genetic material (positive cases with low Ct values; below 25) are more likely to be infectious in a household than those with lower concentrations (positive cases with high Ct values; above 25).*”

(<https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/conditionsanddiseases/adhocs/12683coronaviruscovid19infectionsurveycyclethresholdandhouseholdtransmissionanalysis>).

3.3.2.12. Studio di coorte di Münster

Riferendosi al limite di CT 25 definito dall'ONS, gli autori di un ampio **studio di coorte condotto a Münster** nell'estate del 2021 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8166461/>) hanno concluso che: *"La positività del test RT-PCR non dovrebbe essere considerata una misura accurata dell'incidenza infettiva di SARS-CoV-2."* Nello studio, 2,6% dei 162.457 campioni testati erano positivi all'RT-qPCR, con un limite di CT

fissato a 40. I campioni sono stati analizzati anche per la proporzione di positivi fino al limite di 25 CT (entrambi i geni testati, informazione personale ottenuta da A. Spelsberg, coautrice).

Tra i campioni asintomatici, solo lo 0,4% (68 su 16.874) aveva un risultato positivo con un CT medio di quasi 29, e solo il 27% di questi (18 persone) aveva un $CT \leq 25$, suggerendo una probabile infettività (definizione originale: "*indicating a likelihood of the person being infectious*"). Questo corrisponde a 0,1% degli asintomatici testati.

Tra i 6.212 sintomatici delle prime due ondate di COVID-19, solo il 6,5% (403 persone) risultava positivo all'RT-qPCR con CT medio di 27,8 (prima ondata) e 26,6 (seconda ondata). Di questi, solo il 40% nella seconda ondata (145 su 367) e il 26,5% nella prima ondata (10 su 36) avevano un $CT \leq 25$, indicando una possibile infettività.

3.3.2.13. Studio sul controllo delle infezioni in Inghilterra

Uno **studio sul controllo delle infezioni da COVID-19 in Inghilterra** (<https://elifesciences.org/articles/64683>) ha analizzato i risultati di test PCR su 3,3 milioni di campioni (3 geni, test commerciale Thermo Fisher). Complessivamente, lo 0,83% dei campioni era positivo con un CT medio di 29,2. La positività veniva determinata anche con un solo gene positivo (N-gen) senza limite definito di CT.

Le infezioni con "*bassa evidenza*" venivano classificate nei soggetti asintomatici con un singolo gene positivo a un $CT \geq 34$, mentre i casi "*altamente probabili*" erano definiti da sintomi e positività di due o tre geni. Un CT basso (24,9) correlava con la presenza di anticorpi nel siero (indicativo di una vera infezione), mentre CT elevati (oltre 33) spesso non mostravano una risposta anticorpale.

3.3.2.14. Confronto tra kit PCR commerciali a livello internazionale

Il **confronto tra kit PCR commerciali** (http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag_tab) evidenzia una notevole variabilità nei valori di CT tra i diversi kit e geni bersaglio. Nei test di controllo di qualità condotti da Instand e.V., i valori di CT per la stessa diluizione di SARS-CoV-2 (campione 340061) variavano enormemente tra i laboratori certificati:

- E-Gen: 15-40
- N-Gen: 20-40,7
- RdRp-Gen: 19,5-42,8

Questo dimostra una grave mancanza di standardizzazione tra i laboratori partecipanti (<https://fragdenstaat.de/anfrage/herausgabe-der-auswertung-des-ringversuchs-der-gruppe-340-termin-4-2020/#nachricht-533736>).

3.3.2.15. Valutazione dei controlli standardizzati WHO

Durante la **valutazione di due controlli standardizzati WHO** per l'RT-qPCR in diversi laboratori e con vari approcci RT-qPCR (Bentley E, WHO/BS/2020.2402, disponibile al link: <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2402>), è emerso quanto segue:

- Per il campione di controllo 20/138 (una prova sintetica con sequenza Wuhan1, rappresentata dalla linea nera nella figura), una quantità di genoma pari a $10^{6,73}$ (correlata a una potenziale carica virale infettiva) risultava positiva con un CT compreso tra 23 e 24. Una quantità di genoma pari a $10^{5,73}$ (sotto la soglia della carica virale potenzialmente infettiva) risultava positiva con un CT compreso tra 25,5 e 26,5. Questo indica che, con questo approccio, una carica virale potenzialmente infettiva di 10^6 genomi virali si troverebbe in un intervallo di CT compreso tra **23 e 26,5**.
- Per un SARS-CoV-2 inattivato (campione 20/146, linea rossa nella figura), con una quantità virale definita di $10^{7,7}$ nella soluzione madre, si osservava un rilevamento positivo dell'RNA già con un CT inferiore a **20**. Una quantità di genoma di $10^{6,7}$ mostrava un CT compreso tra **22 e 23**, mentre una quantità di genoma di $10^{5,7}$ mostrava un CT compreso tra **25,5 e 26**. Questo significa che, anche in un campione definito contenente SARS-CoV-2, un equivalente di una dose infettiva poteva essere rilevato già con un CT compreso tra **22 e 26**.

Segue la figura rilevante tratta dalla pubblicazione (Bentley E, WHO/BS/2020.2402, pagina 63). Le quantità standardizzate di RNA iniziale per il campione 20/138 sono indicate al punto 3 (Unitage) a pagina 66 con **6,73 log₁₀ IU/ml**, mentre per il campione 20/146 sono specificate a pagina 64 al punto 3 con **7,7 log₁₀ IU/ml**.

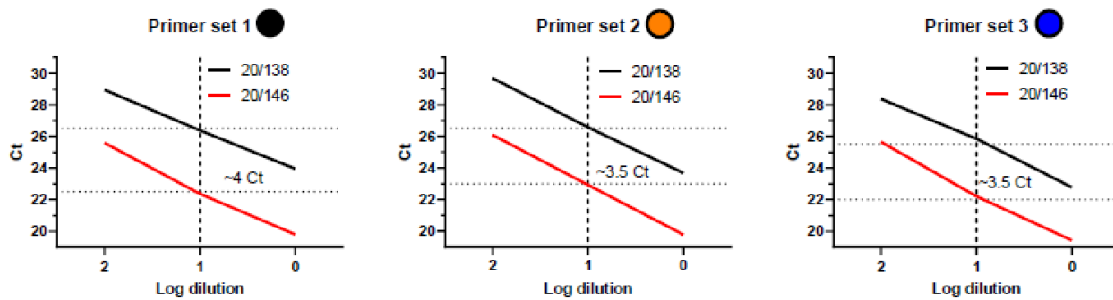


Figure 2. Relative potency of 20/138 compared to 20/146 by Real-time RT-PCR quantification using three primer sets. There is an approximate 0.5 Ct shift between the standard curves using primer set 1 which targets the region of lower coverage, in comparison to primer sets targeting the junction (primer set 2) and region of higher coverage (primer set 3).

3.4. Probabilità pre-test

3.4.1. Spiegazione di Correctiv

I fact-checker di **Correctiv** hanno affrontato già il **18 giugno 2020** il tema della probabilità pre-test ([Articolo: Corona-PCR-Test und Vortestwahrscheinlichkeit: So kann es zu falschen Ergebnissen kommen - Correctiv](#)) e hanno citato l'avvertimento originariamente presente sul sito del RKI:

“Si sconsiglia di testare persone asintomatiche a causa della scarsa significatività di un risultato negativo e della possibilità di risultati falsi positivi, che dipendono dalla prevalenza/incidenza.”

Testo

Originale:

„Von einer Testung von asymptomatischen Personen wird aufgrund der unklaren Aussagekraft eines negativen Ergebnisses sowie der Möglichkeit falsch positiver Befunde in Abhängigkeit von der Prävalenz/Inzidenz in der Regel abgeraten.“

Questo avvertimento è stato rimosso il **2 giugno 2020** e sostituito da un'indicazione sulla probabilità pre-test: “In generale, l'accuratezza dei risultati dei test diagnostici è influenzata anche dalla diffusione di una malattia. Più rara è la malattia e meno mirati sono i test effettuati, maggiori saranno i requisiti di sensibilità e specificità per i test applicati.”

Testo

Originale:

„Generell wird die Richtigkeit des Ergebnisses von diagnostischen Tests auch von der Verbreitung einer Erkrankung beeinflusst. Je seltener die Erkrankung und je ungezielter getestet wird, umso höher sind die Anforderungen an Sensitivität und Spezifität der zur Anwendung kommenden Tests.“

Su una pagina interattiva collegata all'articolo di **Correctiv** e fornita dal **British Medical Journal** (ancora attiva al 10 gennaio 2024), è possibile inserire i parametri del test per calcolare la probabilità di risultati falsi o corretti in funzione della probabilità pre-test, della sensibilità e della specificità. (Covid-19 test calculator | The BMJ)

Esempio di **calcolo**
Considerando i risultati del primo **INSTANT e.V. Ringversuch** per la RT-qPCR (Test **340**, vedi anche Punto 3.6.2.) e il test **TIB Molbiol E-Gentest**, ampiamente utilizzato e originariamente raccomandato dall'OMS, si ottiene quanto segue:

- La specificità del test, secondo la pagina 28 del **Rapporto INSTANT**, è del **97,1%**, mentre la sensibilità, riportata nella tabella a pagina 32, è del **97,06%**.

