

Übersetzung von

<https://cormandrostenreview.com/report/>

Externes Peer Review des RTPCR-Tests zum Nachweis von SARS-CoV-2 zeigt 10 wichtige wissenschaftliche Mängel auf molekularer und methodischer Ebene: Konsequenzen für falsch positive Ergebnisse

November 2020 DOI: 10.5281 / zenodo.4298004

Projekt: Wissenschaft gegen Panik in der COVID-19-Krise

Abstrakt

Dieser ausführliche Überprüfungsbericht wurde am 27. November 2020 offiziell über sein Einreichungsportal an die Redaktion von Eurosurveillance übermittelt. Diesem Überprüfungsbericht ist ein von allen Haupt- und Mitautoren unterzeichnetes Widerrufsschreiben beigelegt. Der erste und der letzte aufgeführte Name sind der erste und der zweite Hauptautor. Alle Namen dazwischen sind Mitautoren. Weitere Details finden Sie unter <https://cormandrostenreview.com/>

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

(* Corresponding author)

ABSTRAKT

In der Veröffentlichung mit dem Titel „Nachweis des neuartigen Coronavirus 2019 (2019-nCoV) durch Echtzeit-RT-PCR“ (Eurosurveillance 25 (8) 2020) präsentieren die Autoren einen diagnostischen Workflow und ein RT-qPCR-Protokoll zum Nachweis und zur Diagnose von 2019-nCoV (jetzt als SARS-CoV-2 bekannt), von denen sie behaupten, dass sie validiert sind, sowie eine robuste Diagnosemethode für den Einsatz in Laborumgebungen im öffentlichen Gesundheitswesen sind. In Anbetracht aller Konsequenzen, die sich aus dieser Veröffentlichung für Gesellschaften weltweit ergeben, führte eine Gruppe unabhängiger Forscher eine Punkt-für-Punkt-Überprüfung der oben genannten Veröffentlichung durch, in der

- 1) alle Komponenten des vorgestellten Testdesigns überprüft wurden,
- 2) die Empfehlungen des RT-qPCR-Protokolls wurden anhand der guten Laborpraxis bewertet und
- 3) Parameter, die anhand einschlägiger wissenschaftlicher Literatur auf diesem Gebiet untersucht wurden.

Das veröffentlichte RT-qPCR-Protokoll zur Erkennung und Diagnose von 2019-nCoV und das Manuskript leiden unter zahlreichen technischen und wissenschaftlichen Fehlern, einschließlich unzureichender Grundierung, ein problematisches und unzureichendes RT-qPCR-Protokoll und das Fehlen einer genauen Testvalidierung. Weder der vorgestellte Test noch das Manuskript selbst erfüllen die Voraussetzungen für eine akzeptable wissenschaftliche Veröffentlichung. Darüber hinaus werden schwerwiegende Interessenkonflikte der Autoren nicht erwähnt. Und schließlich, der sehr kurze Zeitraum zwischen Einreichung und Annahme der Veröffentlichung (24 Stunden) bedeutet, dass ein systematischer Peer-Review-Prozess hier entweder nicht durchgeführt wurde oder von problematisch schlechter Qualität ist. Wir liefern überzeugende Beweise für verschiedene wissenschaftliche Unzulänglichkeiten, Fehler und Mängel. Angesichts der hier vorgestellten wissenschaftlichen und methodischen Mängel sind wir zuversichtlich, dass die Redaktion von Eurosurveillance keine andere Wahl hat, als die Veröffentlichung zurückzuziehen.

PRÄZISER ÜBERPRÜFUNGSBERICHT

Dieses Papier wird zahlreiche schwerwiegende Mängel im Corman-Drosten-Papier aufzeigen, welches zu einer weltweiten Fehldiagnose von Infektionen führt, die SARS-CoV-2 im Zusammenhang mit der Krankheit COVID-19 betreffen. Wir sind mit strengen Lockdowns konfrontiert, die das Leben und den Lebensunterhalt vieler Menschen zerstören und den Zugang zu

Bildung einschränkt. Diese auferlegten Beschränkungen durch Regierungen auf der ganzen Welt sind ein direkter Angriff auf die Grundrechte der Menschen und ihre persönlichen Freiheiten, was zu Kollateralschäden für ganze Volkswirtschaften im globalen Maßstab führt. Es gibt zehn fatale Probleme mit dem Corman-Drosten-Papier, die wir skizzieren und erklären dies in den folgenden Abschnitten ausführlich. Das erste und wichtigste Problem ist, dass das neuartige Coronavirus SARS-CoV-2 (in der Veröffentlichung mit dem Namen 2019-nCoV und im Februar 2020 mit dem Namen SARS-CoV-2 von einem internationalen Konsortium von Virosexperten) auf in silico (theoretischen) Sequenzen basiert, geliefert von einem Labor in China [1], da den Autoren zu diesem Zeitpunkt weder Kontrollmaterial für infektiöses ("lebendes") oder inaktiviertes SARS-CoV-2 noch isolierte genomische RNA des Virus zur Verfügung stand. Bisher wurde von der Autorschaft keine Validierung basierend auf isolierten SARS-CoV-2-Viren oder deren RNA in voller Länge durchgeführt.

Corman et al.: „Wir wollten robuste Diagnosemethoden für den Einsatz in Laborumgebungen des öffentlichen Gesundheitswesens entwickeln und einsetzen, ohne dass Virenmaterial verfügbar ist.“ [1] Der Schwerpunkt sollte hier auf den beiden genannten Zielen liegen: a) Entwicklung und b) Einsatz eines Diagnosetests zur Verwendung in Laborumgebungen des öffentlichen Gesundheitswesens. Diese Ziele sind nicht erreichbar, ohne dass tatsächlich Virusmaterial verfügbar ist (z. B. zur Bestimmung der infektiösen Viruslast). In jedem Fall kann nur ein Protokoll mit maximaler Genauigkeit das obligatorische und primäre Ziel in jedem Szenario-Ergebnis dieser Größenordnung sein. Die Bestimmung der kritischen Viruslast ist eine obligatorische Information, und es liegt in der Verantwortung der Gruppe von Christian Drosten, diese Experimente durchzuführen und die entscheidenden Daten bereitzustellen. Trotzdem wurden diese in silico (theoretischen)-Sequenzen verwendet, um eine RT-PCR-Testmethode zur Identifizierung des vorgenannten Virus zu entwickeln. Dieses Modell basierte auf der Annahme, dass das neuartige Virus SARS-CoV aus dem Jahr 2003 (im Folgenden SARS-CoV-1 genannt) sehr ähnlich ist, da beide Beta-Coronaviren sind. Der PCR-Test wurde daher unter Verwendung der Genomsequenz von SARS-CoV-1 als Kontrollmaterial für die Sarbeco-Komponente entworfen; Wir wissen dies aus unserer persönlichen E-Mail-Kommunikation mit [2] einem der Mitautoren des Corman-Drosten-Papiers. Diese Methode zur Modellierung von SARS-CoV-2 wurde im Corman-Drosten-Papier wie folgt beschrieben: „Einrichtung und Validierung eines diagnostischen Workflows für das 2019-nCoV-Screening und der spezifischen Bestätigung, der in Abwesenheit verfügbarer Virusisolate oder Originalpatientenproben entwickelt wurde. Design und Validierung wurden durch die enge genetische Verwandtschaft mit dem SARS-CoV des Jahres 2003 ermöglicht und wird durch den Einsatz der synthetischen Nukleinsäuretechnologie unterstützt.“

Kurz gesagt, ein Design, das sich lediglich auf nahe genetische Verwandte stützt, erfüllt nicht das Ziel eines „robusten diagnostischen Tests“, da Kreuzreaktivität und daher zwangsläufig falsch positive Ergebnisse auftreten. Die Validierung erfolgte nur in Bezug auf in silico (theoretische) Sequenzen und innerhalb des Labors und nicht wie für die In-vitro-Diagnostik mit isolierter genomischer viraler RNA erforderlich. Diese Tatsache hat sich auch nach 10 Monaten Einführung des Tests in die Routinediagnostik nicht geändert.

Es gibt zahlreiche andere schwerwiegende wissenschaftliche Fehler hinsichtlich des biomolekularen Designs der Primer, der PCR-Methode sowie der molekularen Validierung der im Corman-Drosten-Papier beschriebenen PCR-Produkte und -Methoden, die in den folgenden Kapiteln ausführlich untersucht werden. Das Papier selbst zeigt bereits, dass mit diesem Test auch unter kontrollierten Laborbedingungen eine große Anzahl falsch positiver Ergebnisse erzielt wird, was ihn als zuverlässige Viren-Screening-Methode für ganze Populationen bei einer anhaltenden Pandemie völlig ungeeignet macht. Angesichts der weitreichenden Auswirkungen, einschließlich Quarantänemaßnahmen, Sperrungen, Ausgangssperren und Auswirkungen auf die Bildung usw., muss dieses Papier sofort zurückgezogen werden.

