

Bewertung der Eignung der RT-qPCR Technik zum Nachweis einer möglichen Infektiosität von Personen für SARS-CoV-2

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 Gennachweis mittels PCR ist so sensitiv, wie wenn ein Alkoholmeßgerät noch 0,0000000008-Promille Alkohol im Blut nachweisen könnte und als „alkoholisiert“ ausgeben 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 um dann in der PCR so vervielfältigt zu werden, dass in jeder Kopierrunde 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 Einklage 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 „asymptomatischer Patient“ 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.

Gliederung:

1. Definition wichtiger Begriffe

- 1.1. Polymerase chain reaction (PCR) *Seite 4*
- 1.2. Quantitative PCR (qPCR) *Seite 5*
- 1.3. Reverse Transcriptase (RT) Reaktion *Seite 6*
- 1.4. Sensitivität und Spezifität *Seite 6*
- 1.5. Infektion *Seite 6*
- 1.6. Patient *Seite 7*

2. Grundlegende Informationen über die Eignung der PCR (und RT-qPCR) als Diagnoseinstrument je nach "Infektiosität/Ansteckungsgefahr"

2.1. Offizielle Stellungnahmen wichtiger offizieller Institutionen / Experten über die Unbrauchbarkeit der PCR als alleiniger diagnostischer Test zum Nachweis einer Infektiosität bzw. Ansteckungsgefahr *Seite 8*

- A) Schweizer Amt für Bevölkerungsschutz (Labor Spiez) *Seite 8*
- B) Dr. Antony Fauci (Chief Medical Advisor to the US President, Head of the US National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) *Seite 8*
- C) Prof. Marion Koopmanns (Leitung Institut für Virologie, Erasmus University und beratende Expertin der WHO) *Seite 9*
- D) Schwedisches Gesundheitsministerium *Seite 10*
- E) National Centre for Infectious Disease in Singapore *Seite 11*
- F) Nature-Publikationen Wölfel R et al zu den ersten Fällen in Deutschland *Seite 11*

2.2. Die Probenvorbereitung schließt den Nachweis replikationsfähiger Viren aus *Seite 11*

3. Faktoren, die die Zuverlässigkeit des PCR-Tests beeinflussen

3.1. Design der PCR und Spezifität *Seite 13*

3.2. Anzahl der unabhängigen Zielgene ("Targets") *Seite 14*

3.3. Anzahl der durchgeführten Zyklen (CT-Wert) *Seite 16*

3.3. Situation der typischen Testbearbeitung am Beispiel von Malta *Seite 19*

3.4. Notwendige Testkontrollen *Seite 22*

3.4.1 Proben zur Quantifizierung der Menge der viralen Gene („Viruslast“) *Seite 21*

3.4.2. Erste Ringversuche *Seite 22*

3.5. Ausschluss von Kontaminationen der eingesetzten Reagentien und Probleme im Handlungsablauf im Labor. *Seite 27*

3.6. Kommerzielle PCR Testkits *Seite 29*

4. Das Verhältnis zwischen einem positiven Nukleinsäurenachweis mittels RT-qPCR und Krankheit bzw. Infektiosität *Seite 29*

5. Schlussfolgerung *Seite 33*

6. Anhänge

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

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 spezifisch, 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), 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“, welche 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. naheverwandte 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, naheverwandte 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 permanente externe 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 mittels PCR vorhandene Rest-DNA so zu vervielfältigen, dass die genetische Herkunft des/der Täter(s) erkennbar ist („Genetischer Fingerabdruck“).

2.1. Offizielle Stellungnahmen wichtiger offizieller Institutionen / Experten über die Unbrauchbarkeit der PCR als alleiniger diagnostischer Test zum Nachweis einer Infektiosität bzw. Ansteckungsgefahr

A) Explizit wird auf dem Infoblatt des Schweizer Bundesamt für Bevölkerungsschutz BABS Labor Spiez wie folgt der Nachteil der PCR 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.

B) 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"*

C) 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 auf 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-misschien-helpt-een-aspirientje](https://www.youtube.com/watch?v=flsF7trvq2c)) dass die PCR nicht geeignet ist über den Stratus Infektiosität zu entscheiden. (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“

D) 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.

E) 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“

F) 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.

2.2. 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 betrifft, 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 Sacchi 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 Extraktionslösung 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.