Caso 1: *10 persone su 100 sono realmente infette*
Con una **probabilità pre-test** del **10%** (10 persone su 100 sono realmente infette):

- **10 persone** vengono correttamente identificate come positive (*true positive*).
- **3 persone** ricevono un risultato falso positivo (*false positive*).

Se si considera un test condotto su 10.000 persone:

- Con un'incidenza reale di **1000**, l'incidenza apparente risulterebbe **1300**.
- Questo avrebbe un impatto limitato sulle misure adottate.

Caso 2: *1 persona su 100 è realmente infetta*
Con una **probabilità pre-test** dell'**1%** (1 persona su 100 è realmente infetta):

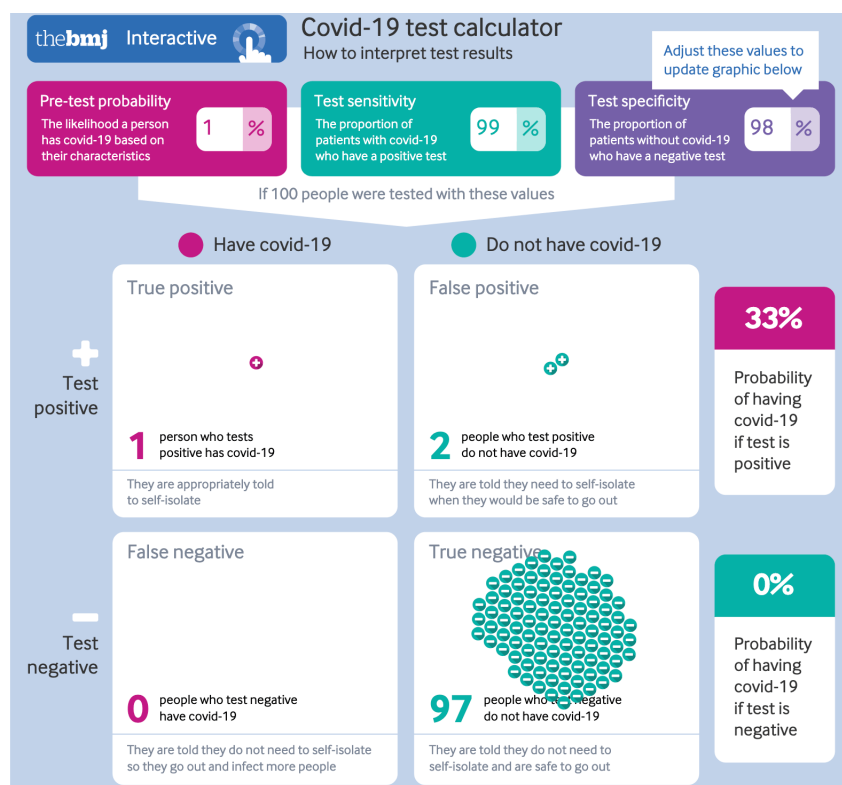
- **1 persona** viene correttamente identificata come positiva (*true positive*).
- **3 persone** ricevono un risultato falso positivo (*false positive*).

Se si considera un test condotto su 10.000 persone:

- Un'incidenza reale di **100** risulterebbe come **400**, a causa dei risultati falsi positivi.
- Questo avrebbe un impatto significativo sulle misure adottate.

Correctiv ha calcolato che con un test più preciso, in condizioni di bassa incidenza, **2 test positivi su 3 sarebbero falsi**.

Vedi **figura** **seguinte:**
Calcolatore del test presente nella pagina web del **British Medical Journal**.



3.4.2. Spiegazione fornita dal RKI sui test rapidi antigenici (Annex 7)

In un'infografica intitolata *“Capire i risultati dei test rapidi per il coronavirus”* ([link all'infografica RKI](#)), il RKI illustra in modo chiaro come la probabilità che un risultato di test sia corretto dipenda dalla cosiddetta **probabilità pre-test**, ovvero dal numero effettivo di persone realmente infette nella popolazione testata.

Questo aspetto della probabilità pre-test si applica sia ai test rapidi antigenici che ai test RT-qPCR.

L'esempio fornito dal RKI per interpretare i risultati dei test rapidi antigenici assume uno scenario realistico con una sensibilità (capacità di rilevare correttamente i positivi) dell'80% e una specificità (capacità di evitare i falsi positivi) del 98%. Anche in questo caso ([fonte](#)), viene sottolineato:

“Occorre considerare le notevoli differenze di prestazioni tra i vari test disponibili in commercio” ([riferimento](#)).

Se, per ipotesi, 5 persone su 10.000 testate sono effettivamente infette da SARS-CoV-2, nell'esempio considerato si otterrebbero **200 falsi positivi** e 4 veri positivi. Ciò significa che 1 persona infetta su 10.000 verrebbe non rilevata, mentre **200 riceverebbero un risultato falso positivo** e sarebbero quindi sottoposte a quarantena/isolamento.

Nel caso di una scuola con, ad esempio, 1.000 studenti sottoposti a test, 20 riceverebbero un falso “*Sei positivo al coronavirus*” e la scuola potrebbe essere temporaneamente chiusa come “*focolaio*” fino a quando ulteriori test non forniscano rassicurazioni. Episodi simili sono già stati riportati dalla stampa.

Nelle “*Indicazioni per la valutazione dei risultati dei test AG*” (nota: test rapidi antigenici) pubblicate sul sito del **RKI**, si affronta la problematica dei falsi positivi nei test antigenici: “*Un **risultato positivo** tramite test AG solleva il sospetto di un’infezione rilevante per la trasmissione del SARS-CoV-2 e richiede, per evitare falsi positivi, un ulteriore test tramite PCR. Considerando le potenziali conseguenze significative di risultati incorretti, non solo la sensibilità dei test antigenici deve soddisfare requisiti elevati, ma anche la specificità. In caso di bassa prevalenza/probabilità pre-test e bassa specificità dei test, **ci si aspetta un alto numero di risultati falsi positivi e un conseguente aumento del carico per i servizi sanitari pubblici (ÖGD) dovuto all’imposizione e, eventualmente, alla revoca di misure.***”

Testo Originale: „*Ein positives Testergebnis mittels AG-Test löst den Verdacht auf eine übertragungsrelevante Infektion mit dem SARS-CoV-2 aus und bedarf zur Vermeidung falsch-positiver Befunde einer Nachtestung mittels PCR. In Anbetracht der potenziell erheblichen Konsequenzen inkorrekt er Ergebnisse bestehen nicht nur an die Sensitivität von Antigentesten hohe Anforderungen, sondern auch an die Spezifität. So wäre bei niedriger Prävalenz/Vortestwahrscheinlichkeit und geringer Testspezifität mit einer hohen Zahl falsch-positiver Ergebnisse und einer entsprechenden zusätzlichen Belastung des ÖGD durch Auferlegung und ggf. Rücknahme von Maßnahmen zu rechnen.*“

[Link: Informazioni RKI sui test antigenici](#)

3.4.3. Pubblicazione sul problema della probabilità pre-test nella PCR

Anche l'affidabilità dei risultati della PCR dipende, oltre ai problemi tecnici legati al design e all'esecuzione del test, dalla probabilità pre-test, come illustrato nel punto 3.5.1 con il calcolatore BMJ e pubblicato in modo chiaro nel 2022 in un **articolo della biostatistica Prof. Christel Weiß di Mannheim** (*Notfall Rettungsmed 2022; 25:48-50 PCR-Tests und Schnelltests – Wie zuverlässig sind sie?* | [SpringerLink](#)).

In questo studio, considerando una sensibilità del 99% e una specificità del 99,5% per un test PCR, è stato dimostrato che:

- In una situazione di **alta prevalenza (20%)**, ad esempio in un gruppo ad alto rischio come una casa di riposo, su 10.000 test eseguiti, **2.020 risultano positivi**, di cui **40 sono falsi positivi**.

- In una situazione di **bassa prevalenza** (ad esempio, nei test di massa su una popolazione sana di adolescenti con una prevalenza stimata all'1%), l'autrice sottolinea la necessità di cautela: **“Un terzo di tutti i risultati positivi è infatti errato”** (Testo Originale: „Ein Drittel aller positiven Befunde ist nämlich falsch“).

Questa affermazione si basa sul calcolo illustrato nella tabella 1 della pubblicazione. Prendendo come esempio un gruppo di 10.000 adolescenti:

- 100 persone sarebbero realmente infette, con **99 risultati positivi reali**.
- Tuttavia, ci sarebbero anche **49,5 risultati falsi positivi**, portando a un totale di 148,5 risultati positivi.