DESIGN UND FEHLER in der RT-PCR

Die Reverse Transcription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine wichtige biomolekulare Technologie zum schnellen Nachweis seltener RNA-Fragmente, die im Voraus bekannt sind. Im

ersten Schritt werden in der Probe vorhandene RNA-Moleküle revers transkribiert, um cDNA zu erhalten. Die cDNA wird dann in der Polymerasekettenreaktion unter Verwendung eines spezifischen Primerpaars und eines thermostabilen DNA-Polymeraseenzym amplifiziert. Die Technologie ist hochempfindlich und ihre Nachweisgrenze liegt theoretisch bei 1 Molekül cDNA. Die Spezifität der PCR wird stark von biomolekularen Designfehlern beeinflusst. Was ist wichtig beim Entwerfen eines RT-PCR-Tests und des in der Corman-Drosten-Veröffentlichung beschriebenen quantitativen RT-qPCR-Tests?

1. Die Primer und Sonden:

- a) Die Konzentration der Primer und Sonden muss im optimalen Bereich liegen (100-200 nM).
- b) muss spezifisch für das Zielgen sein, das Sie amplifizieren möchten.
- c) muss einen optimalen Prozentsatz des GC-Gehalts im Verhältnis zu den gesamten stickstoffhaltigen Basen aufweisen (mindestens 40%, höchstens 60%)
- d) Für die Virendiagnostik müssen mindestens 3 Primerpaare 3 virale Gene nachgewiesen werden (vorzugsweise so weit wie möglich voneinander entfernt im viralen Genom).

2. Die Temperatur, bei der alle Reaktionen stattfinden:

- a) DNA-Schmelztemperatur ($> 92^{\circ}$)
- b) DNA-Amplifikationstemperatur (TaqPol-spezifisch)
- c) T_m ; die Annealingtemperatur (die Temperatur, bei der die Primer und Sonden die Zielbindung / -ablösung erreichen und 2°C pro Primerpaar nicht überschreiten dürfen). T_m hängt stark vom GC-Gehalt der Primer ab

3. die Anzahl der Amplifikationszyklen (weniger als 35; vorzugsweise 25-30 Zyklen); Im Falle des Virusnachweises erkennen > 35 Zyklen nur Signale, die nicht mit dem infektiösen Virus korrelieren, wie durch Isolierung in Zellkultur bestimmt [Übersicht in 2]; Wenn jemand durch PCR als positiv getestet wird, bei dem ein Schwellenwert von 35 Zyklen oder höher verwendet wird (wie dies in den meisten Labors in Europa und den USA der Fall ist), beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass diese Person tatsächlich infiziert ist, weniger als 3% Das Ergebnis ist zu 97 % falsch positiv.

4. Molekularbiologische Validierungen; amplifizierte PCR-Produkte müssen entweder durch Laufenlassen der Produkte in einem Gel mit einem DNA-Lineal oder durch direkte DNA-Sequenzierung validiert werden.

5. Positive und negative Kontrollen sollten spezifiziert werden, um den spezifischen Virusnachweis zu bestätigen / zu widerlegen.

6. Es sollte ein Standard Operational Procedure (SOP) verfügbar sein, das die oben genannten Parameter eindeutig spezifiziert, damit alle Laboratorien genau die gleichen Testbedingungen einrichten können. Eine validierte universelle SOP ist unerlässlich, da nur diese den Vergleich von Daten innerhalb und zwischen Ländern ermöglicht.

Kleinere Bedenken mit dem CORMAN-DROSTEN-PAPIER

1. In Tabelle 1 des Corman-Drosten-Papiers sind verschiedene Abkürzungen angegeben - "nm" ist hier angegeben. In Bezug auf die korrekte Nomenklatur bedeutet nm "Nanometer", daher sollte man hier nM anzeigen.

2. Es ist allgemein anerkannt, genetische Sequenzen immer in 5'-3'-Richtung zu schreiben, einschließlich der Reverse-Primer. Es ist höchst ungewöhnlich, eine Ausrichtung mit dem umgekehrten komplementären Schreiben der Primersequenz durchzuführen, wie dies die Autoren in Abbildung 2 des Corman-Drosten-Papiers getan haben. Hier wird zusätzlich eine Wobbelbasis als „y“ markiert, ohne dass die Basen beschrieben werden, für die das Y steht.

3. Zwei irreführende Fallstricke im Corman-Drosten-Papier sind, dass die in Tabelle 1 nicht die T_m -Werte (Glühtemperaturwerte) einschließen und die GC-Werte auch nicht anzeigen (Anzahl von G und C in den Sequenzen als Prozentwert der Gesamtbasen).

SCHWERWIEGENDERE BEDENKEN MIT DEM CORMAN-DROSTEN-PAPIER

A) HINTERGRUND

Die Autoren stellen den Hintergrund ihrer wissenschaftlichen Arbeit wie folgt vor: „Der anhaltende Ausbruch des kürzlich aufgetretenen neuartigen Coronavirus (2019-nCoV) stellt eine Herausforderung für Laboratorien im Bereich der öffentlichen Gesundheit dar, da Virusisolate nicht

verfügbar sind, während es zunehmend Hinweise darauf gibt, dass der Ausbruch weiter verbreitet ist als Anfangs gedacht, und internationale Verbreitung durch Reisende bereits stattfinden.“ Laut BBC News [4] und Google Statistics [5] gab es am 21. Januar 2020 - dem Tag, an dem das Manuskript eingereicht wurde - weltweit 6 Todesfälle. Warum nahmen die Autoren eine Herausforderung für die Laboratorien für öffentliche Gesundheit an, obwohl es zu diesem Zeitpunkt keine wesentlichen Beweise dafür gab, dass der Ausbruch weiter verbreitet war als ursprünglich angenommen? Als Ziel erklärten die Autoren, robuste Diagnosemethoden für den Einsatz in Laborumgebungen des öffentlichen Gesundheitswesens zu entwickeln und einzusetzen, ohne dass Virenmaterial zur Verfügung steht. Darüber hinaus erkennen sie an, dass "die vorliegende Studie die enorme Reaktionsfähigkeit zeigt, die durch die Koordination von akademischen und öffentlichen Laboratorien in nationalen und europäischen Forschungsnetzwerken erreicht wird."

B) METHODEN UND ERGEBNISSE

1. Primer & Probe Design

1a) Fehlerhafte Primerkonzentrationen

Zuverlässige und genaue PCR-Testprotokolle werden normalerweise mit 100 nM bis 200 nM pro Primer entwickelt [7]. In der Corman-Drosten-Arbeit beobachten wir ungewöhnlich hohe und unterschiedliche Primerkonzentrationen für mehrere Primer (Tabelle 1). Für die Primerpaare RdRp_SARsR-F und RdRp_SARsR-R werden 600 nM bzw. 800 nM beschrieben. In ähnlicher Weise empfehlen sie für den Primer-Satz N_Sarbeco_F und N_Sarbeco_R 600 nM bzw. 800 nM [1]. Es sollte klar sein, dass diese Konzentrationen viel zu hoch sind, um für spezifische Amplifikationen von Zielgenen optimal zu sein. Es gibt keinen spezifizierten Grund, diese extrem hohen Primerkonzentrationen in diesem Protokoll zu verwenden. Diese Konzentrationen führen vielmehr zu einer erhöhten unspezifischen Bindung und PCR-Produktamplifikation.

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

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

^a W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C. FAM: 6-carboxyfluorescein; BBQ: blackberry quencher.

^b Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µL of a 10 µM primer stock solution per 25 µL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

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

Um reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, die Primerpaare eindeutig zu definieren. In der Corman-Drosten-Arbeit beobachteten wir sechs nicht spezifizierte Positionen, die durch die Buchstaben R, W, M und S angegeben sind (Tabelle 2). Der Buchstabe W bedeutet, dass an dieser Position entweder ein A oder ein T vorhanden sein kann; R bedeutet, dass es entweder ein G oder ein A geben kann; M zeigt an, dass die Position entweder ein A oder ein C sein kann; Der Buchstabe S zeigt an, dass sich an dieser Position entweder ein G oder ein C befinden kann. Diese hohe Anzahl von Varianten ist nicht nur ungewöhnlich, sondern auch für Laboratorien äußerst verwirrend. Diese sechs nicht spezifizierten Positionen könnten leicht zum Design mehrerer verschiedener alternativer Primersequenzen führen, die sich nicht auf SARS-CoV-

2 beziehen (2 verschiedene RdRp_SARsR_F-Primer + 8 verschiedene RdRp_SARS_P1-Sonden + 4 verschiedene RdRp_SARsR_R). Die Designvariationen führen unweigerlich zu Ergebnissen, die nicht einmal mit SARS-CoV-2 zusammenhängen. Daher ist die verwirrende unspezifische Beschreibung im Corman-Drosten-Papier nicht als Standard-Betriebsprotokoll geeignet. Diese nicht spezifizierten Positionen sollten eindeutig entworfen worden sein. Diese wackeligen Sequenzen haben bereits Anlass zur Sorge auf diesem Gebiet gegeben und zu einem Brief an den Herausgeber geführt, in dem Pillonel et al. [8] offensichtliche Fehler in den beschriebenen Sequenzen anführt. Diese Fehler sind bei Corman et al. Ergänzung auch zu finden.

