

Bewertung der Eignung eines RT-qPCR Nachweises zur Infektiosität von Personen für SARS-CoV-2

1. Allgemeines: Der Nukleinsäurenachweis mittels RT-qPCR-Test

Reverse-Transkriptase-quantitative Polymerase Chain Reaktion (**RT-qPCR**) -Tests sind als Instrument der Diagnostik für eine aktive Infektion mit SARS-CoV-2 aus zahlreichen Gründen bereits im Ansatz für eine Massentestung zur Fragestellung einer Infektiosität ungeeignet.

1.1. Begriffserklärung/Grundlagen

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 4 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.

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 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.).

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.

Die **Sensitivität** gibt hierbei 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 werden.

1.2.1. 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. Explizit wird diese auf dem Infoblatt des Schweizer Bundesamt für Bevölkerungsschutz BABS Labor Spiez wie folgt als 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.

* 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“).

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-misshien-helpt-een-aspirientje>) **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“

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.“ Original in Schwedisch: „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.

1.2.1. Die Aufbereitung der Proben schließt den Nachweis replikationsfähiger Viren aus

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur Beurteilung der Frage, ob ein RT-qPCR Test eine Aussage über die Infektiosität einer positiv getesteten Person 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 Chomzynski und Sacci aus dem Jahr 1987 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2440339/>, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406285/>) ist nach wie vor Bestandteil nahezu aller Protokolle zur Aufreinigung biologischen Materials zur RNA Isolation, sei es laboreigen hergestellt oder in gekauften „Extraktionskits“. Komponenten der originalen 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 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 inklusive aller vorbereitenden Schritte (PCR-Design und Etablierung, Probenentnahme, Aufbereitung und PCR Durchführung) alles „richtig“ gemacht wird, und der Test positiv ist, d.h.: eine Genom-Sequenz erkennt, welche ggf. auch in einem oder sogar dem konkreten „Corona“-Virus (SARS-CoV-2) existiert, kann diese Technik unter keinen Umständen nachweisen, dass die Person, welche positiv getestet wurde, mit einem replizierenden SARS-CoV-2 infiziert und folglich für andere Personen ansteckend = gefährlich sein könnte.

Vielmehr müssen für die Feststellung einer aktiven Infektion mit SARS-CoV-2 weitere, und zwar konkret diagnostische Methoden wie die Isolation von vermehrungsfähigen Viren eingesetzt werden (Goldstandard).

1.3. 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.

1.3.1. 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 Targets nur noch 2 Targets empfohlen wurden. Am 02.03.2020 wurde in einem erneut aktualisierten Testprotokoll der WHO „**Laboratory testing for coronaviruses 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 übergingen, nur noch 1 Target zu analysieren, und sich nur noch auf das als erstes Target eingeführte 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 ergibt sich aus folgender exemplarischer Rechnung:

Die im WHO-Protokoll ursprünglich für den Nachweis von SARS-CoV-2 angegebenen drei Targets E, RdRp und N-Gen wurden zügig in vielen laboreigenen und kommerziellen Testsystemen eingesetzt. Ein Ringversuch vom Institut Instant e.V. ([7](https://corona-</p></div><div data-bbox=)

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 Tests	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-Gen Test: $100.000 \times 0,0269 =$ **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, sukzessive die Anzahl der zu testenden Zielgene 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.

Bewertung: Das Rechenbeispiel zeigt auch, wie durch „Spielen an den Vorgaben“ bezüglich der nachzuweisenden Targets für die Labore die täglichen Fallzahlen manipuliert 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 300 aufzublähen.

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

Wäre konsequent die korrekte Targetanzahl von drei bzw. sogar besser (wie z.B. in Thailand) 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.

1.3.2. Anzahl der durchgeführten Zyklen (CT-Wert)

Neben der Anzahl der nachgewiesenen Zielgene, insbesondere bei nur einem oder maximal 2 Genen stellen aber 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 Anzüchtbarkeit infektiöser Viren in Zellkultur wie unter Beteiligung von C. Drosten 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 1000-10000 eher als in einer Probe mit tatsächlich infektiöser Virus last.