Nella sintesi della pubblicazione, viene inoltre sottolineato: **“Inoltre, si deve considerare che un'infezione rilevata tramite un test PCR non implica necessariamente che la persona interessata sia contagiosa o malata”**

Testo Originale: „Ferner ist zu beachten: Eine nachgewiesene Infektion mittels eines PCR-Tests bedeutet nicht zwangsläufig, dass die betreffende Person ansteckend oder erkrankt ist“

3.5. Valutazione intermedia

Alla luce dei punti A-P precedentemente elencati, risulta sconcertante che la RT-qPCR venga tuttora considerata dal RKI come "gold standard" senza definire in maniera precisa le condizioni di validazione, le certificazioni esterne e i valori soglia del CT (e senza che queste siano pienamente monitorate dalle autorità competenti).

In generale, una RT-qPCR, per via della metodologia impiegata, **non può rilevare virus intatti e replicabili (infettivi)**, né l'intero genoma virale integro, ma esclusivamente il segmento di acido nucleico ricercato. È possibile, tuttavia, che attraverso una validazione accurata, **eseguita parallelamente a un'isolamento virale in coltura cellulare**, si definisca un valore soglia (CT) oltre il quale un segnale PCR positivo non corrisponde più a virus replicabili. Questo approccio è da anni una pratica consolidata nel monitoraggio dei prodotti ematici.

Tale validazione rigorosa consente – **finché il sistema di test NON viene modificato** – di utilizzare il valore soglia come marcatore surrogato per stimare la carica virale e la possibile infettività del campione testato. Tuttavia, non sarà mai possibile ottenere una conferma definitiva. **Qualsiasi modifica** a una componente del sistema PCR (reagenti chimici, materiali plastici, enzimi, protocolli o apparecchiature) richiede necessariamente una nuova calibrazione dell'intero sistema.

In base a tutte le informazioni pubblicate finora (vedi sopra), si può concludere che **qualsiasi valore CT superiore a 35 non corrisponde più alla capacità di isolamento di virus infettivi e,**

pertanto, rappresenta il limite assoluto per dichiarare un risultato "positivo", indipendentemente dal sistema di test utilizzato. Il range di CT tra 25 e 35 può essere considerato valido come marcatore surrogato per "positivo" in termini di una carica virale potenzialmente sufficiente per l'infettività, ma solo se adeguatamente validato attraverso un confronto con l'isolamento virale nel laboratorio che esegue il test.

Interpretazione dei valori CT:

- **CT ≤ 25:** rilevazione positiva del genoma, alta carica di mRNA nel campione.
- **CT 26-35:** positivo solo se validato con isolamento virale.
- **CT > 35:** negativo.

La valutazione rigorosa del valore di CT è particolarmente importante quando si analizza un singolo segmento genico nella PCR, ma è applicabile in generale a ogni target individuale.

3.6. Controlli adeguati

Per valutare correttamente la sensibilità e la specificità di una RT-qPCR, è fondamentale includere campioni di controllo adeguati in ogni ciclo di reazione. Questo processo inizia con l'uso di "tamponi vuoti" nei punti di raccolta dei campioni per escludere eventuali contaminazioni. Prosegue poi con l'uso di controlli di estrazione, necessari per garantire la corretta isolamento dell'RNA replicabile e il corretto completamento di tutti i passaggi successivi. A tale scopo, si utilizzano RNA sintetici definiti o, preferibilmente, isolati virali inattivati a concentrazione nota. Questi campioni seguono tutte le fasi del processo, inclusa la PCR, e consentono di verificare che non ci siano sostanze inibitorie o errori che possano interferire con l'amplificazione dell'RNA.

Dal **dicembre 2020**, l'OMS ha reso disponibili controlli definiti ([link](#)), e dal **novembre 2020**, anche Instant e.V. ha fornito campioni standardizzati ([manuale](#)).

Dal manuale d'accompagnamento fornito da Instant e.V. emergono alcuni punti chiave:

- È stato utilizzato il ceppo **BetaCoV/Munich/ChVir984/2020**, inattivato e con un numero definito di copie virali (10^6 e 10^7 RNA/ml), considerato il limite per giudicare i pazienti "probabilmente contagiosi" (sezione 2.2 del manuale). Questo ceppo, raccolto il 28 gennaio 2020 a Monaco di Baviera, è distribuito dalla Charité ([database](#)).

I risultati dei laboratori hanno evidenziato una notevole variabilità nei valori di CT, anche utilizzando lo stesso campione standardizzato:

- **E-Gen:** valori CT variabili da **21,9** (Laboratorio 4) a **28,7** (Laboratorio 1).

- **RdRp-Gen:** valori CT variabili da **24,8** (Laboratorio 4) a **33,0** (Laboratorio 1).
- Complessivamente, i valori di CT sono oscillati da **12 a 38** per campioni con 10⁶ copie/ml e da **10 a 36** per campioni con concentrazioni più elevate.

Questi risultati dimostrano che ogni laboratorio deve includere sempre campioni definiti per calibrare i propri valori CT rispetto alla carica virale reale.

La notevole variabilità nei valori di CT tra i diversi sistemi di test è stata discussa anche da **C. Drosten** nel podcast NDR 94 del 22 giugno 2021 ([trascrizione](#)):

- **Variabilità tra i produttori di test:**

*"I valori di CT non sono facilmente comparabili tra i diversi produttori di test. [...] In alcuni test, un valore di 25 non è preoccupante, mentre in altri indica una concentrazione infettiva significativa. **Questo perché i produttori non standardizzano i valori di CT.**"* (pagina 17).

Testo Originale: *„Und zwar die Ct-Werte, die wir hier haben, die sind zwischen den einzelnen Testherstellern nicht so ohne Weiteres vergleichbar.“....“ Aber nur so lange, wie wir uns in demselben Testsystem bewegen, können wir die zahlenmäßig vergleichen. Die Unterschiede sind da zum Teil erheblich. Es gibt Testhersteller, bei denen ist ein Wert von sagen wir mal 25 überhaupt nichts Besorgniserregendes, während derselbe Wert von 25 in dem Test eines anderen Herstellers zeigt, dass das schon ernsthaft eine infektiöse Konzentration ist. Das liegt einfach daran, dass diese Testhersteller nicht auf den Ct-Wert standardisieren.“*

- **Mancata regolamentazione:**

Drosten ha sottolineato che la tecnologia per la calibrazione dei test era disponibile già dall'autunno 2020, ma non è stata implementata uniformemente dalle autorità sanitarie: *"Il problema dell'incomparabilità dei valori di CT è stato tecnicamente risolto già dall'autunno. Tuttavia, manca l'implementazione e la regolamentazione da parte delle autorità."* (pagina 18).

Testo Originale: *„Wir können das eben sogar so, dass dieses inhärente Problem der Nichtvergleichbarkeit der Ct-Werte schon gelöst ist. Wohlgedemert im Herbst. Die Technik und die Labortestung ist hier nicht der Haken, sondern es ist wieder mal die Umsetzung und die Regulation.“*

Dal **2020**, sono disponibili controlli adeguati per calibrare i test sulla base della carica virale. Tuttavia, la mancata implementazione di queste procedure da parte delle autorità competenti ha portato a incertezze nell'interpretazione dei risultati della PCR, con potenziali conseguenze sull'affidabilità diagnostica.

3.6.1. Fornitura di controlli adeguati

In ogni serie di test correttamente eseguita è necessario includere una serie di controlli negativi esterni (ossia condotti parallelamente alle analisi sui campioni dei pazienti) e un controllo positivo, che idealmente dovrebbe consistere in un ceppo di SARS-CoV-2 definito e inattivato.

In Germania questa sarebbe una responsabilità primaria del RKI (con il supporto di altre istituzioni pubbliche idonee, come il Bernhard Nocht-Institut o il Friedrich-Löffler-Institut), sfruttando le infrastrutture di laboratorio disponibili (di livello di biosicurezza 4). In queste strutture, si dovrebbe isolare un numero sufficiente di virus SARS-CoV-2 da campioni di pazienti, coltivare ceppi definiti da utilizzare come controlli, inattivarli e distribuirli, in quantità definite, come controlli ai laboratori di test tramite le autorità locali di vigilanza.

Tuttavia, nonostante l'importanza cruciale di questa attività, tale servizio non viene ancora offerto in modo sistematico, nemmeno dopo tre anni dall'inizio della "pandemia". Pertanto, il controllo positivo si limita nella maggior parte dei casi a un'RNA sintetica che codifica esclusivamente per i geni target del sistema di test.

Grazie a questo controllo positivo, è possibile determinare anche il limite inferiore di rilevazione della PCR. Alcuni kit commerciali dichiarano un limite di rilevazione di 20 o meno genomi virali per campione, rilevando quindi una quantità di virus nel tampone inferiore di un fattore 10^5 rispetto alla dose infettiva, il che rende tale risultato privo di valore diagnostico o prognostico (vedi punto 1.3.2).