Tabelle 2: Primer und Sonden (angepasst aus Corman-Drosten-Papier; nicht spezifizierte ("wackelige") Nukleotide in den Primern sind hervorgehoben

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence ^a	Concentration ^b
RdRp gene	RdRp_SARsR_F	GTGARATGGTCATGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARsR_P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV.
	RdRp_SARsR_P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs.
	RdRp_SARsR_R	CARATGTTAAACACATATTAGCATA	Use 100 nM per reaction and mix with P2
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 800 nM per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 400 nM per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 200 nM per reaction
	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Use 400 nM per reaction
N gene	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 600 nM per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 200 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.
^a Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µL of a 10 µM primer stock solution per 25 µL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

Das WHO-Protokoll (Abbildung 1), das direkt aus dem Corman-Drosten-Papier stammt, kommt zu dem Schluss, dass zwei Kontrollgene (das E- und das RdRp-Gen) identifiziert werden müssen, um das Vorhandensein von SARS-CoV-2 im Assay zu bestätigen. Es ist zu beachten, dass das RdRp-Gen eine unsichere Position ("wackelig") im Vorwärtsprimer (R = G / A) und zwei unsichere Positionen im Rückwärtsprimer (R = G / A; S = G) aufweist / C) und es hat drei unsichere Positionen in der RdRp-Sonde (W = A / T; R = G / A; M = A / C). Somit können zwei verschiedene Vorwärtsprimer, vier verschiedene Rückwärtsprimer und acht verschiedene Sonden für das RdRp-Gen synthetisiert werden. Zusammen gibt es 64 mögliche Kombinationen von Primern und Sonden! Das Corman-Drosten-Papier identifiziert ferner ein drittes Gen, das gemäß dem WHO-Protokoll nicht weiter validiert und als unnötig erachtet wurde: „Bemerkenswerterweise zeigte der N-Gen-Assay ebenfalls eine gute Leistung, wurde jedoch keiner intensiven weiteren Validierung unterzogen, da er etwas geringer empfindlich war.“ Dies war eine unglückliche Auslassung, da es am besten wäre, alle drei Gen-PCRs als Bestätigungstests zu verwenden, und dies hätte zu einem nahezu ausreichenden Diagnose-Tool-Protokoll für den Virus-RNA-Nachweis geführt. Drei bestätigende Testschritte würden zumindest Fehler und Unsicherheiten bei jedem Faltschritt in Bezug auf "Wackelige" Flecken minimieren. (Trotzdem würde das Protokoll immer noch hinter jeder „guten Laborpraxis“ zurückbleiben, wenn alle anderen Konstruktionsfehler berücksichtigt würden.) Derzeit wird der N-Gen-Assay leider weder in der WHO-Empfehlung (Abbildung 1) als obligatorischer und entscheidender dritter Bestätigungsschritt vorgeschlagen, noch im Corman-Drosten-Papier als wichtige optionale Bestätigung „für einen Routine-Workflow“ hervorgehoben. (Tabelle 2). Folglich wurden in fast allen Testverfahren weltweit nur 2 Primer-Matches anstelle aller drei verwendet. Dieses Versehen macht das gesamte Testprotokoll unbrauchbar, um bei einer anhaltenden Pandemie genaue Testergebnisse von wirklicher Bedeutung zu liefern.

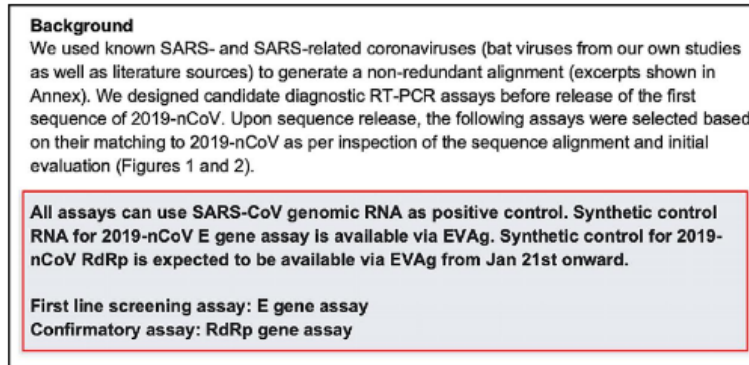


Abbildung 1: Der N-Gen-Bestätigungstest wird weder als notwendiger dritter Schritt in der offiziellen Empfehlung des WHO-Protokolls Drostén-Corman [8] noch als entscheidender Schritt für eine höhere Testgenauigkeit in der Eurosurveillance-Veröffentlichung hervorgehoben.

1c) Fehlerhafter GC-Gehalt (diskutiert in 2c zusammen mit der Glühtemperatur (T_m))

1d) Nachweis von viralen Genen

Die RT-PCR wird für die Primärdiagnose einer Infektion nicht empfohlen. Aus diesem Grund ist der in der klinischen Routine zum Nachweis von COVID-19 verwendete RT-PCR-Test für die COVID-19-Diagnose keine angezeigte regulatorische Grundlage. „Ärzte müssen die verbesserte Genauigkeit und Geschwindigkeit der molekulardiagnostischen Techniken zur Diagnose von Infektionen erkennen, aber auch ihre Grenzen verstehen. Laborergebnisse sollten immer im Zusammenhang mit der klinischen Präsentation des Patienten interpretiert werden, und für einen zuverlässigen Test sind der geeignete Ort, die Qualität und der Zeitpunkt der Probenentnahme erforderlich“.[9] Er kann jedoch verwendet werden, um die Differentialdiagnose des Arztes zu erleichtern, wenn er oder sie zwischen verschiedenen Infektionen der Lunge unterscheiden muss (Grippe, Covid-19 und SARS haben sehr ähnliche Symptome). Für eine bestätigende Diagnose eines bestimmten Virus müssen mindestens 3 spezifische Primerpaare angewendet werden, um 3 virusspezifische Gene nachzuweisen. Vorzugsweise sollten diese Zielgene mit dem größtmöglichen Abstand im viralen Genom lokalisiert sein (entgegengesetzte Enden eingeschlossen). Obwohl das Corman-Drosten-Papier 3 Primer beschreibt, decken diese Primer nur etwa die Hälfte des Virusgenoms ab. Dies ist ein weiterer Faktor, der die Spezifität für den Nachweis intakter COVID-19-Virus-RNA verringert und das Zitat falsch positiver Testergebnisse erhöht. Selbst wenn wir drei positive Signale (d. H. Die drei Primerpaare ergeben 3 verschiedene Amplifikationsprodukte) in einer Probe erhalten, beweist dies nicht das Vorhandensein eines Virus. Ein besseres Primerdesign hätte terminale Primer an beiden Enden des viralen Genoms. Dies liegt daran, dass das gesamte virale Genom abgedeckt wäre und drei positive Signale besser zwischen einem vollständigen (und damit potenziell infektiösen) Virus und fragmentierten viralen Genomen (ohne infektiöse Potenz) unterscheiden können. Um auf etwas von Bedeutung für die Infektiosität des Virus schließen zu können, sollte das Orf1-Gen, das das essentielle Replikaseenzym von SARS-CoV-1- und SARS-CoV-2-Viren codiert, als Ziel aufgenommen werden (Abbildung 2). Die Positionierung der Ziele in der Region des viralen Genoms ist am schwersten und variabelsten transkribiert, was eine weitere Schwäche des Protokolls ist. Kim et al. zeigen eine hochvariable 3'-Expression von subgenomischer RNA in Sars-CoV-2 [23]. Diese RNAs werden aktiv als Signaturen für asymptomatische und nicht infektiöse Patienten überwacht [10]. Es ist höchst fraglich, eine Population von asymptomatischen Personen mit qPCR-Primern zu screenen, die 6 Basenpaare Primer-Dimer am 3-Prim-Ende eines Primers aufweisen (Abbildung 3). Anscheinend empfiehlt die WHO diese Primer. Wir haben alle Wobble-Derivate aus dem Corman-Drosten-Papier mit dem Primer-Dimer-Web-Tool von Thermofisher getestet [11]. Der RdRp-Forward-Primer weist eine 6-bp-3-Prime-Homologie mit Sarbeco E Reverse auf. Bei hohen Primerkonzentrationen reicht dies aus, um Ungenauigkeiten zu

erzeugen. Bemerkenswert: Es gibt eine perfekte Übereinstimmung eines der N-Primer mit einem klinischen Pathogen (Pantoea), das bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem gefunden wurde. Der Reverse Primer trifft ebenfalls auf Pantoea, jedoch nicht in derselben Region (Abbildung 3). Dies sind schwerwiegende Designfehler, da der Test nicht zwischen dem gesamten Virus und viralen Fragmenten unterscheiden kann. Der Test kann nicht als Diagnose für SARS-CoV-2-Viren verwendet werden.