Zwischenfazit:

Selbst wenn also bei der Durchführung der PCR inclusive 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 hinsichtlich eines im Gewebe replizierenden Virus wäre der publizierte Nachweis der subgenomischen RNA, dies wird aber in der Routinediagnostik nicht durchgeführt und wurde auch von den Autoren der Studie, zu denen wichtige Regierungsberater wie C. Drosten gehören, nicht ausserhalb der Fachpublikation kommuniziert.

Generell müssen für die Feststellung einer aktiven Infektion und der Beurteilung, ob eine Person ansteckende Viren „produziert“ und abgibt weitere, und zwar konkrete diagnostische Methoden wie die Isolation von vernehmungsfähigen Viren eingesetzt werden (Goldstandard) sowie eine klinische Symptombeurteilung erfolgen.

3. Einflussfaktoren auf die Zuverlässigkeit des PCR Test

Tatsächlich aber hängen die Ergebnisse eines PCR-Tests von einer Reihe von Parametern ab, die zum einen erhebliche 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 eine 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 Charite 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 das Erkennen eines speziellen Modells innerhalb der Gruppe der roten Autos einer Marke im Beispiel. 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 hochspezifisch nur die gewünschten Zielsequenz 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 **muss 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 diese ist 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 2 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 als 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 3000 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 gegenüber 155 gegenüber 2690 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 zu enormen persönlichen 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

Neben der Anzahl der nachgewiesenen Zielgene, 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 Viren, 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 entsprechend 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 Virus last.

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 von 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, einhergeht. 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 Erb molekül 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 dem Treiben der Pandemie) ist die Begründung für die eingreifenden Maßnahmen wie Quarantäne/Isolationsanordnungen, die „Lockdowns“ und die sogenannten AHA-Regeln.

Weitere Belege für die Relevanz des CT-Wertes

A) 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. 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 .

B) 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 unter eine CT von 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“

C) 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!!!**

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)

D) 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>)

E) 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>)

F) 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.

G) 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.“

H) 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.*“

I) 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.

J) 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.

K) 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>).

L) 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.

M) 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.**

N) In der 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 1 Gen mit einem CT von 34 oder höher aufwiesen, wohingegen die „sehr wahrscheinlichen“ Fälle 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 hinweisen.

O) Im Vergleich kommerzieller PCR-Testkits (http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag_tab.), siehe auch nächster Punkt, 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.

Zwischenbewertung:

Vor diesem Hintergrund der o. aufgeführten Punkte A-O ist es befremdlich, wenn die RT-qPCR nach wie vor vom RKI als „Gold-Standard“ angesehen wird, ohne die exakten Validierungen und externen Zertifizierungsbedingungen 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, vernehmungsfähigen (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 vernehmungsfähigen 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 die nur ein Genabschnitt in der PCR getestet wird, gilt aber generell für jedes einzelne Target.

3.4. 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 November 2020 über Instant e.V. zur Verfügung. Aus dem Begleitheft zum Versand der definierten (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 Testsysteme 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. Wohlgedenkt im Herbst. Die Technik und die Labortestung ist hier nicht der Haken, sondern es ist wieder mal die Umsetzung und die Regulation.“*

3.4.1. Bereitstellung adäquater Kontrollen:

Ferner muss in jeder korrekten Testserie eine Reihe von externen (d.h. parallel wie Patientenproben mitgeführten) Negativkontrollen sowie eine Positivkontrolle, 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 die 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 über einem Jahr der „Pandemie“ nach wie vor nicht angeboten wird, besteht die Positivkontrolle meist aber aus einer synthetischen RNA, welche nur 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, bedeutet: keinerlei diagnostischen/prognostischen Wert hat. Eine Übersicht über die aktuell eingesetzten kommerziellen Kits mit ihren Leitungsdaten findet sich unter http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag_tab.

3.4.2. 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

Nachweise von SARS-CoV-2 hinweisen: So heißt es auf Seite 4 der Publikation: „*Wichtige Mitteilung zur Auswertung: Nur 4 der 7 Proben, die im 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 INSTAND 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 INSTAND 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 INSTAND 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 bewertete 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%20200911a.pdf>) sind nach wie vor nicht öffentlich detailliert einsehbar.