Una panoramica sui kit commerciali attualmente in uso, con le relative prestazioni tecniche, è disponibile al link seguente: finddx.org.

3.6.2. Test a circuito chiuso: anomalie al primo approccio

Tra i controlli eseguiti correttamente rientra anche la partecipazione dei laboratori che effettuano i test a cosiddetti "**test a circuito chiuso**" (*Ringversuche*). In tali test, un fornitore esterno mette a disposizione un pannello anonimo di campioni di prova.

Nel caso di rilevamento di virus, questi campioni includono:

- **Campioni negativi** e campioni contenenti virus strettamente correlati (inattivati), utilizzati per verificare la **specificità** (in questi casi, non devono essere rilevati segnali positivi).
- **Campioni positivi** con diverse diluizioni del virus cercato (inattivato), utilizzati per determinare la **sensibilità** (ossia, il numero minimo di particelle virali necessario per ottenere un risultato positivo nella PCR e il relativo CT).

Tentativo di Instant e.V.

Nel caso del SARS-CoV-2, il primo test a circuito chiuso (*Ringversuch*) per il "rilevamento del genoma virale - SARS-CoV-2 (340)" è stato condotto dall'associazione **INSTANT e.V.** già nell'aprile 2020. A questo test hanno partecipato, secondo il rapporto, **488 laboratori**, di cui **463 hanno restituito i risultati**. I risultati possono essere consultati nel commento pubblicato: **Zeichhardt M: Kommentar zum Extra Ringversuch Gruppe 340 Virusgenom-Nachweis SARS-CoV-2**

Disponibile su: <https://corona-ausschuss.de/wp-content/uploads/2020/07/Instand-Ringversuch-Virusgenom-Nachweis-SARS-CoV-2.pdf>.

Il rapporto evidenzia due anomalie rispetto alla consueta procedura di test a circuito chiuso, le quali indicavano già problemi nei laboratori con la RT-qPCR per il rilevamento del SARS-CoV-2:

- **Affermazione a pagina 4 del rapporto:**
„Wichtige Mitteilung zur Auswertung: Nur 4 der 7 Proben, die in diesem Extra-Ringversuch untersucht wurden, werden für die Erlangung eines Zertifikats über die erfolgreiche Teilnahme berücksichtigt.“
(Traduzione: "Importante comunicazione sull'analisi: solo 4 dei 7 campioni esaminati in questo test aggiuntivo saranno considerati per il rilascio di un certificato di partecipazione riuscita").
- **Nota a piè di pagina a pagina 10:**
„In der Zwischenauswertung vom 17. April 2020 wurden allen Teilnehmern des Extra INSTANT Ringversuchs (340) Virusgenom-Nachweis von SARS-CoV-2 April 2020 die Probeneigenschaften der Proben 340059, 340060 und 340064 vorzeitig mitgeteilt. Die Ergebnisse dieser 3 Proben bleiben für die Erteilung eines Zertifikats unberücksichtigt [...].“
(Traduzione: "Nella valutazione intermedia del 17 aprile 2020, a tutti i partecipanti al test a circuito chiuso aggiuntivo (340) per il rilevamento del genoma virale SARS-CoV-2 di aprile 2020 sono state comunicate in anticipo le proprietà dei campioni 340059, 340060 e 340064. I risultati di questi 3 campioni non saranno presi in considerazione per il rilascio di un certificato").

Il **motivo di questa esclusione** è spiegato a pagina 4 del rapporto:

„Während der Extra-Ringversuch noch lief, erhielt INSTANT e.V. aus dem In- und Ausland dringliche Anfragen, noch vor Ende der verlängerten Abgabefrist, also vor dem 28. April 2020, die Eigenschaften der zu untersuchenden Proben aufzudecken, damit Laboratorien bei etwaigen Fehlmessungen ihre Testmethode kurzfristig verbessern können.“

(Traduzione: "Durante il test aggiuntivo, Instand e.V. ha ricevuto richieste urgenti, sia dall'interno che dall'estero, di rivelare le caratteristiche dei campioni da analizzare prima della scadenza prorogata, cioè prima del 28 aprile 2020, affinché i laboratori potessero correggere rapidamente eventuali errori di misurazione nei loro metodi di test").

Questo approccio è molto insolito per un test a circuito chiuso autentico e non costituisce più una procedura di verifica indipendente dei laboratori coinvolti.

Nonostante i campioni fossero già stati svelati e il numero di test fosse stato ridotto, molti laboratori hanno **commesso errori di identificazione** tra i campioni. A pagina 18 del commento si legge:

*„Bei Probe 340064 (SARS-CoV-2 positiv 1:100 000 verdünnt) beruht die reduzierte Erfolgsquote von nur 93,2 % im Wesentlichen auf falschen Ergebniszuordnungen (Verwechslungen) bei Probe 340064 und Probe 340065 (negativ für SARS-CoV-2 und positiv für HCoV 229E). Die Verwechslungen bei den Proben 340064 und 340065 betreffen 24 Labore mit insgesamt 59 Ergebnissen je Probe.“
(Traduzione: "Per il campione 340064 (positivo al SARS-CoV-2 con diluizione 1:100.000), il tasso di successo ridotto, pari solo al 93,2%, è dovuto principalmente a errori di attribuzione dei risultati (scambi) tra il campione 340064 e il campione 340065 (negativo al SARS-CoV-2 e positivo per HCoV 229E). Gli errori di attribuzione riguardano 24 laboratori, con un totale di 59 risultati per campione").*

Molti laboratori, quindi, hanno erroneamente confuso il campione **340064** (SARS-CoV-2 leggermente diluito) con il campione **340065** (negativo al SARS-CoV-2 e positivo al virus correlato HCoV 229E). Sorprendentemente, però, **nessuno degli errori segnalati ha interessato gli altri campioni:**

- Campione 61 (SARS-CoV-2 molto diluito);
- Campione 62 (negativo).

I risultati dettagliati di un secondo test a circuito chiuso di giugno/luglio 2020 (disponibile su Instand e.V.) non sono ancora pubblicamente disponibili. Una richiesta all'RKI tramite la piattaforma *Frag den Staat* per ottenere l'analisi del test è rimasta **senza risposta**. (Richiesta: "Herausgabe der Auswertung des Ringversuchs der Gruppe 340 Termin 4 2020 - FragDenStaat").

3.7. Esclusione di contaminazioni dei reagenti e problemi nei processi operativi

3.7.1 Contaminazione all'interno del laboratorio dovuta a errori nei processi

Anche il miglior design di una PCR può generare risultati **falsi positivi** se i reagenti o i kit utilizzati sono contaminati da campioni positivi oppure, più comunemente, se si verificano contaminazioni durante le procedure di laboratorio. Poiché la PCR è una metodologia estremamente sensibile (reazione di tipo esponenziale), in grado di rilevare pochi frammenti di DNA, la contaminazione dei laboratori con prodotti finali della PCR rappresenta un problema principale nella diagnostica clinica. Questo fenomeno è già stato descritto, ad esempio, nel 2004 da Aslanuadeh J et al. (<http://www.anncinlabsci.org/content/34/4/389.full.pdf+html>):

„Una PCR tipica produce fino a 10⁹ copie della sequenza target e, se aerosolizzata, anche la più piccola goccia di aerosol può contenere fino a 10⁶ prodotti di amplificazione. Se non controllata, nel giro di breve tempo, la formazione di aerosol con prodotti di amplificazione può contaminare reagenti, strumenti e sistemi di ventilazione del laboratorio [6].“

(Testo Originale: „A typical PCR generates as many as 10⁹ copies of target sequence and if aerosolized, even the smallest aerosol will contain as many as 10⁶ amplification products [6]. If uncontrolled, within a relatively short time the buildup of aerosolized amplification products will contaminate laboratory reagents, equipment, and ventilation systems [6].)

Questa elevata **rischiosità di contaminazione** richiede che nei laboratori diagnostici che utilizzano la PCR si adotti la **massima precisione** durante le analisi, con personale altamente qualificato, un ambiente privo di contaminazioni e controlli indipendenti costanti.

Problemi in laboratori inglesi e casi in Germania

Aggiungendo a questo quadro il modo in cui, secondo un reportage della BBC, nei grandi laboratori di test inglesi si lavorava apertamente con personale non qualificato in ambienti altamente suscettibili alla contaminazione (il video non è più disponibile: <https://www.youtube.com/watch?v=Uk1VK1reNtE>), non sorprende che in Germania si trovino occasionali segnalazioni sui media di casi di falsi positivi dovuti a contaminazioni di laboratorio (ad esempio nel caso dell'MVZ Augsburg - link alla fine della sezione).