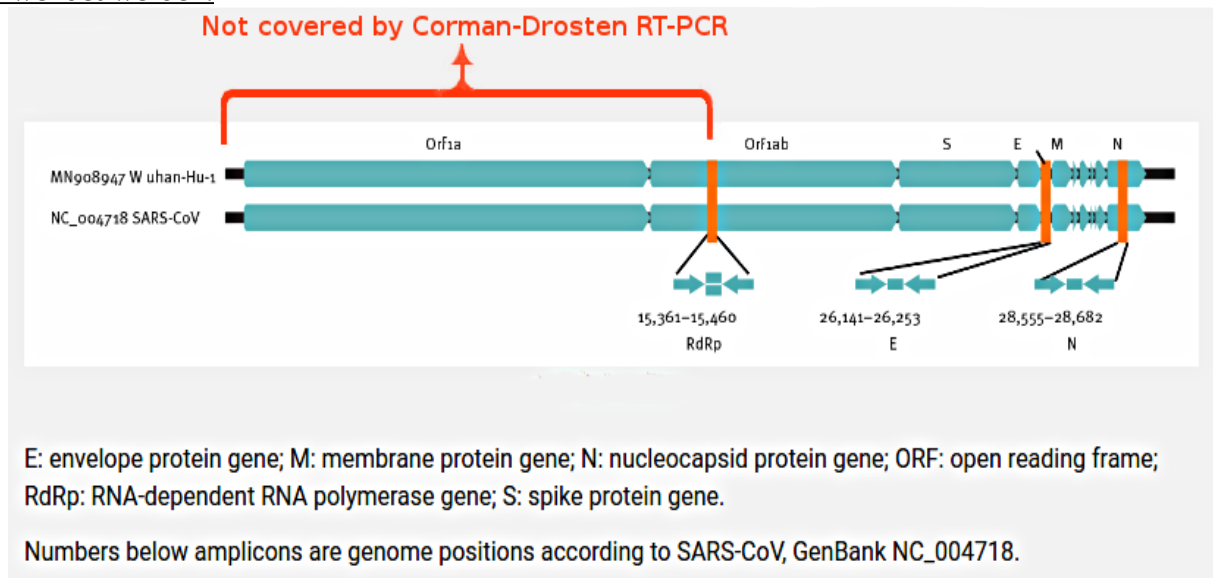


Abbildung 2: Relative Positionen von Amplikonzielen auf dem SARS-CoV-1-Coronavirus und dem neuartigen Coronavirus-Genom von 2019. ORF: offener Leserahmen; RdRp: RNA-abhängige RNA-Polymerase. Zahlen unter dem Amplikon sind Genompositionen gemäß SARS-CoV-1, NC_004718 [1];

Cross Primer Dimers:

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

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

> Corman_N_Sarbeco_F
CACATTGGCACCCGCAATC

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

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

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

Query 1 CACATTGGCACCCGCAATC 19
Sbjct 2326019 CACATTGGCACCCGCAATC 2326037

Abbildung 3: Ein Test mit dem Thermofischer Primer Dimer Web Tool zeigt, dass der RdRp Forward Primer eine 6bp 3`prime Homologie mit Sarbeco E Reverse aufweist (linkes Feld). Ein weiterer Test zeigt, dass einer der N-Primer perfekt zu einem klinischen Pathogen (Pantoea) passt, das bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem gefunden wurde (rechtes Kästchen).

2. Reaktionstemperaturen

2a) DNA-Schmelztemperatur (> 92 °).

Angemessen im Corman-Drosten-Papier angesprochen.

2b) DNA-Amplifikationstemperatur. Angemessen im Corman-Drosten-Papier angesprochen.

2c) Fehlerhafte GC-Gehalte und Tm die Annealingtemperatur bestimmt, bei welcher Temperatur der Primer an der Zielsequenz anhaftet / sich von dieser löst. Für eine effiziente und spezifische Amplifikation sollte der GC-Gehalt der Primer mindestens 40% und höchstens 60% betragen. Wie in Tabelle 3 angegeben, liegen drei der im Corman-Drosten-Papier beschriebenen Primer nicht im normalen Bereich für den GC-Gehalt. Zwei Primer (RdRp_SARSr_F und RdRp_SARSr_R) haben ungewöhnliche und sehr niedrige GC-Werte von 28% bis 31% für alle möglichen Varianten von Wobble-Basen, während der Primer E_Sarbeco_F einen GC-Wert von 34,6% aufweist (Tabelle 3 und zweites Feld von Tabelle 3). Es ist zu beachten, dass der GC-Gehalt die Bindung an sein spezifisches Ziel aufgrund seiner drei Wasserstoffbrückenbindungen bei der Basenpaarung weitgehend bestimmt. Je niedriger der GC-Gehalt des Primers ist, desto geringer ist seine Bindungsfähigkeit an seine spezifische Zielsequenz (d. H. Das nachzuweisende Gen). Dies bedeutet, dass für die Erkennung einer Zielsequenz eine Temperatur gewählt werden muss, die so nahe wie möglich an der tatsächlichen Glühtemperatur (Best-Practice-Wert) liegt, damit sich der Primer nicht wieder ablöst, während gleichzeitig die Zielsequenz. Wenn der Tm-Wert sehr niedrig ist, wie dies für alle wackeligen Varianten der RdRp-Reverse-Primer beobachtet wurde, können die Primer unspezifisch an mehrere Ziele binden, wodurch die Spezifität verringert und potenzielle falsch positive Ergebnisse erhöht werden. Die Glühtemperatur (Tm) ist ein entscheidender Faktor für die Bestimmung der Spezifität / Genauigkeit des qPCR-Verfahrens und wesentlich für die Bewertung der Genauigkeit von qPCR-Protokollen. Best-Practice-Empfehlung: Beide Primer (vorwärts und rückwärts) sollten einen nahezu ähnlichen Wert haben, vorzugsweise den gleichen Wert. Wir haben die frei verfügbare Primer-Design-Software Primer-BLAST [12, 25] verwendet, um die Best-Practice-Werte für alle im Corman-Drosten-Papier verwendeten Primer auszuwerten (Tabelle 3). Wir haben versucht, einen Tm-Wert von 60 ° C zu finden, während wir in ähnlicher Weise den höchstmöglichen GC% -Wert für alle Primer suchten. Eine maximale Tm-Differenz von 2 ° C innerhalb der Primerpaare wurde als akzeptabel angesehen. Beim Testen der im Corman-Drosten-Papier angegebenen Primerpaare beobachteten wir einen Unterschied von 10°C in Bezug auf die Glühtemperatur Tm für das Primerpaar 1 (RdRp_SARSr_F und RdRp_SARSr_R). Dies ist ein sehr schwerwiegender Fehler und macht das Protokoll als spezifisches Diagnosewerkzeug unbrauchbar. Zusätzliche Tests zeigten, dass nur das Primerpaar, das zur Amplifikation des N-Gens (N_Sarbeco_F und N_Sarbeco_R) entwickelt wurde, den angemessenen Standard für einen diagnostischen Test erreichte, da es einen ausreichenden GC-Gehalt und den Tm-Unterschied zwischen den Primern (N_Sarbeco_F und N_Sarbeco_R) aufweist) von 1,85°C hat (unterhalb des entscheidenden Maximums von 2°C Differenz). Wichtig ist, dass dies das Gen ist, das weder in den Virusproben getestet (Tabelle 2) noch als Bestätigungstest hervorgehoben wurde. Neben stark variablen Schmelztemperaturen und bei degenerierten Sequenzen in diesen Primern gibt es einen weiteren Faktor, der die Spezifität des Verfahrens beeinflusst: Die dNTPs (0,4 uM) sind 2x höher als für eine hochspezifische Amplifikation empfohlen. Der Reaktion wird zusätzlich Magnesiumsulfat zugesetzt. Dieses Verfahren kann in Kombination mit einer niedrigen Glühtemperatur unspezifische Verstärkungen erzeugen. Wenn für qPCR zusätzliches Magnesium benötigt wird, sollte die Spezifität des Assays weiter untersucht werden. Die hier beschriebenen Designfehler sind so schwerwiegend, dass es höchst unwahrscheinlich ist, dass eine spezifische Amplifikation des genetischen SARS-CoV-2-Materials unter Verwendung des Protokolls des Corman- Drostenpapier möglich ist.