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

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.anclinlabsci.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%20200502j.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....**“

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/kriminalitaet/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: „*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>)

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 kontaminierten Proben die Ergebnisqualität der RT-qPCR wesentlich beeinflussen und zu falsch positiven Ergebnissen führen.

3.6. 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 dem 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.

Genau Zahlen sind nicht eruierbar, 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/Im_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 vermehrendem 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

*„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 „Virusrümpfer“ 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>). Auch das CDC weist unter „Disadvantages“ der NAATs (nucleic acid amplification tests = PCR) darauf hin, dass **„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>)*

*„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.**“* 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). Und in seinem Gutachten vom April 21 für einen 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 sei aus einem intakten, vernehmungsfähigem Virus stammen, bereits in er PCR positive Ergebnisse liefern, damit auch in nicht infektiösen Proben einen vermeintlichen Virusnachweis erbringen.

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.*“

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*“

Auch in einer Publikation in Lancet ([https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)00425-6/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“

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“.

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,....“

5. Fazit: Aussagekraft der 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 RT-qPCR kein geeignetes zuverlässiges (und zugelassenes) Diagnostikumittel zum Nachweis von infektiösen (replikationsfähigen) SARS-CoV-2 Viren.
2. Ferner ist das reine RT-qPCR Testergebnis nur ein Laborwert, der angesichts der dargelegten Aspekte keine valide Aussage über das Vorhandensein infektiöser Viren erlaubt und nur in Zusammenschau mit einer klinischen Symptomdiagnose (erhoben durch Gesundheitsdienstleister, in Deutschland Mediziner) überhaupt eingesetzt werden darf.

Zusammenfassung: Zur Testung asymptomatischer 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 RT-qPCR nicht tauglich, eine Infektion und vor allem eine Infektiosität mit SARS-CoV-2 zu erkennen.

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, erdulnd‘, 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.

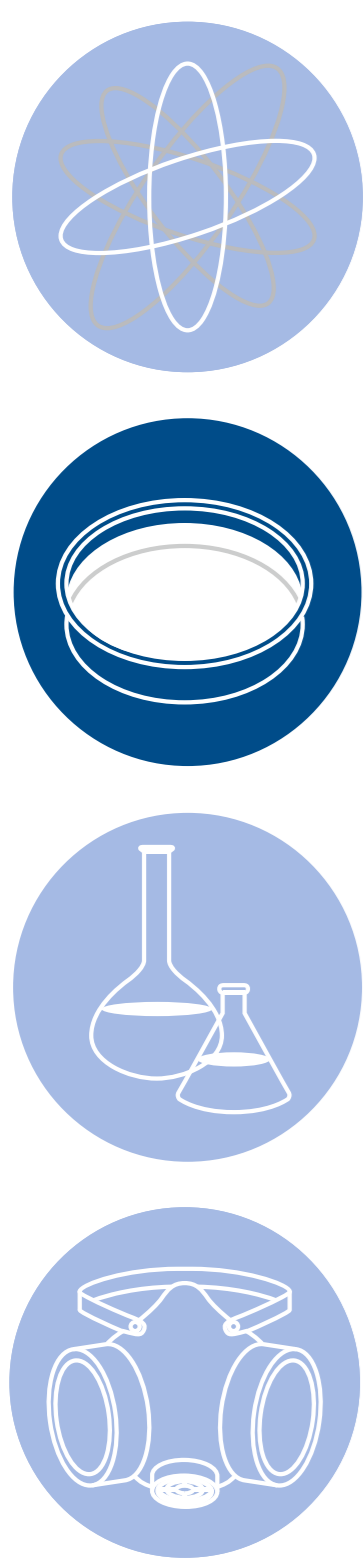
Im Original:

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."