Problemi segnalati nella letteratura scientifica

Anche in condizioni di laboratorio controllate, le contaminazioni durante i passaggi della PCR non possono essere completamente escluse. Già nella prima pubblicazione della RT-qPCR (Corman et al., DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045), veniva evidenziata la problematica dei falsi positivi dovuti a procedure di laboratorio:

„In four individual test reactions, weak initial reactivity was seen but they were negative upon retesting with the same assay [...] most probably to handling issues [...]“

(Traduzione: "In quattro reazioni di test individuali si è osservata una debole reattività iniziale, che tuttavia è risultata negativa al nuovo test con lo stesso metodo [...] molto probabilmente a causa di problemi di gestione [...].")

Ritrazione di una pubblicazione della Charité

Un altro esempio di contaminazioni che hanno portato a risultati falsi positivi è emerso in una pubblicazione guidata dalla Charité, con la partecipazione di Drosten e Landt (autori del protocollo Corman et al.). Questi problemi hanno costretto gli autori a ritirare uno studio pubblicato su *Science*:

„Wir fanden eine Mischung aus verschiedenen SARS-CoV-2 Genom Fragmenten die einige der Proben kontaminiert haben.“

(Traduzione: "Abbiamo trovato una miscela di frammenti di genoma SARS-CoV-2 diversi che ha contaminato alcuni dei campioni").

Anche i laboratori d'eccellenza della Charité, quindi, hanno ammesso e pubblicato problemi significativi di contaminazione con frammenti genomici di SARS-CoV-2, che possono portare a falsi positivi sia nella diagnostica PCR che nell'analisi genomica delle varianti.

3.7.2. Contaminazione dei materiali/reagenti dal produttore

Anche con un flusso operativo di laboratorio ottimale e rigorosamente monitorato per minimizzare le contaminazioni interne, una **fonte inaspettata di falsi positivi** può derivare dalla contaminazione dei materiali o dei reagenti forniti dal produttore. Ad esempio, i materiali utilizzati per il prelievo dei campioni, come i tamponi, possono essere già contaminati in fabbrica. Un caso emblematico è quello del "**Fantasma di Heilbronn**", in cui i bastoncini utilizzati per raccogliere tracce di DNA sulle scene del crimine erano contaminati dal DNA di un'operatrice del reparto confezionamento dell'azienda produttrice, ostacolando per anni le indagini forensi con tracce false (<https://www.faz.net/aktuell/gesellschaft/kriminalitaet/dna-ermittlungspanne-das-phantom-von-heilbronn-ist-widerlegt-1925411.html>).

Nel caso della diagnostica SARS-CoV-2, già a giugno 2020 è stato pubblicato un problema di contaminazione dovuto a **primer per PCR contaminati in fabbrica con controlli positivi** (Wernike et al., DOI: 10.1111/tbed.13684). È stato osservato che anche campioni di acqua pura, analizzati con diverse serie di primer, risultavano **positivi per SARS-CoV-2** nella RT-qPCR. Nel testo originale si legge:

„Es gab jedoch auch Primer/Sonden-Sets, die sehr geringe Verunreinigungen aufwiesen, die erst bei der gründlichen internen Validierung entdeckt wurden.“
(Traduzione: **"Tuttavia, c'erano anche set di primer/sonde che presentavano contaminazioni a livelli molto bassi, rilevate solo durante una validazione interna approfondita"**).

Anche alcuni **risultati falsi positivi riportati dalla stampa nell'estate del 2020** per la diagnostica SARS-CoV-2 sono stati attribuiti a problemi nei materiali. Ad esempio, il caso di un laboratorio di Augsburg è stato associato a problemi con i reagenti utilizzati (<http://web.archive.org/web/20210111010037/https://www.br.de/nachrichten/bayern/probleme-in-augsburger-labor-bringen-falsche-testergebnisse,SEh5Qq4>).

3.7.3. Valutazione intermedia

Anche con un design ideale della RT-qPCR e una buona pratica di laboratorio con validazioni adeguate, problemi nei processi quotidiani e contaminazioni esterne, come quelle provenienti da campioni contaminati in fabbrica, possono influire significativamente sulla qualità dei risultati della RT-qPCR e portare a falsi positivi.

3.8. Kit PCR commerciali

Fin dall'inizio, i sistemi di test PCR commerciali, noti come "tamponi", sono stati utilizzati nei laboratori diagnostici di routine, **anche se gran parte di essi era dichiarata solo per uso di ricerca** ("research use only", RUO).

Da sottolineare è il primo e probabilmente più rilevante produttore di test, la società berlinese **TIB Molbiol**, il cui proprietario (Olfert Landt) è stato indicato come coautore delle raccomandazioni del protocollo OMS insieme a Christian Drosten. I kit basati sulle raccomandazioni OMS vengono distribuiti tramite Roche e utilizzati nei loro grandi automatismi "Cobas". Questi kit costituiscono, insieme a quelli di altri produttori (vedi lista dei produttori:

<https://www.vdgh.de/covid-19/sars-cov-2-und-die-industrie/hersteller/artikel16741>), la maggior parte dei test utilizzati nella diagnostica di routine in Germania. Curiosamente, molti produttori indicano l'**E-Gen** come obiettivo principale per il rilevamento, seguendo strettamente le raccomandazioni iniziali dell'OMS.

Secondo un servizio televisivo del **10 aprile 2021** (Standort Berlin - Millionen Corona Test kommen aus Berlin - tv.berlin (tvb.de)), in un'intervista con Constanze e Olfert Landt, dirigenti

di TIB Molbiol, è stato dichiarato che il test PCR per il rilevamento del genoma di SARS-CoV-2 è stato sviluppato da Olfert Landt (informazione fornita nei primi cinque minuti). L'origine dei primi test commerciali e del protocollo OMS solleva alcune **domande sul corretto ordine temporale** e sui diritti d'autore, come discusso in un articolo del luglio 2023 (Dank PCR-Test: Drosten macht Immobilien-Millionär noch reicher | NIUS.de):

"L'azienda di Landt è la prima a produrre kit di test PCR per il virus Sars2. La distribuzione è iniziata già il 10 gennaio 2020, nonostante la sequenza del virus sia stata depositata nella banca dati ufficiale delle sequenze genetiche solo il 13 gennaio"

Testo Originale: „Landts Unternehmen ist das erste, das PCR-Testkits für das Sars2-Virus herstellt. Bereits am 10. Januar 2020 startete man mit der Auslieferung. Und das, obwohl die Virus-Sequenz erst am 13. Januar in der offiziellen Genproben-Datenbank landet.“.

Secondo le dichiarazioni dell'azienda, TIB Molbiol aveva già distribuito **oltre 60 milioni di test a livello globale nel 2020** (<https://www.tib-molbiol.de/de/covid-19>), anche se molti di questi kit erano ancora dichiarati come **"Non testati per uso diagnostico"** (ad esempio, intestazione del documento: https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_53-0777_96_Wuhan-R-gene_V200204_09155376001%20%282%29.pdf). I foglietti illustrativi e le descrizioni dei kit della TIB Molbiol, originariamente disponibili in formato PDF, risultano essere stati creati il **15 gennaio 2020** (!!!) con un numero SAP Roche, e sono rimasti invariati fino al 6 febbraio 2020, parallelamente ad altri kit che nel frattempo hanno ottenuto l'approvazione per la diagnostica in vitro.

Ad oggi, esiste una vasta gamma di sistemi di rilevamento PCR (https://www.theglobalfund.org/media/9629/covid19_diagnosticproducts_list_en.pdf), molti dei quali approvati per la diagnostica in vitro (IVD) di SARS-CoV-2. In un esempio di descrizione di uno di questi kit (https://www.genesig.com/assets/files/Path_COVID_19_CE_STED_IFU_Issue_500.pdf), si legge nella sezione "Intended use" (uso previsto):

"I risultati positivi indicano la presenza di RNA di SARS-CoV-2. I risultati positivi non escludono una co-infezione con altri batteri o virus. I risultati negativi non escludono un'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per decisioni terapeutiche. I risultati positivi e negativi devono essere combinati con osservazioni cliniche, anamnesi del paziente e informazioni epidemiologiche"

Testo Originale: „Positive results are indicative of the presence of SARS-CoV-2 RNA. Positive results do not rule out co-infection with other bacteria or other viruses. Negative results do not preclude SARS-CoV-2 infection and should not be used as the sole basis for patient

management decisions. Positive and Negative results must be combined with clinical observations, patient history, and epidemiological information"

4. Correlazione tra rilevamento positivo di acidi nucleici nella RT-qPCR, malattia e infettività

Solo le persone effettivamente infette, con virus in grado di replicarsi e di essere rilasciati dalle cellule in quantità "infettive" sufficienti, possono trasmettere il virus, presentare un rischio di malattia e quindi essere rilevanti per la determinazione dell'andamento di un tasso di infezione e di un'onda epidemica.