Tabelle 3: GC-Gehalt der Primer und Sonden (angepasst aus Corman-Drosten-Papier; Aberrationen aufgrund optimierter GC-Gehalte werden hervorgehoben. Das zweite Feld zeigt eine Tabellenaufstellung aller Primer-BLAST-Best-Practice-Werte für alle verwendeten Primer und Sonden das Corman-Drosten-Papiers von Prof. Dr. Ulrike Kämmerer & ihrem Team

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

Assay/Use	Oligonucleotide	Sequence	Concentration ^a
RdRp gene	RdRp_SARSr-F	GTGAAATGGTCATGTGTGGCG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV
	RdRp_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTATGC-BBQ	Use 100 nM per reaction and mix with P1
	RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAACACACTATTAGCATA	Use 100 nM per reaction and mix with P2
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTATAGTAAATAGCGT	Use 400 nM per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCATCTTCTACGGCTCG-BBQ	Use 200 nM per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGACACA	Use 400 nM per reaction
	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCAGCAATC	Use 200 nM per reaction
N gene	N_Sarbeco_P	FAM-ACCTCTCAGGGAACACATTGCCA-BBQ	Use 200 nM per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGACGAGAGAGGCTTG	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.

* Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µl of a 100 µM primer stock solution per 25 µl total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

Primer pairs	Sequence (5'-3')	GC	TM	Length	Start	Stop	TM	GC%	Self 5' complementarity	Self 3' complementarity	Product length (bp)
E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTATAGTAAATAGCGT	Plus	26	26269	26294	58.29	34.62	8.00	8.00	113	
E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Minus	22	26381	26360	60.93	45.45	7.00	1.00		
N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCAGCAATC	Plus	19	28706	28724	60.15	57.89	4.00	0.00	128	
N_Sarbeco_R	GAGGACGAGAGAGGCTTG	Minus	20	28833	28814	58.00	55.00	3.00	1.00		
RdRp_SARSr-F	GTGAAATGGTCATGTGTGGCG		22			63.74	59.09	4.00	to be added in next version		
RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAACACACTATTAGCATA		25			53.56	28.00	7.00			
If R: G and S= G	GTGAGATGGTCATGTGTGGCG		22			63.74	59.09	4.00	1.00		
	CARATGTTAAACACACTATTAGCATA		26			55.22	30.77	7.00	5.00	not found in the Sequence	
If R: G and S= C	GTGAGATGGTCATGTGTGGCG		22			63.74	59.09	4.00	1.00		
	CARATGTTAAACACACTATTAGCATA		26			55.68	30.77	7.00	2.00		
If R: A and S= G	GTGAAATGGTCATGTGTGGCG		22			62.58	54.55	4.00	1.00		
	CARATGTTAAACACACTATTAGCATA		26			54.23	26.92	7.00	5.00		
If R: A and S= C	GTGAAATGGTCATGTGTGGCG		22			62.58	54.55	4.00	1.00		
	CARATGTTAAACACACTATTAGCATA		26			54.69	26.92	7.00	2.00		
Probes:											
RdRp_SARSr-P2	CAGGTGGACCTCATCAGGAGATGC		25			64.89	56.00	6.00	5.00		
RdRp_SARSr-P1	CCAGGTGGWACRTCATCMGGTATGC										
E_Sarbeco-P1	ACACTAGCATCTTCTACGGCTCG		26			66.78	53.85	4.00	2.00		
N_Sarbeco-P	ACTTCTCAGGGAACACATTGCCA		25			63.15	48.00	8.00	3.00		

3. Die Anzahl der Amplifikationszyklen

Es sollte beachtet werden, dass im Corman-Drosten-Papier nirgends erwähnt wird, dass ein Test positiv oder negativ ist oder was tatsächlich ein positives oder negatives Ergebnis definiert. Diese Arten von virologischen Diagnosetests müssen auf einer SOP basieren, einschließlich einer validierten und festen Anzahl von PCR-Zyklen (Ct-Wert), nach denen eine Probe als positiv oder negativ eingestuft wird. Der maximale einigermaßen zuverlässige Ct-Wert beträgt 30 Zyklen. Oberhalb eines Ct von 35 Zyklen muss mit einer schnell zunehmenden Anzahl von falsch positiven Ergebnissen gerechnet werden. PCR-Daten, die nach einem Ct-Wert von 35 Zyklen als positiv bewertet wurden, sind völlig unzuverlässig. Unter Berufung auf Jaafar et al. 2020 [3]: „Bei Ct = 35 der Wert, mit dem wir ein positives Ergebnis für die PCR gemeldet haben, <3% der Kulturen sind positiv.“ Mit anderen Worten, es gab keine erfolgreiche Virusisolierung von SARS-CoV-2 bei diesen hohen Ct-Werten. Darüber hinaus zeigen wissenschaftliche Studien, dass nur nichtinfektiöse (tote) Viren mit Ct-Werten von 35 nachgewiesen werden [22]. Zwischen 30 und 35 gibt es eine Grauzone, in der ein positiver Test nicht mit Sicherheit festgestellt werden kann. Dieser Bereich sollte ausgeschlossen werden. Natürlich könnte man 45 PCR-Zyklen durchführen, wie im Corman-Drosten-WHO-Protokoll empfohlen (Abbildung 4), aber dann muss man auch einen angemessenen Ct-Wert definieren (der 30 nicht überschreiten sollte). Ein Analyseergebnis mit einem Ct-Wert von 45 ist jedoch wissenschaftlich und diagnostisch absolut bedeutungslos (ein angemessener Ct-Wert sollte 30 nicht überschreiten). All dies sollte sehr klar kommuniziert werden. Es ist ein schwerwiegender Fehler, dass das Corman-Drosten-Papier nicht den maximalen Ct-Wert erwähnt, bei dem eine Probe eindeutig als positives oder negatives Testergebnis betrachtet werden kann. Dieser wichtige Schwellenwert für den Zyklus ist auch in bisherigen Folgemaßnahmen nicht festgelegt.

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

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	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
Primer RdRP_SARSr-R1 (10 µM stock solution)	2 µl	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
Probe RdRP_SARSr-P2 (10 µM stock solution)	0.5 µl	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ
SSIII/Taq EnzymeMix*	1 µl	
Total reaction mix	20 µl	
Template RNA, add	5 µl	
Total volume	25 µl	
* Thermo Fischer/Invitrogen: SuperScriptIII OneStep RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase		
** MgSO ₄ (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

4. Biomolekulare Validierungen

Um festzustellen, ob es sich bei den amplifizierten Produkten tatsächlich um SARS-CoV-2-Gene handelt, ist die biomolekulare Validierung amplifizierter PCR-Produkte unerlässlich. Für einen Diagnosetest ist diese Validierung ein absolutes Muss. Die Validierung von PCR-Produkten sollte durchgeführt werden, indem entweder das PCR-Produkt in einem 1%-igen Agarose-EtBr-Gel zusammen mit einem Größenindikator (DNA-Lineal oder DNA-Leiter) laufen gelassen wird, damit die Größe des Produkts geschätzt werden kann. Die Größe muss der berechneten Größe des Amplifikationsprodukts entsprechen. Es ist jedoch noch besser, das Amplifikationsprodukt zu sequenzieren. Letzteres gibt 100%-ige Sicherheit über die Identität des Amplifikationsprodukts. Ohne molekulare Validierung kann man sich über die Identität der amplifizierten PCR-Produkte nicht sicher sein. In Anbetracht der zuvor beschriebenen schwerwiegenden Designfehler können die amplifizierten PCR-Produkte alles sein. In dem Corman-Drosten-Papier wird auch der Fall kleiner Fragmente von qPCR (etwa 100 bp) nicht erwähnt: Es kann sich entweder um 1,5% Agarosegel oder sogar um ein Acrylamidgel handeln. Die Tatsache, dass diese PCR-Produkte nicht auf molekularer Ebene validiert wurden, ist ein weiterer auffälliger Fehler des Protokolls, der jeden darauf basierenden Test als spezifisches Diagnosewerkzeug zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus unbrauchbar macht.

5. Positive und negative Kontrollen zur Bestätigung / Widerlegung des spezifischen Virusnachweises.

Die im Corman-Drosten-Artikel beschriebene unbestätigte Annahme ist, dass SARS-CoV-2 das einzige Virus aus der SARS-ähnlichen Beta-Coronavirus-Gruppe ist, das derzeit beim Menschen Infektionen verursacht. Die Sequenzen, auf denen ihre PCR-Methode basiert, sind in silico-Sequenzen, die von einem Labor in China geliefert wurden [23], da zum Zeitpunkt der Entwicklung des PCR-Tests kein Kontrollmaterial für infektiöses ("lebendes") oder inaktiviertes SARS-CoV-2 den Autoren zur Verfügung stand. Der PCR-Test wurde daher unter Verwendung der Sequenz des bekannten SARS-CoV-1 als Kontrollmaterial für die Sarbeco-Komponente entworfen (Dr. Meijer, Co-Autor des Corman-Drosten-Papiers in einem E-Mail-Austausch mit Dr. Peter Borger) [2]. Es wird angenommen, dass alle Personen, die mit dem RT-PCR-Test positiv getestet wurden, wie im Corman-Drosten-Papier beschrieben, positiv für SARS-CoV-2-Infektionen sind. Ihre Annahme weist drei schwerwiegende Mängel auf. Erstens kann ein positiver Test für die im Corman-Drosten-Papier beschriebenen RNA-Moleküle nicht mit einer „Infektion mit einem Virus“ gleichgesetzt werden. Ein positiver RT-PCR-Test zeigt lediglich das Vorhandensein viraler RNA-Moleküle an. Wie unter Punkt 1d (oben) gezeigt, wurde der Corman-Drosten-Test nicht zum Nachweis des Virus in voller Länge entwickelt, sondern nur eines Fragmentes des Virus. Wir sind bereits zu dem Schluss gekommen, dass dies den Test als ungeeignet als diagnostischen Test für SARS-Virusinfektionen einstuft. Zweitens und von großer Relevanz wurde die Funktionalität des veröffentlichten RT-PCR-Tests unter Verwendung einer Positivkontrolle (isolierte SARS-CoV-2-