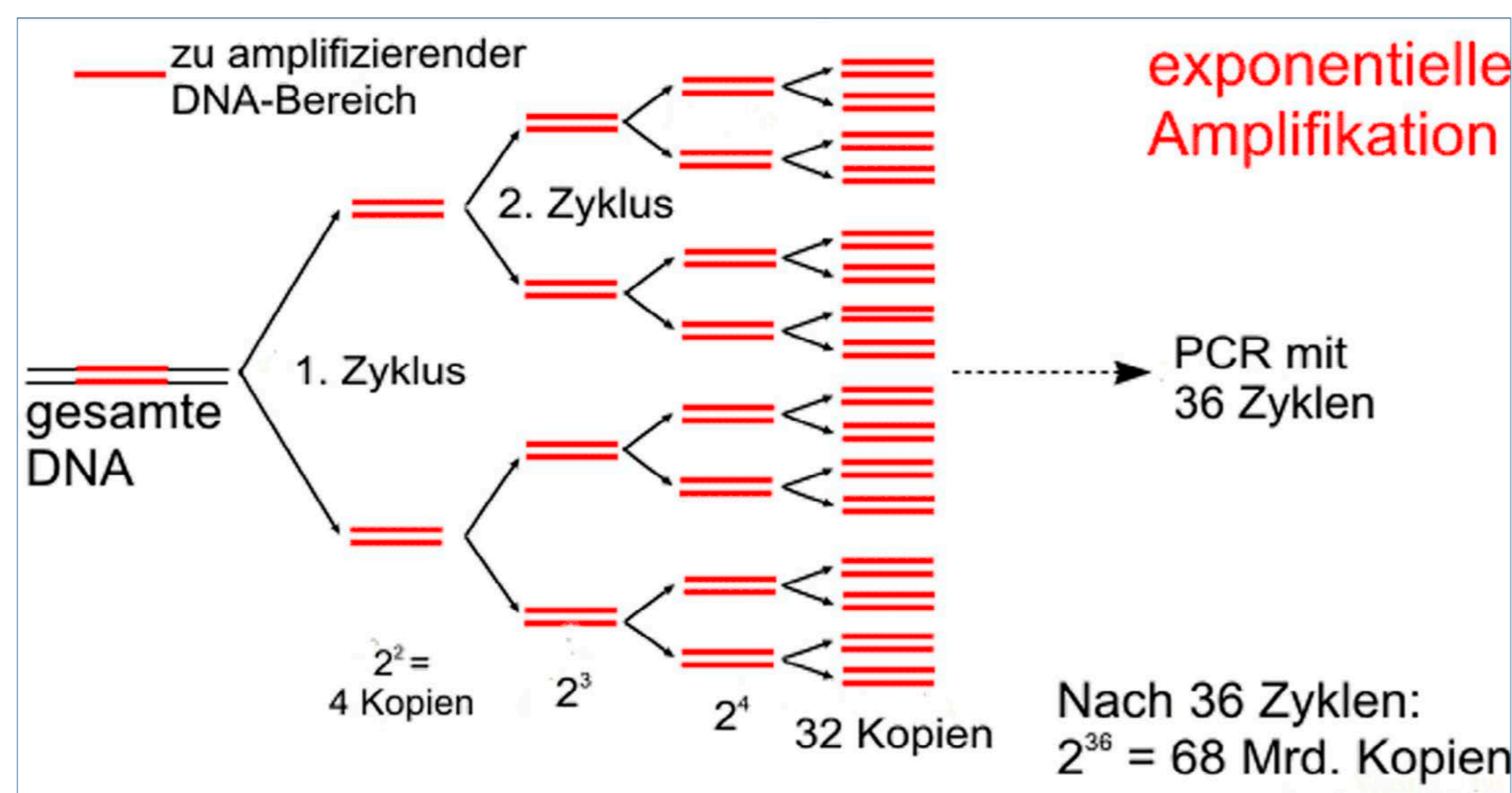
It is diversely defined as, for examples:

- 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

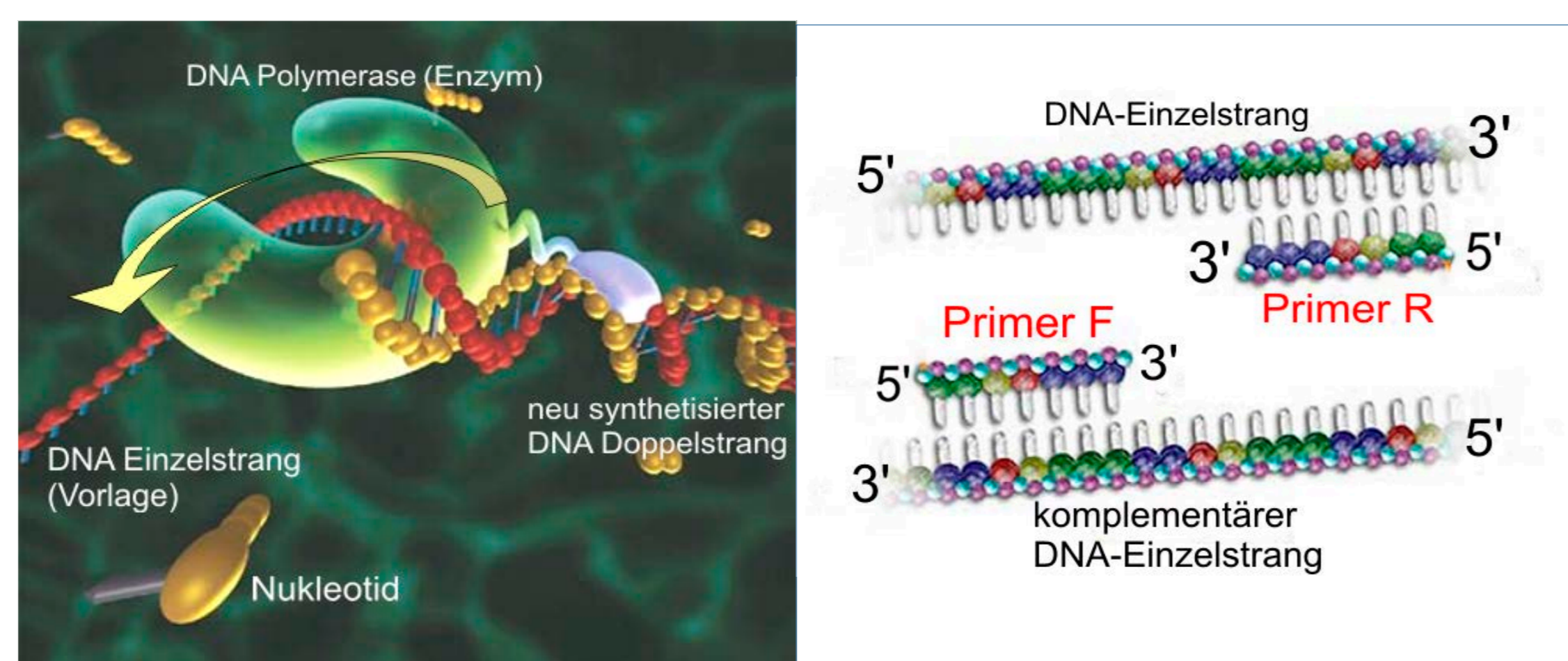


Polymerase-Kettenreaktion (PCR)?

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.