4.1. Valutazione del Deutsches Ärzteblatt

"La rilevazione tramite PCR è il test standard per la diagnosi di infezioni virali come SARS-CoV-2. Il test rileva singoli geni del patogeno, ma non patogeni intatti" Inoltre: **"Esiste la possibilità che il test rimanga positivo oltre la durata dell'infezione, poiché possono essere ancora presenti 'frammenti virali' nel naso o nella gola. Una prova certa dell'infettività è possibile solo con test complessi, in cui si verifica in laboratorio se il materiale degli strisci può uccidere cellule vive"**

Testo Originale: „Der PCR-Nachweis ist die Standarduntersuchung zur Diagnose von Virusinfektionen wie SARS-CoV-2. Der Test weist einzelne Erregergene, jedoch keine intakten Erreger nach.“ „Es besteht die Möglichkeit, dass der Test über die Dauer der Infektion hinaus positiv ausfällt, weil noch ‚Virusstrümmel‘ in Nase oder Rachen vorhanden sind. Ein sicherer Nachweis der Infektiosität ist nur mit aufwendigen Tests möglich, bei denen im Labor untersucht wird, ob das Material aus den Abstrichen lebende Zellen abtöten kann.“

Questa valutazione è stata pubblicata dal **Deutsches Ärzteblatt il 1° febbraio 2021** (<https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/120745>).

4.2. Comunicazione ufficiale del CDC

Anche il **CDC** segnala, tra gli "svantaggi" dei **NAATs** (test di amplificazione degli acidi nucleici, tra cui la PCR):

„A positive NAAT diagnostic test should not be repeated within 90 days, since people may continue to have detectable RNA after risk of transmission has

passed.“

(Traduzione: "Un test diagnostico NAAT positivo non dovrebbe essere ripetuto entro 90 giorni, poiché le persone possono continuare ad avere RNA rilevabile dopo che il rischio di trasmissione è passato").

Questa nota si trova nella tabella riassuntiva in fondo alla pagina:

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#previous>.

4.3. Ufficio Sanitario di Francoforte

"Il test PCR rileva frammenti genetici di SARS-CoV-2; non fornisce alcuna informazione sul fatto che si tratti di virus infettivi o di residui virali dopo un'infezione passata. Per determinarlo sarebbe necessaria una coltura del patogeno"

Testo Originale: „Der PCR-Test detektiert Genabschnitte von SARS-CoV-2; er sagt nichts darüber aus, ob es sich um infektiöse Viren oder um Virusreste nach durchgemachter Infektion handelt. Hierzu wäre eine Erregeranzucht erforderlich.“

Questa affermazione è stata riportata in una pubblicazione del responsabile dell'Ufficio Sanitario di Francoforte nell'agosto 2020. (https://www.laekh.de/fileadmin/user_upload/Heftarchiv/Einzelartikel/2020/10_2020/Die_Covid-19-Pandemie_in_Frankfurt_am_Main.pdf)

4.4. Pubblicazione del CDC

In una pubblicazione del **CDC** datata 13 luglio 2020, intitolata „**CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel For Emergency Use Only Instructions for Use**“ (<https://www.fda.gov/media/134922/download>), si trova a pagina 38, sotto il titolo „**Limitations**“ (ancora visibile a pagina 37):

“Detection of viral RNA may not indicate the presence of infectious virus or that 2019-nCoV is the causative agent for clinical symptoms.”
(Traduzione: "Il rilevamento dell'RNA virale potrebbe non indicare la presenza di un virus infettivo o che il 2019-nCoV sia l'agente causale dei sintomi clinici").

4.5. Informazioni della WHO per i laboratori di analisi

Il fatto che un semplice rilevamento dell'mRNA di SARS-CoV-2 non debba necessariamente correlarsi a una malattia e non possa essere utilizzato come unico criterio per valutare lo stato di salute, ma rappresenti solo uno strumento di supporto per confermare una diagnosi clinica, è chiaramente descritto nella comunicazione della WHO „**Notice for IVD Users 2020/05, Nucleic acid testing (NAT) technologies that use polymerase chain reaction (PCR) for detection of SARS-CoV-2**“ del 13 gennaio 2021 (pubblicata il 20 gennaio 2021, disponibile su [WHO](#)):

„Wenn die Testergebnisse nicht mit dem klinischen Bild übereinstimmen, sollte eine neue Probe entnommen und mit der gleichen oder einer anderen NAT-Technologie erneut getestet werden.“
(Traduzione: **"Quando i risultati del test non corrispondono al quadro clinico, dovrebbe essere prelevato un nuovo campione e sottoposto nuovamente a test utilizzando la stessa o un'altra tecnologia NAT"**).

Inoltre:

„Die meisten PCR-Assays sind als Hilfsmittel für die Diagnose indiziert, daher müssen Gesundheitsdienstleister jedes Ergebnis in Kombination mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme, dem Probentyp, den Assay-Spezifika, klinischen Beobachtungen, der Patientenanamnese, dem bestätigten Status aller Kontakte und epidemiologischen Informationen berücksichtigen.“
(Traduzione: **"La maggior parte degli esami PCR sono indicati come strumenti di supporto per la diagnosi; pertanto, gli operatori sanitari devono considerare ogni risultato in combinazione con il momento del prelievo del campione, il tipo di campione, le specifiche dell'esame, le osservazioni cliniche, la storia clinica del paziente, lo stato confermato di eventuali contatti e le informazioni epidemiologiche"**).

4.6. Pubblicazione su Lancet

Anche in una [pubblicazione su Lancet](#)

([Link all'articolo](#)) gli autori descrivono il test RT-qPCR come segue:

„Unserer Ansicht nach ist der aktuelle PCR-Test daher nicht der geeignete Goldstandard für die Bewertung eines SARS-CoV-2-Tests für die öffentliche Gesundheit“

(Traduzione: „A nostro avviso, il test PCR attuale non è quindi il gold standard appropriato per valutare un test per la salute pubblica per SARS-CoV-2”).

Secondo gli autori, infatti, la PCR risulta positiva anche quando i testati non sono più contagiosi, poiché l'RNA può persistere nel corpo per settimane o mesi dopo che il sistema immunitario ha combattuto con successo il virus, senza che la persona sia ancora infettiva.

„Sobald die Replikation von SARS-CoV-2 durch das Immunsystem unter Kontrolle gebracht wurde, sinken die mittels PCR in den Atemwegssekreten nachweisbaren RNA-Konzentrationen auf sehr niedrige Werte, bei denen es sehr viel unwahrscheinlicher ist, dass die Betroffenen andere infizieren. Die verbleibenden RNA-Kopien können Wochen, gelegentlich auch Monate, benötigen, bis sie verschwunden sind, während dieser Zeit bleibt die PCR positiv.“
*(Traduzione: „Una volta che la replicazione di SARS-CoV-2 è stata controllata dal sistema immunitario, i livelli di RNA rilevabili tramite PCR nelle secrezioni respiratorie scendono a valori molto bassi, rendendo molto meno probabile che i soggetti infettino altre persone. **Le copie di RNA rimanenti possono richiedere settimane, o occasionalmente mesi, per essere eliminate, periodo durante il quale la PCR rimane positiva”).***

4.7. Dichiarazioni di Christian Drosten

4.7.1 Perizia di Drosten per il Tribunale

ella sua perizia di aprile 2021 per un tribunale a Heidelberg (versione anonima disponibile qui: [Link al documento](#)), l'esperto C. Drosten conferma che un test RT-PCR può risultare positivo anche quando **«almeno il tratto da rilevare del genoma del virus è presente nel campione testato»**. Ciò significa che anche frammenti genetici, senza che derivino da un virus intatto e replicabile, possono già produrre risultati positivi nel test PCR, suggerendo erroneamente la presenza del virus in campioni non infettivi.

4.7.2. NDR Podcast 94

Nel suo NDR Podcast 94 del 22 giugno 2021 ([Link al documento](#)), a pagina 16, C. Drosten discute il legame tra il valore Ct e l'infettività come segue:

„...dass ein Fall, nur weil der Patient in diesem Moment einen hohen Ct-Wert hat, also weil er vielleicht nicht infektiös ist jetzt im Moment, also der hat wenig Virus, der hat Virus, aber der hat wenig Virus,...“
(Traduzione: „...che un caso, solo perché il paziente in quel momento ha un

valore Ct alto, quindi forse non è infettivo in quel momento, cioè ha poco virus, ha virus, ma ne ha poco,...").

4.7.3. Pubblicazione su *Science*

In una pubblicazione su *Science* guidata da C. Drosten, datata maggio 2021 ([DOI: 10.1126/science.abi5273](https://doi.org/10.1126/science.abi5273)), in cui viene studiata l'infettività di SARS-CoV-2, gli autori definiscono già nella prima frase dell'abstract i parametri per quantificare e determinare la potenziale trasmissibilità del virus come segue:

„.... sind die Virale Last und ob die Proben ein vermehrungsfähiges Virus Isolat in Zellkultur enthalten“
(Traduzione: ***„...sono la carica virale e se i campioni contengono un isolato virale replicabile in coltura cellulare”***).