RNA), die ein wesentlicher wissenschaftlicher Goldstandard ist, nicht nachgewiesen. Drittens heißt es im Corman-Drosten-Papier: „Um zu zeigen, dass die Assays andere Fledermaus-assoziierte SARS-verwandte Viren nachweisen können, haben wir den E-Gen-Assay verwendet, um sechs von Fledermäusen abgeleitete Stuhlproben von Drexler et al. [...] und Muth et al. [...]. Diese viruspositiven Proben stammten von europäischen Rhinolophidenfledermäusen. Der Nachweis dieser phylogenetischen Ausreißer innerhalb der SARS-verwandten CoV-Klade legt nahe, dass wahrscheinlich alle asiatischen Viren nachgewiesen werden. Dies würde theoretisch eine breite Empfindlichkeit sicherstellen, selbst wenn mehrere unabhängige Virenvarianten aus einem Tierreservoir erworben werden.“ Diese Aussage zeigt, dass das im RT-PCR-Test verwendete E-Gen, wie im Corman-Drosten-Papier beschrieben, nicht spezifisch für SARS-CoV-2 ist. Die E-Gen-Primer detektieren auch ein breites Spektrum anderer SARS-Viren. Das Genom des Coronavirus ist das größte aller RNA-Viren, die Menschen infizieren, und alle haben eine sehr ähnliche Molekülstruktur. Dennoch weisen SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 zwei hochspezifische genetische Fingerabdrücke auf, die sie von den anderen Coronaviren unterscheiden. Erstens ist im N-Protein von SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 eine einzigartige Fingerabdrucksequenz (KTFPPTEPKKDKKKK) vorhanden [13, 14, 15]. Zweitens enthalten sowohl SARS-CoV-1 als auch SARS-CoV-2 kein HE-Protein, während alle anderen Coronaviren dieses Gen besitzen [13, 14]. Um ein SARS-CoV-1- und SARS-CoV-2-PCR-Produkt spezifisch nachzuweisen, sollte die obige Region im N-Gen als Amplifikationsziel ausgewählt worden sein. Ein zuverlässiger diagnostischer Test sollte sich als Bestätigungstest auf diese spezifische Region im N-Gen konzentrieren. Die PCR für dieses N-Gen wurde vom Drosten-Corman-Papier weder weiter validiert noch als Testgen empfohlen, da es mit der SARS-CoV-Originalsonde „nicht so empfindlich“ ist [1]. Darüber hinaus macht das Fehlen des HE-Gens sowohl in SARS-CoV-1 als auch in SARS-CoV-2 dieses Gen zur idealen Negativkontrolle, um andere Coronaviren auszuschließen. Das Corman-Drosten-Papier enthält weder diese Negativkontrolle noch andere Negativkontrollen. Der PCR-Test im Corman-Drosten-Papier enthält daher weder eine eindeutige Positivkontrolle noch eine Negativkontrolle, um das Vorhandensein anderer Coronaviren auszuschließen. Dies ist ein weiterer schwerwiegender Konstruktionsfehler, der den Test als für die Diagnose ungeeignet einstuft.

6. Standard Operational Procedure (SOP) ist nicht verfügbar

Es sollte ein Standard Operational Procedure (SOP) verfügbar sein, das die oben genannten Parameter eindeutig spezifiziert, damit alle Laboratorien die gleichen Testbedingungen einrichten können. Eine validierte universelle SOP ist unerlässlich, da sie den Datenvergleich innerhalb und zwischen Ländern erleichtert. Es ist sehr wichtig, alle Primerparameter eindeutig anzugeben. Wir stellen fest, dass dies nicht getan wurde. Ferner ist der Ct-Wert, der angibt, wann eine Probe als positiv oder negativ angesehen werden soll, nicht angegeben. Es wird auch nicht angegeben, wann eine Probe als mit SARS-CoV-Viren infiziert gilt. Wie oben gezeigt, kann der Test nicht zwischen Virus und Virusfragmenten unterscheiden, daher ist der Ct-Wert, der die Positivität anzeigt, von entscheidender Bedeutung. Dieser Ct-Wert sollte im Standard Operational Procedure (SOP) angegeben und online gestellt worden sein, damit alle Laboratorien, die diesen Test durchführen, genau die gleichen Randbedingungen haben. Es weist auf eine fehlerhafte Wissenschaft hin, dass eine solche SOP nicht existiert. Den Laboratorien steht es daher frei, den Test nach eigenem Ermessen durchzuführen, was zu einer enormen Variation führt. Laboratorien in ganz Europa haben eine Vielzahl von Fragen. Welche Primer bestellen? Welche Nukleotide sollen an den undefinierten Stellen ausgefüllt werden? Welchen Tm-Wert soll ich wählen? Wie viele PCR-Zyklen müssen ausgeführt werden? Bei welchem Ct-Wert ist die Probe positiv? Und wann ist es negativ? Und wie viele Gene sollen getestet werden? Sollten alle Gene getestet werden oder nur das E- und RpRd-Gen, wie in Tabelle 2 des Corman-Drosten-Papiers gezeigt? Sollte auch das N-Gen getestet werden? Und was ist ihre negative Kontrolle? Was ist ihre positive Kontrolle? Das beschriebene Protokoll ist leider sehr vage und fehlerhaft im Design, so dass man in Dutzende verschiedene Richtungen gehen kann. Es scheint weder eine Standardisierung noch eine SOP zu geben, daher ist nicht klar, wie dieser Test implementiert werden kann.

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

Der im Corman-Drosten-Papier beschriebene RT-PCR-Test enthält so viele molekularbiologische Designfehler (siehe 1-5), dass keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden können. Es ist unvermeidlich, dass dieser Test eine enorme Anzahl von sogenannten "False Positives" erzeugt. Die Definition von falsch positiven Ergebnissen ist eine negative Stichprobe, die anfänglich positiv bewertet wird, aber nach erneutem Testen mit demselben Test negativ ist. Falsch positive Ergebnisse sind fehlerhafte positive Testergebnisse, d. h. negative Proben, die positiv getestet werden. Und genau das findet sich in dem Corman-Drosten Papier. Auf Seite 6 der Manuskript-PDF zeigen die Autoren, dass mit diesem Test auch unter gut kontrollierten Laborbedingungen ein erheblicher Prozentsatz falsch positiver Ergebnisse erzeugt wird: „In vier einzelnen Testreaktionen wurde eine schwache Anfangsreaktivität festgestellt, die jedoch beim erneuten Testen negativ war mit dem gleichen Assay. Diese Signale waren mit keinem bestimmten Virus assoziiert, und für jedes Virus, bei dem eine anfängliche positive Reaktivität auftrat, gab es andere Proben, die das gleiche Virus in einer höheren Konzentration enthielten, jedoch nicht positiv testeten. Angesichts der Ergebnisse der oben beschriebenen umfassenden technischen Qualifizierung wurde der Schluss gezogen, dass diese anfängliche Reaktivität nicht auf die chemische Instabilität von Echtzeit-PCR-Sonden und höchstwahrscheinlich auf Probleme bei der Handhabung zurückzuführen ist, die durch die rasche Einführung neuer diagnostischer Tests und Kontrollen während dieser Bewertung verursacht wurden.“ [1] Der erste Satz dieses Auszugs ist ein klarer Beweis dafür, dass der im Corman-Drosten-Papier beschriebene PCR-Test falsch positive Ergebnisse liefert. Selbst unter den gut kontrollierten Bedingungen des hochmodernen Charité-Labors sind 4 von 310 Primärtests per Definition falsch positiv. Vier negative Proben wurden anfänglich positiv getestet und waren dann beim erneuten Testen negativ. Dies ist das klassische Beispiel für ein falsches Positiv. In diesem Fall identifizieren die Autoren sie nicht als falsch positiv, was intellektuell unehrlich ist. Eine weitere verräterische Beobachtung im obigen Auszug ist, dass die Autoren die falsch positiven Ergebnisse als "Probleme bei der Handhabung erklären, die durch die rasche Einführung neuer diagnostischer Tests verursacht werden". Stellen Sie sich die Labore vor, die den Test ohne alle erforderlichen Informationen einführen müssen, die normalerweise in einer SOP beschrieben werden.