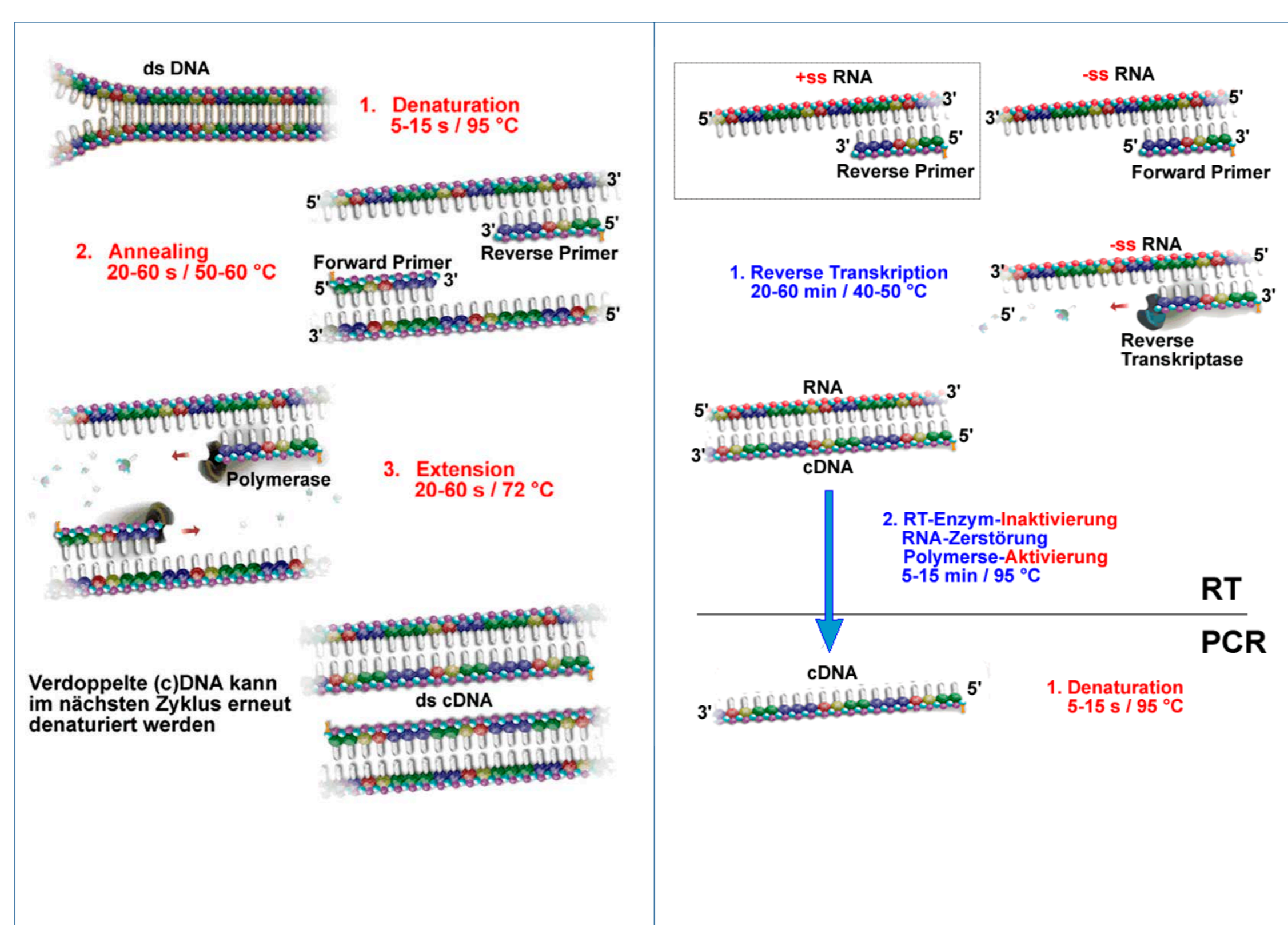
DNA-Polymerase und Oligonukleotide

Für die Vervielfältigung der DNA (**Amplifikation**) wird das Enzym **DNA-Polymerase** benötigt. Als Vorlage dient ein DNA-Einzelstrang des nachzuweisenden Erregers. Die passenden Nukleotide (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 Nukleotiden, ein so genanntes **Oligonukleotid**. Für beide komplementären DNA-Einzelstränge des Erregers wird je ein Primer (Forward (F) & Reverse (R)) mit Hilfe von Software festgelegt.