Nell'introduzione, spiegano che la carica virale viene determinata dalla concentrazione di RNA virale e dalla capacità di isolare con successo il virus in colture cellulari. Inoltre, sottolineano che:

„While viral load and cell culture infectivity cannot be translated directly to in vivo infectiousness, and the impact of social context and behavior on transmission is very high, these quantifiable parameters can generally be expected to be those most closely associated with transmission likelihood“.
(Traduzione: ***„Mentre la carica virale e l'infettività in coltura cellulare non possono essere tradotte direttamente nell'infettività in vivo, e l'influenza del contesto sociale e del comportamento sulla trasmissione è molto elevata, questi parametri quantificabili possono generalmente essere considerati quelli più strettamente associati alla probabilità di trasmissione”***).

5. Dichiarazioni sulla diagnostica PCR dai protocolli del RKI

I protocolli ufficiali delle riunioni del gruppo di crisi "Nuovo Coronavirus (COVID-19)", con riferimento pratico **4.06.02/0024#014** e aggiornati al **30 maggio 2024**, sono stati ufficialmente resi disponibili dal RKI. Questi documenti possono essere consultati e scaricati direttamente dal sito ufficiale del RKI al seguente link:

RKI - COVID-19-Pandemie - Interne COVID-19-Krisenstabsprotokolle des Robert Koch-Instituts <https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/C/COVID-19-Pandemie/COVID-19-Krisenstabsprotokolle.html>

Qui si trovano anche alcune dichiarazioni decisive sulla diagnostica PCR, che verranno citate di seguito in ordine cronologico:

Data	Punto del Protocollo	Citazione diretta dai protocolli rilasciati	Osservazioni
14/01/2020	3	"(Omissis) (FG17) ha contattato (omissis) (Charité). Basandosi sulla conversazione, FG17 ha ordinato primer per la diagnostica del nuovo CoV. ZBS1 sta valutando di ordinare anche primer."	Si presume che il contatto oscurato con Charité si riferisca a Prof. C. Drosten.
16/01/2020	3	"Il RKI ha già a disposizione i primer necessari per la diagnostica PCR del nuovo CoV. Si prevede l'arrivo di un campione positivo il 17/01/2020. Il test PCR è stato sviluppato da (omissis)."	Anche qui il nome oscurato probabilmente corrisponde a C. Drosten, dato che il protocollo PCR è stato inviato alla WHO il 13/01 da V. Corman e C. Drosten.
20/01/2020	5	"La virologia della Charité/(omissis) è principalmente responsabile per la diagnostica di laboratorio per MERS e ora anche per nCoV. Lo sviluppo del test PCR è più semplice per SARS e 2019-nCoV, poiché i due virus sono molto simili."	Drosten, che aveva sviluppato la diagnostica per MERS, è probabilmente dietro il nome oscurato.
24/01/2020	3	"Trasmissione uomo-uomo da portatori asintomatici con alti CT; i laboratori sono stati invitati a condividere; CT tra 20-30; WHO	Prima discussione documentata sulla problematica dei CT alti e dei risultati positivi in asintomatici.

		fornisce gli assay; l'università di Berna sintetizza il genoma."	
27/01/2020	5	"Diagnostica INV; i campioni sospetti dovrebbero essere testati anche per altri patogeni respiratori."	Valutazione corretta che i sintomi possono essere causati da vari patogeni respiratori.
03/02/2020	2	"Un risultato PCR positivo dopo la guarigione non implica necessariamente infettività."	Documentato già a inizio febbraio 2020, anche se limitato ai casi post-guarigione.
	5	"La qualità della PCR non può ancora essere sufficientemente valutata. ZBS 1 attende isolati da Monaco e Giappone per ulteriori indagini."	Discussione corretta sulla qualità e affidabilità della PCR.
04/02/2020	5	"Una distinzione tra nCoV e SARS è possibile con la PCR."	
05/02/2020	5	"Il rilevamento virale mediante PCR dipende dal materiale utilizzato. Se la PCR è negativa, non sono necessarie ulteriori indagini, ma nCoV può essere rilevato a lungo (fino a 38 giorni)."	
10/02/2020	6	"Un fornitore belga ha problemi di contaminazione con un controllo positivo, per ora si utilizza il fornitore di Berlino."	Primo caso documentato di contaminazione dei prodotti PCR, probabilmente dovuto

			ai primer contaminati (vedi punto 3.7.2).
11/02/2020	4	"Analisi indicano la possibilità di una PCR quantificata (invece di due test negativi consecutivi) per dimettere i pazienti a un determinato cut-off (sotto 10^4 /ml)."	Prima discussione documentata sulla quantificazione della carica virale.
13/02/2020		"...dopo (omissis) presumibilmente non c'è più infettività se in coltura cellulare non si osserva replicazione virale oltre 10^6 /ml; per sicurezza, si propone 10^5 /ml come criterio di dimissione sufficiente."	Rilevanza della coltura cellulare per valutare l'infettività, con un cut-off definito per il test PCR.

20/02/2020	1	"Incertezza su possibile falso positivo di una passeggera della crociera in Malesia (2 test positivi, donna forse positiva sulla nave); qualità dei test non nota; dubbi sull'esposizione dei passeggeri della Westerdam."	Discussione su casi di test falsi positivi già documentati, in netto contrasto con le successive narrative pubbliche.
	6	"PCR-Test: sensibilità? Specificità? Cross-validazione? Ci sono molti tipi diversi di PCR (vedi sito WHO), RKI utilizza assay (omissis) e propri assay; ring trial della WHO non ancora pianificato."	Si documentano interrogativi sulla qualità e validazione incrociata della PCR.
21/02/2020	6	"I nomi delle aziende con problemi di contaminazione noti non sono pubblici. Le aziende comunicheranno direttamente con i laboratori tedeschi."	Chiaramente diversi fornitori di kit PCR avevano problemi di contaminazione, ma le informazioni non venivano rese pubbliche.
28/02/2020	6	"Ricevute 40 campioni dall'AGI Sentinel, cattiva esperienza con primer contaminati; riserve di primer buoni per 4 settimane, ordini successivi in corso."	Continuano le segnalazioni di problemi di contaminazione nei primer PCR.
02/03/2020	6	"Contaminazione: due aziende interessate. Nuovi lotti sono in ordine. Il RKI è stato informato tramite EVD-LabNet. Rispetto agli assay interni del RKI, i kit commerciali funzionano bene. La maggior parte dei laboratori usa però assay interni."	Conferma che molti laboratori utilizzavano assay sviluppati internamente, riducendo la comparabilità dei risultati.

03/03/2020	6	"Contaminazione: problemi con fornitori di primer (controlli colpiti), almeno 3 aziende coinvolte. Non è divulgato pubblicamente quali aziende. Le aziende devono informare i clienti. Non è compito del RKI."	Nonostante il RKI fosse consapevole delle contaminazioni, lasciava la responsabilità della comunicazione ai fornitori.
06/03/2020	6	"Rapporto tra virus replicanti e RNA genomico nelle provette da indagare. Dai dati ARS: su 500 campioni testati in diagnostica di routine, 8 erano positivi."	Distinzione tra RNA genomico rilevato tramite PCR e virus realmente replicanti.
11/03/2020	6	"Non ancora chiaro se il problema di contaminazione sia stato risolto, poiché non ci sono state ulteriori forniture."	La problematica di contaminazione resta irrisolta.
24/03/2020	8	"Campioni con CT molto alti, RNA presente, ma non più infettivi in coltura cellulare."	Si riconosce il limite del CT come indicatore di RNA non infettivo.
09/04/2020	7	"Decisione: la PCR rimane il gold standard e unico criterio per la diagnostica dell'infezione. È necessario pubblicare una dichiarazione sul sito web."	La PCR viene istituzionalizzata come "gold standard" tramite decisione, non sulla base di evidenze scientifiche definitive.
16/04/2020	7	"Ancora problemi di contaminazione presso un'azienda."	Continuano i problemi di contaminazione con i materiali per la PCR.

17/04/2020	4	"I criteri di dimissione indicano che un risultato PCR positivo in una persona guarita non implica necessariamente infettività. In questi casi è sempre necessaria una coltura virale."	Conferma che una PCR positiva non equivale a infettività, se non supportata da coltura cellulare.
29/04/2020	7	"Elevata percentuale di risultati PCR falsi positivi. Nella valutazione intermedia di INSTAND, si osserva una percentuale relativamente alta di risultati falsi positivi."	Si conferma l'esistenza di risultati falsi positivi nei test PCR, contribuendo a gonfiare i dati dei "casi".