8. Das Corman-Drosten-Papier wurde nicht von unabhängigen Experten begutachtet

Vor der offiziellen Veröffentlichung in einer wissenschaftlichen Zeitschrift werden wissenschaftliche und medizinische Artikel traditionell durch „Peer Review“ zertifiziert. In diesem Prozess lassen sich die Redakteure des Journals von verschiedenen Experten („Schiedsrichtern“) beraten, die das Papier bewertet haben und möglicherweise Schwachstellen in seinen Annahmen, Methoden und Schlussfolgerungen feststellen. In der Regel veröffentlicht eine Zeitschrift einen Artikel erst, wenn die Herausgeber davon überzeugt sind, dass die Autoren die Bedenken der Schiedsrichter berücksichtigt haben und die präsentierten Daten die Schlussfolgerungen des Papiers stützen. Dieser Prozess ist auch für die Eurosurveillance beschrieben [16]. Das Papier von Corman-Drosten wurde am 21. Januar 2020 bei Eurosurveillance eingereicht und am 22. Januar 2020 zur Veröffentlichung angenommen. Am 23. Januar 2020 war das Papier online. Am 13. Januar 2020 wurde die Version 1-0 des Protokolls auf der offiziellen Website der WHO [17] veröffentlicht, die am 17. Januar 2020 als Dokumentversion 2-1 [18] aktualisiert wurde, noch bevor das Corman-Drosten-Papier am 23. Januar von Eurosurveillance veröffentlicht wurde. Normalerweise ist Peer Review ein zeitaufwändiger Prozess, da mindestens zwei Experten aus dem Bereich das eingereichte Papier kritisch lesen und kommentieren müssen. Unserer Meinung nach wurde dieses Papier nicht von Experten begutachtet. Vierundzwanzig Stunden reichen einfach nicht aus, um eine gründliche Begutachtung durchzuführen. Unsere Schlussfolgerung wird durch die Tatsache gestützt, dass wir eine enorme Anzahl sehr schwerwiegender Designfehler festgestellt haben, die den PCR-Test als diagnostisches Instrument zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus völlig ungeeignet machen. Jeder Molekularbiologe, der mit dem RT-PCR-Design vertraut ist, hätte die schwerwiegenden Fehler, die im Corman-Drosten-Papier vorhanden sind, vor dem eigentlichen Überprüfungsprozess leicht beobachtet. Wir haben Eurosurveillance am 26. Oktober 2020 gebeten, uns eine Kopie des Peer-Review-Berichts zu senden. Bisher haben wir diesen Bericht nicht erhalten,

und in einem Schreiben vom 18. November 2020 lehnte das ECDC als Gastgeber der Eurosurveillance den Zugang ab, ohne wesentliche wissenschaftliche Gründe für ihre Entscheidung anzugeben. Im Gegenteil, sie schreiben, dass "Offenlegung den Zweck wissenschaftlicher Untersuchungen untergraben würde".[24].

9. Autoren als Herausgeber

Ein letzter Punkt ist von großer Bedeutung. Es stellt sich heraus, dass zwei Autoren des Corman-Drosten-Papiers, Christian Drosten und Chantal Reusken, ebenfalls Mitglieder der Redaktion dieser Zeitschrift sind [19]. Daher besteht ein schwerwiegender Interessenkonflikt, der den Verdacht verstärkt, dass das Papier nicht von Experten begutachtet wurde. Es scheint, dass die schnelle Veröffentlichung einfach deshalb möglich war, weil die Autoren auch Teil der Redaktion von Eurosurveillance waren. Diese Praxis wird als Beeinträchtigung der wissenschaftlichen Integrität eingestuft.

ZUSAMMENFASSENDE KATALOG DER IM PAPIER GEFUNDENEN FEHLER

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

1. Es gibt keinen bestimmten Grund, diese extrem hohen Primerkonzentrationen in diesem Protokoll zu verwenden. Die beschriebenen Konzentrationen führen zu erhöhten unspezifischen Bindungen und PCR-Produktamplifikationen, was den Test als spezifisches Diagnosewerkzeug zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet macht.
2. Sechs nicht spezifizierte wackelige Positionen führen zu einer enormen Variabilität in den realen Laborimplementierungen dieses Tests. Die verwirrende unspezifische Beschreibung im Corman-Drosten-Dokument ist nicht als Standard-Betriebsprotokoll geeignet, sodass der Test als spezifisches Diagnosewerkzeug zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet ist.
3. Der Test kann nicht zwischen dem gesamten Virus und viralen Fragmenten unterscheiden. Daher kann der Test nicht als Diagnose für intakte (infektiöse) Viren verwendet werden, sodass der Test als spezifisches Diagnosewerkzeug zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus und zur Schlussfolgerung über das Vorhandensein einer Infektion ungeeignet ist.
4. Eine Differenz von 10°C in Bezug auf die Annealingtemperatur T_m für das Primerpaar 1 (RdRp_SARSr_F und RdRp_SARSr_R) macht den Test auch als spezifisches Diagnosewerkzeug zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet.
5. Ein schwerwiegender Fehler ist das Weglassen eines Ct-Werts, bei dem eine Probe als positiv und negativ betrachtet wird. Dieser Ct-Wert wird auch nicht in Folgeeinreichungen gefunden, sodass der Test als spezifisches Diagnosewerkzeug zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet ist.
6. Die PCR-Produkte wurden auf molekularer Ebene nicht validiert. Diese Tatsache macht das Protokoll als spezifisches Diagnosewerkzeug zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus unbrauchbar.
7. Der PCR-Test enthält weder eine eindeutige Positivkontrolle zur Bewertung seiner Spezifität für SARS-CoV-2 noch eine Negativkontrolle zum Ausschluss des Vorhandenseins anderer Coronaviren, so dass der Test als spezifisches Diagnosewerkzeug zur Identifizierung von SARS-CoV-2 ungeeignet ist.
8. Das Testdesign im Corman-Drosten-Papier ist so vage und fehlerhaft, dass man in Dutzende verschiedener Richtungen gehen kann. Nichts ist standardisiert und es gibt keine SOP. Dies stellt die wissenschaftliche Validität des Tests in Frage und macht ihn als spezifisches Diagnosewerkzeug zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet.
9. Höchstwahrscheinlich wurde das Corman-Drosten-Papier nicht von Experten begutachtet, so dass der Test als spezifisches Diagnosewerkzeug zur Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus ungeeignet war.
10. Wir stellen schwerwiegende Interessenkonflikte für mindestens vier Autoren fest, zusätzlich zu der Tatsache, dass zwei der Autoren des Corman-Drosten-Papiers (Christian Drosten und Chantal Reusken) Mitglieder der Redaktion von Eurosurveillance sind. Am 29. Juli 2020 wurde ein Interessenkonflikt hinzugefügt (Olfert Landt ist CEO von TIB-Molbiol; Marco Kaiser ist Senior Researcher bei GenExpress und fungiert als wissenschaftlicher Berater für TIB-Molbiol), der in der Originalversion nicht deklariert wurde (und immer noch ist) fehlt in der PubMed-Version); TIB-

Molbiol ist das Unternehmen, das als „erstes“ PCR-Kits (Light Mix) auf der Grundlage des im Corman-Drosten-Manuskript veröffentlichten Protokolls herstellte und diese PCR-Test-Kits nach eigenen Angaben vor der Veröffentlichung verteilte sogar einreichte [20]; Victor Corman & Christian Drosten haben ihre zweite Zugehörigkeit nicht erwähnt: das kommerzielle Testlabor „Labor Berlin“. Beide sind dort für die Virendiagnostik verantwortlich [21] und das Unternehmen ist im Bereich der Echtzeit-PCR-Tests tätig.

FAZIT

In Anbetracht unserer erneuten Prüfung des im Corman-Drosten-Papier beschriebenen Testprotokolls zur Identifizierung von SARS-CoV-2 haben wir Fehler und inhärente Irrtümer festgestellt, die den SARS-CoV-2-PCR-Test unbrauchbar machen. Die Entscheidung, welche Testprotokolle veröffentlicht und allgemein verfügbar gemacht werden, liegt direkt in den Händen der Eurosurveillance. Die Entscheidung, die im Corman-Drosten-Papier offensichtlichen Fehler zu erkennen, hat den Vorteil, dass die menschlichen Kosten und das künftige Leid erheblich minimiert werden. Ist es nicht im besten Interesse der Eurosurveillance, dieses Papier zurückzuziehen? Unsere Schlussfolgerung ist klar. Angesichts all der hier beschriebenen enormen Designfehler und -fehler im PCR-Protokoll kommen wir zu dem Schluss: Im Rahmen der wissenschaftlichen Integrität und Verantwortung bleibt keine große Auswahl.