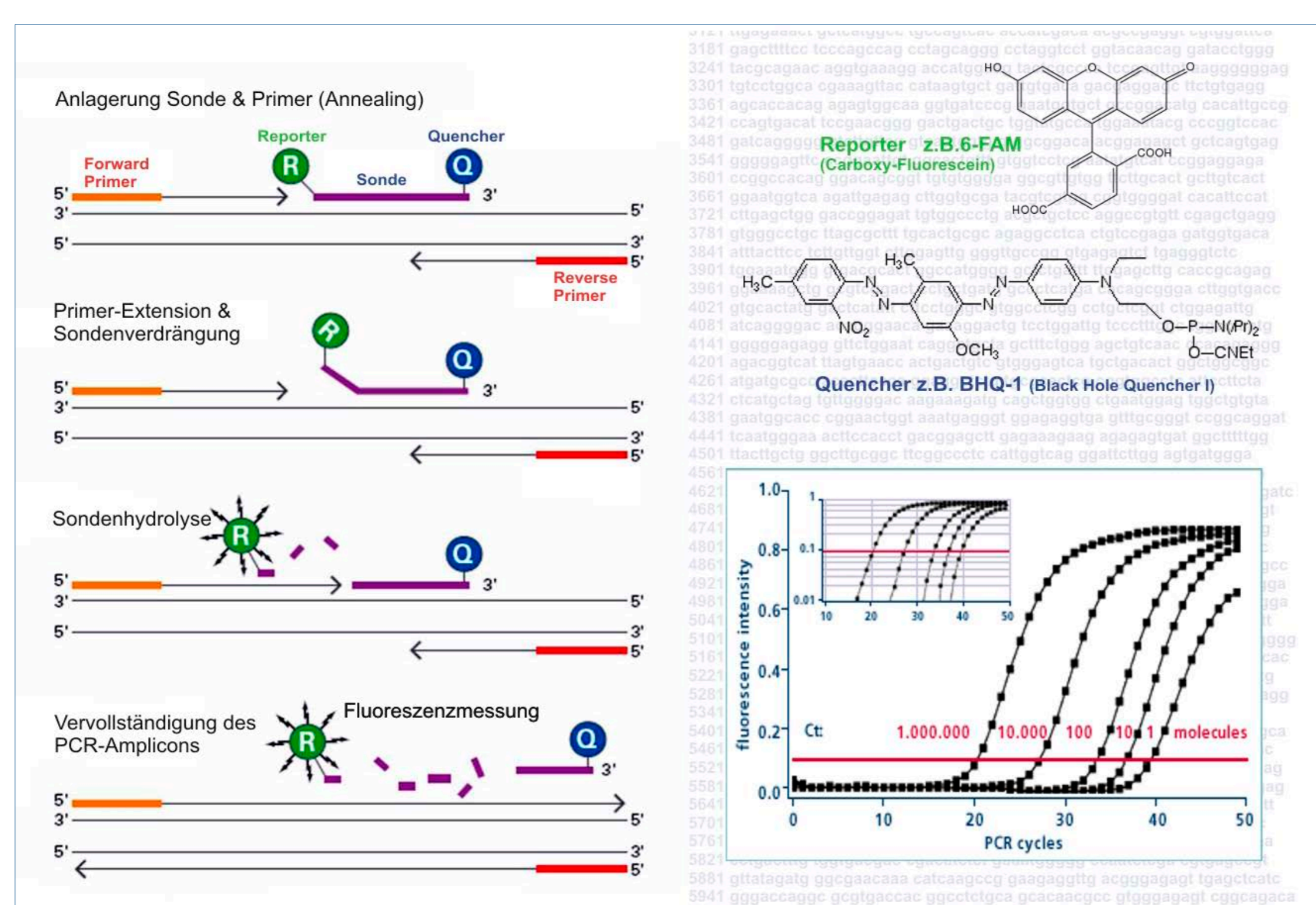
Die dazu benötigte DNA-Sequenz des nachzuweisenden Erregers wird im Internet aus öffentlichen Datenbanken kopiert. Die Oligonukleotide werden über Internet bei spezialisierten Firmen bestellt und synthetisiert.



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)

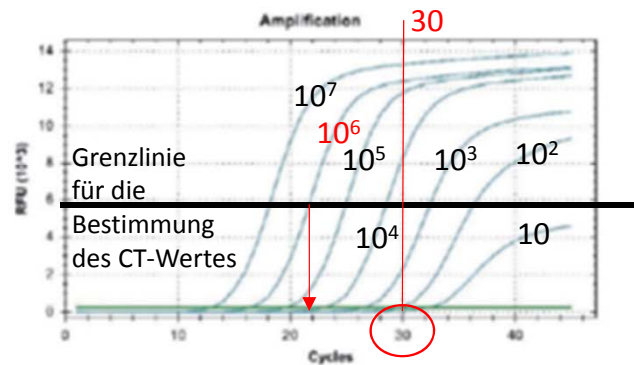


Figure 1.

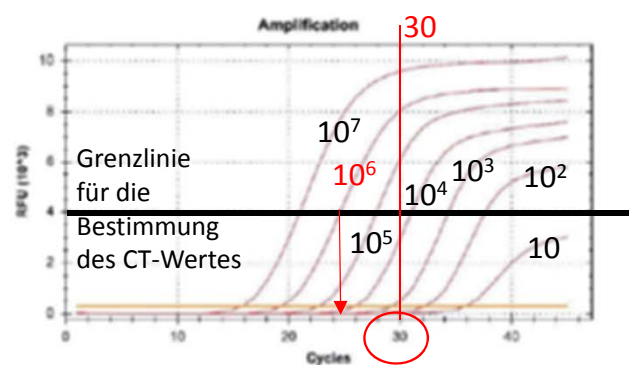


Figure 2.

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