06/05/2020	1	"RNA frammenti possono essere rilevati fino a 2 mesi dopo, ma con test in coltura non si trovano virus vivi in questi pazienti. La PCR per il monitoraggio dell'andamento non è adatta."	Si evidenzia che la PCR non è adatta per monitorare l'infettività o l'andamento della malattia, distinguendo tra RNA rilevabile e virus infettivi.
	1	"I CT dipendono dal test e non possono essere facilmente interpretati come infettivi o meno. CT > 25 non equivale automaticamente a non infettivo."	Si conferma che il valore del CT è test-dipendente e non può essere universalmente associato a infettività o non infettività.
05/06/2020	1	"Anche con un doppio test PCR, i risultati non sono sufficientemente affidabili. Non è possibile una dichiarazione certa su risultati falsi positivi o falsi negativi."	Riguarda la difficoltà di ottenere risultati affidabili dai test PCR, anche con doppia verifica.

15/06/2020	9	"I campioni sono stati analizzati con PCR e coltura cellulare. Si è osservato che (tranne per un caso isolato sotto immunosoppressione) dopo >7 giorni dall'inizio dei sintomi, in coltura non cresceva più nulla. Un cut-off è stato fissato a CT 30."	Conferma empirica che CT > 30 corrisponde a non infettività in coltura cellulare; un caso con CT 29 era un'eccezione.
17/06/2020	4	"Un articolo nell'attuale Ärzteblatt discute l'interpretazione dei risultati PCR su SARS-CoV-2, enfatizzando l'importanza della probabilità pre-test."	L'importanza della probabilità pre-test per evitare interpretazioni errate dei risultati viene enfatizzata, come discusso in precedenza nei punti 3.4.
	13	"Sono disponibili quasi 2 milioni di risultati PCR. Non è possibile correlare con i dati clinici."	Conferma che molti test PCR vengono eseguiti senza riferimento al quadro clinico, sollevando interrogativi sulla loro utilità per la gestione dei pazienti.
19/06/2020	8	"È necessario utilizzare il valore CT e, se possibile, i risultati della coltura (assenza di sintomi?) per supportare le decisioni."	Si ribadisce che il CT e i risultati delle colture cellulari sono fondamentali per decisioni informate su infettività e gestione dei pazienti.
	8	"La PCR per SARS-CoV-2 è meno affidabile rispetto ad altri agenti patogeni; la specificità nei ring trials è stata in alcuni casi del 92%, non superiore al 98%."	Valutazione critica della PCR, ritenuta meno affidabile rispetto ad altri metodi diagnostici per patogeni diversi da SARS-CoV-2.

14/08/2020	2	"Nota dal Lagezentrum BMG: il riferimento all'ISO è stato consapevolmente rimosso, qualsiasi test PCR nella lista del RKI deve essere accettato."	La rimozione del riferimento all'ISO implica una diminuzione degli standard di certificazione per i test PCR accettati.
------------	---	---	---

I verbali delle riunioni del primo semestre del Comitato di Crisi del RKI dimostrano che, già all'inizio, i seguenti punti evidenziati nel presente parere erano noti e discussi correttamente a livello tecnico:

- **Punti 2.1 e 4:** La PCR non dimostra l'infettività, ma rileva solo frammenti genomici dell'RNA virale senza alcuna correlazione clinica.
- **Punto 3.7:** I materiali per PCR presentano problemi di contaminazione, che possono portare a risultati falsi positivi, oltre a problemi nei processi operativi dei laboratori, con conseguenti falsi positivi.

Questi aspetti erano conosciuti e trattati nei comitati tecnici, ma senza che ne venissero tratte le dovute conseguenze per informare adeguatamente il pubblico o per opporsi ai test di massa, in particolare su soggetti "asintomatici". Ciò nonostante, in diverse dichiarazioni era stato sottolineato che il test su persone sane non era ritenuto sensato:

- *"Procedura standard in Germania: il test su persone asintomatiche non è sensato e spreca risorse."* (Verbale dell'11.02.2020)
- *"Proposta per un messaggio chiaro per la conferenza stampa di domani: nessun test su persone asintomatiche."* (Verbale del 10.03.2020).

Inoltre, è stato documentato che, almeno nel primo semestre del 2020, i test erano in gran parte non validati e non sottoposti a controlli adeguati.

6. Conclusione e Sintesi

Sulla validità dei test PCR (PCR, RT-PCR o RT-qPCR) per rilevare l'infettività del coronavirus SARS-CoV-2

1. Alla luce dei problemi e delle limitazioni tecniche presentate in questo documento, la PCR in tutte le sue varianti (PCR, RT-PCR o RT-qPCR) è idonea esclusivamente per rilevare frammenti genomici e non rappresenta uno strumento diagnostico affidabile (o autorizzato) per identificare virus SARS-CoV-2 integri, infettivi (e quindi replicabili).
2. Questa tecnica molecolare non può in alcun modo essere utilizzata come prova dell'infettività di una persona, poiché ciò richiederebbe che siano presenti e rilasciati agenti patogeni integri (infettivi) in quantità sufficiente.
3. Inoltre, il risultato di un test PCR rappresenta un semplice dato di laboratorio che, considerati gli aspetti discussi, può essere utilizzato per valutare una possibile infezione virale solo se integrato con una diagnosi clinica dei sintomi (eseguita da operatori sanitari, in Germania da medici).

Sintesi

La PCR può essere uno strumento diagnostico utile per confermare una diagnosi sospetta o differenziale, **MA**:

L'utilizzo della PCR (in qualsiasi forma: RT-PCR, RT-qPCR) per testare persone asintomatiche o anche sintomatiche attraverso tamponi naso-faringei, come avviene in modo massivo, non critico e prevalentemente eseguito da personale non medico senza (aspetto cruciale: in violazione delle raccomandazioni dell'OMS) un'adeguata raccolta anamnestica e valutazione dei sintomi, non è idoneo a identificare un'infezione, né tantomeno un'infettività da SARS-CoV-2 o da altri virus/patogeni.

7. Allegati

ALLEGATO 1: Definizione di "infezione" e "paziente"

ALLEGATO 2: Descrizione della PCR dell'Ufficio svizzero per la protezione della popolazione (Laboratorio Spiez)

ALLEGATO 3: Rappresentazione grafica dei valori CT in rapporto al numero di genomi di partenza, utilizzando come esempio il kit di test Viasure

ALLEGATO 4: Revisione autorevole sui vari metodi diagnostici di Isabella Eckerle, pubblicata su *Nature Reviews Microbiology* il 02/12/2022, con evidenziazioni in giallo

ALLEGATO 5: Lettera di ritrattazione pubblicata su *Science*

ALLEGATO 6: Ministero della Salute australiano



WHO Information Notice for IVD Users 2020/05

Nucleic acid testing (NAT) technologies that use polymerase chain reaction (PCR) for detection of SARS-CoV-2

20 January 2021 | Medical product alert | Geneva | Reading time: 1 min (370 words)

[Français](#)

[Español](#)

Product type: Nucleic acid testing (NAT) technologies that use polymerase chain reaction (PCR) for detection of SARS-CoV-2

Date: 13 January 2021

WHO-identifier: 2020/5, version 2

Target audience: laboratory professionals and users of IVDs.

Purpose of this notice: clarify information previously provided by WHO. This notice supersedes WHO Information Notice for In Vitro Diagnostic Medical Device (IVD) Users 2020/05 version 1, issued 14 December 2020.

Description of the problem: WHO requests users to follow the instructions for use (IFU) when interpreting results for specimens tested using PCR methodology.

Users of IVDs must read and follow the IFU carefully to determine if manual adjustment of the PCR positivity threshold is recommended by the manufacturer.

WHO guidance [Diagnostic testing for SARS-CoV-2](#) states that careful interpretation of weak positive results is needed (1). The cycle threshold (Ct) needed to detect virus is inversely proportional to the patient's viral load. Where test results do not correspond with the clinical presentation, a new specimen should be taken and retested using the same or different NAT technology.

WHO reminds IVD users that disease prevalence alters the predictive value of test results; as disease prevalence decreases, the risk of false positive increases (2). This means that the probability that a person who has a positive result (SARS-CoV-2 detected) is truly infected with SARS-CoV-2 decreases as prevalence decreases, irrespective of the claimed specificity.

Most PCR assays are indicated as an aid for diagnosis, therefore, health care providers must consider any result in combination with timing of sampling, specimen type, assay specifics, clinical observations, patient history, confirmed status of any contacts, and epidemiological information.

Actions to be taken by IVD users:

1. Please read carefully the IFU in its entirety.
2. Contact your local representative if there is any aspect of the IFU that is unclear to you.
3. Check the IFU for each incoming consignment to detect any changes to the IFU.
4. Provide the Ct value in the report to the requesting health care provider.

Contact person for further information:

Anita SANDS, Regulation and Prequalification, World Health Organization, e-mail: rapidalert@who.int

References:

1. Diagnostic testing for SARS-CoV-2. Geneva: World Health Organization; 2020, WHO reference number WHO/2019-nCoV/laboratory/2020.6.
2. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 2: Predictive values. *BMJ*. 1994 Jul 9;309(6947):102. doi: 10.1136/bmj.309.6947.102.

Subscribe to our newsletters →