Verweise

- [1] Corman Victor M., Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L., van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Nachweis des neuartigen Coronavirus 2019 (2019-nCoV) durch Echtzeit-RT-PCR. Euro Surveill. 2020; 25 (3): pii = 2000045.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- [2] E-Mail-Kommunikation zwischen Dr. Peter Borger und Dr. Adam Meijer: Ergänzendes Material
- [3] Jafaar et al., Korrelation zwischen 3790 quantitativen Polymerasekettenreaktions-positiven Proben und positiven Zellkulturen, einschließlich Isolaten des Coronavirus 2 mit schwerem akutem respiratorischem Syndrom von 1941 <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa1491/5912603>
- [4] BBC, 21. Januar 2020: <https://www.bbc.com/news/world-asia-china-51185836>; Archiv: <https://archive.is/0qRmZ>
- [5] Google Analytics - COVID19-Todesfälle weltweit: <https://bit.ly/3fndemJ>; Archiv: <https://archive.is/PpqEE>
- [6] Labortests für das COVID-19 Emergency Response Technical Center, NIVD, gemäß China CDC, 15. März 2020:
<http://www.chinacdc.cn/en/COVID19/202003/P020200323390321297894.pdf>
- [7] Echtzeit-PCR-Handbuch Life Technologies
(<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>) Nolan T, Huggett J, Sanchez E. Guter Übungsleitfaden für die Anwendung quantitativer PCR (qPCR) Erstausgabe 2013
- [8] Trestan Pillonel et al., Schreiben an den Herausgeber: SARS-CoV-2-Nachweis durch Echtzeit-RT-PCR: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7268274/>
- [9] Kurkela, Satu und David WG Brown. "Molekulardiagnostische Techniken." Medicine 38.10 (2009): 535 & ndash; 540.
- [10] Wolfel et al., Virologische Beurteilung von Krankenhauspatienten mit COVID-2019
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x>
- [11] Thermofischer Primer Dimer Web Tool:
<https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>

- [12] Primer-BLAST, NCBI - Nationales Zentrum für Biotechnologie-Informationen:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- [13] Marra MA, Steven MJ, Caroline RA, Robert AH, Angela BW et al. (2003) Science. Die Genomsequenz des SARS-assoziierten Coronavirus. Science 300 (5624): 1399 & ndash; 1404.
- [14] Schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus 2-Isolat Wuhan-Hu-1, vollständiges Genom: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947>
- [15] Borger P. Ein SARS-ähnliches Coronavirus wurde erwartet, aber es wurde nichts unternommen, um vorbereitet zu werden. Am J Biomed Sci Res 2020.
<https://biomedgrid.com/pdf/AJBSR.MS.ID.001312.pdf>
https://www.researchgate.net/publication/341120750_A_SARS-like_Coronavirus_was_Expected_but_nothing_was_done_to_be_Prepared; Archiv: <https://archive.is/i76Hu>
- [16] Bewertungs- / Überprüfungsprozess für das Eurosurveillance-Papier:
<https://www.eurosurveillance.org/evaluation>
- [17] Offizielle Empfehlung des Corman-Drosten-Protokolls und Manuskripts durch die WHO. veröffentlicht am 13. Januar 2020 als Version 1.0 des Dokuments:
<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf>; Archiv: <https://bit.ly/3m3jXVH>
- [18] Offizielle WHO-Empfehlung für das Corman / Drosten RT-qPCR-Protokoll, die sich direkt aus der am 17. Januar 2020 veröffentlichten Eurosurveillance-Veröffentlichung, Dokumentversion 2-1, ableitet: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2
- [19] Redaktion Eurosurveillance, 2020: <https://www.eurosurveillance.org/upload/site-assets/imgs/2020-09-Editorial%20Board%20PDF.pdf>; Archiv: <https://bit.ly/2TqXBjX>
- [20] Gebrauchsanweisung LightMix SarbecoV E-Gen plus EAV Control, TIB-Molbiol & Roche Molecular Solutions, 11. Januar 2020: [https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_40-0776_96_Sarbeco-E-gene_V200204_09164154001\(1\).pdf](https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_40-0776_96_Sarbeco-E-gene_V200204_09164154001(1).pdf) Archiv, Zeitstempel - 11. Januar 2020: <https://archive.is/Vulo5> ; Archiv: <https://bit.ly/3fm9bXH>
- [21] Christian Drosten & Victor Corman, verantwortlich für die Virendiagnostik bei Labor Berlin: <https://www.laborberlin.com/fachbereiche/virologie/>; Archiv: archive.is/CDEUG
- [22] Tom Jefferson, Elizabeth Spencer, Jon Brassey und Carl Heneghan Virale Kulturen zur Bewertung der COVID-19-Infektiosität. Systematische Überprüfung. Systematische Überprüfung 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., Die Architektur des SARS-CoV-2-Transkriptoms:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420304062>
- [24] Antwort des ECDC an Dr. Peter Borger, 18. November 2020: Ergänzendes Material
- [25] Prof. Dr. Ulrike Kämmerer & Team, Umfrage & Primer-BLAST-Tabelle: Ergänzungsmaterial
Zusätzliche Literatur: Beschreibung RT-PCR RKI Deutschland, auf Seite 10 dieses Links:
https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsJ/JoHM_S5_2020_Studienprotokoll_CORONA_MONITORING_lokal.pdf?blob=publicationFile

Autorenzugehörigkeiten:

- 1) Dr. Pieter Borger (MSc, PhD), Molekulargenetik, W + W-wissenschaftlicher Mitarbeiter, Lörrach, Deutschland,
- 2) Rajesh Kumar Malhotra (Künstler-Alias: Bobby Rajesh Malhotra), ehemaliger 3D-Künstler / Wissenschaftliche Visualisierungen am CeMM - Zentrum für Molekulare Medizin der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (2019-2020), Universität für Angewandte Kunst - Institut für Digitale Kunst Wien, Österreich
- 3) Dr. Michael Yeadon BSs (Hons) Biochem Tox U Surrey, PhD Pharmakologie U Surrey. Geschäftsführer, Yeadon Consulting Ltd, ehemaliger Pfizer Chief Scientist, Großbritannien,
- 4) Dr. Clare Craig MA, (Cantab) BM, BCh (Oxon), FRCPath, Vereinigtes Königreich
- 5) Kevin McKernan, BS Emory University, Chief Scientific Officer, Gründer von Medical Genomics, hat die Sequenzierungspipeline am WIBR / MIT für das Humangenomprojekt entwickelt, den SOLiD-Sequenzierer erfunden und entwickelt und Patente für PCR, DNA-Isolierung und Sequenzierung in den USA erteilt
- 6) Prof. Dr. Klaus Steger, Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Molekulare Andrologie, Biomedizinisches Forschungszentrum der Justus-Liebig-Universität, Gießen
- 7) Dr. Paul McSheehy (BSc, PhD), Biochemiker und Industriepharmakologe, Loerrach, Deutschland
- 8) Dr. Lidiya Angelova, MSc in Biologie, PhD in Mikrobiologie, ehemaliger Forscher am Nationalen Institut für Allergie und Infektionskrankheiten (NIAID), Maryland, USA
- 9) Dr. Fabio Franchi, ehemaliger Dirigente Medico (M.D.) in einer Abteilung für Infektionskrankheiten, spezialisiert auf „Infektionskrankheiten“ und „Hygiene und Präventivmedizin“, Società Scientifica per il Principio di Precauzione (SSPP), Italien
- 10) Dr. med. Thomas Binder, Internist und Kardiologe (FMH), Schweiz
- 11) Prof. Dr. med. Henrik Ullrich, Facharzt für diagnostische Radiologie, Chefarzt am Zentrum für Radiologie des Collm Oschatz-Krankenhauses
- 12) Prof. Dr. Makoto Ohashi, emeritierter Professor, PhD in Mikrobiologie und Immunologie, Tokushima University, Japan
- 13) Dr. Stefano Scoglio, B.Sc. Ph.D., Mikrobiologe, Ernährungsberater, Italien
- 14) Dr. Marjolein Doesburg-van Kleffens (MSc, PhD), Facharzt für Labormedizin (klinische Chemie), Maasziekenhuis Pantein, Beugen, Niederlande
- 15) Dr. Dorothea Gilbert (MSc, PhD), PhD Umweltchemie und Toxikologie. DGI Consulting Services, Oslo, Norwegen
- 16) Dr. Rainer J. Klement, PhD. Klinik für Radioonkologie, Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt
- 17) Dr. Ruth Schrufer, PhD, Humangenetik / Immunologie, München, Deutschland,
- 18) Dra. Berber W. Pieksma, Allgemeinarzt, Niederlande
- 19) Dr. med. Jan Bonte (GJ), beratender Neurologe, Niederlande
- 20) Dr. Bruno H. Dalle Carbonare (Molekularbiologe), IP-Spezialist, BDC Basel, Schweiz
- 21) Dr. Kevin P. Corbett, MSc Krankenpflege (Kings College London) PhD (London South Bank) Sozialwissenschaften (Wissenschafts- und Technologiestudien) London, England, UK
- 22) Prof. Dr. Ulrike Kämmerer, Fachärztin für Virologie / Immunologie / Humanbiologie / Zellbiologie, Universitätsklinikum Würzburg