Auch **kommerzielle PCR-Testsysteme**, sogenannte Kits, 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“

Es ist hier fachlich zu unterscheiden von einer „Besiedelung“* 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 hat Christian Drosten bereits 2014 in einem Interview in der Wirtschaftswoche (<https://www.wiwo.de/technologie/forschung/virologe-drosten-im-gespraech-2014-die->

who-kann-nur-empfehlungen-aussprechen/9903228-2.html) im Zusammenhang mit MERS beschrieben „Ja, aber die Methode (Anmerkung: gemeint ist die PCR) ist so empfindlich, dass sie ein einzelnes Erbmo­lekül dieses Virus nachweisen kann. Wenn ein solcher Erreger zum Beispiel bei einer Krankenschwester mal eben einen Tag lang über die Nasenschleimhaut huscht (Anmerkung: das wäre die o.g. „Besiedelung“), 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

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 .

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“

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, welche in einer Preprint-Veröffentlichung verfügbar ist („Decreased SARS-CoV-2 viral load following vaccination“ (<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.02.06.21251283v1>) und inzwischen regulär unter 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)

Auch das CDC geht entsprechend in einer neuen 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>)

Auch 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>)

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.

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.”

Eine Studie aus Singapur, in der routinemäßig das Personal des Gesundheitswesens im Zeitraum 30.Juli-21. September mittels RT-qPCR (ohne detaillierte Angaben) und Antigen-Schnelltest untersucht wurde (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8648331/>), zeigte für 20 von 156 000 geimpften Mitarbeitern [=0,013 %] ein echt-positives COVID-19-Ergebnis und 11 falsch-positive Tests ([0,007 %] von 156 000) identifiziert, die bei der

Wiederholung der Antigen- und RT-qPCR-Tests negativ waren. Im Original: „20 [0.013%] of 156 000 staff with true-positive COVID-19 results, all of whom had been vaccinated [.....] 11 false-positive tests ([0.007%] of 156 000) were also identified, and were negative on repeat ART and rtPCR testing.“ Hier zeigt sich zum einen, bei korrekter PCR finden sich nur extrem wenige Fälle (0,013%), aber dennoch kamen auf 20 echt positive RT-PCR Fälle 11 falsch positive, also 55% falsche.

Auch das RKI erklärt auf seiner Homepage 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.“*

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.

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.

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 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.

Vor diesem Hintergrund 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).

Zwischenbewertung PCR zum Nachweis der Infektiosität:

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 davon ausgegangen 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.

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>).

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

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

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

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

Werte aus Tabelle 1 von: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8166461/>

Insofern kann davon ausgegangen werden, dass alle CT-Werte höher als 30 nicht mehr zur Beurteilung, ob die Person, von der die Probe stammt “infektiös ist” herangezogen werden darf, sondern eher der britische ONS-CT von 25 verwendet werden muß. Für sich genommen, ohne Angaben über den Abgleich mit der bestimmten Anzahl der Virusgenome (Viral load) und der Korrelation mit einer Anzüchtbarkeit entsprechender Virusmengen ist

der CT Wert selbst bei niedrigem CT jedoch als Bewertungskriterium eines positiven Infektiositäts-Nachweises wertlos.

1.3.3. 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 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) und das RdRp-Gen zwischen 24,8 (Labor 4) und 33,0 (Labor 1) mit dem N-Gen bereits bei einem CT von 22,1. 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.“

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.

Ringversuche:

Zu den korrekt durchgeführten Kontrollen gehört auch die Teilnahme der Test durchführenden Labors an sogenannten „**Ringversuchen**“ (siehe auch 1.3.1.). 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.

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 hinwiesen: 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 INSTANT e.V.)

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

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

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

Abgesehen von der erschreckenden Tatsache, dass offensichtlich selbst unter hoch standardisierten Abläufen in einem Ringversuch eine erhebliche Anzahl von Proben vertauscht wurden (was die Frage nach der entsprechenden Quote an Probenvertauschungen und damit falsch zugeordneten Abstrichproben unter Massentestbedingungen aufwirft), fällt auf, dass alle gemeldeten Verwechslungen nur diese beiden Proben betrafen, nicht jedoch die ebenfalls 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%2020200911a.pdf>) sind nach wie vor nicht öffentlich detailliert einsehbar.

1.3.4. 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.annclinlabsci.org/content/34/4/389.full.pdf+html>: „A typical PCR generates as many as 10^9 copies of target sequence and if aerosolized, even the smallest aerosol will contain as many as 10^6 amplification products [6]. If uncontrolled, within a relatively short time the buildup of aerosolized amplification products will contaminate laboratory reagents, equipment, and ventilation systems [6].) Diese extreme Kontaminationsgefahr setzt voraus, dass in den diagnostischen Laboren, welche mit der PCR arbeiten, höchste Sorgfalt bei der Testung waltet - sehr fachkundiges Personal, kontaminationssichere Umgebung, permanente unabhängige Kontrolle.

Bereits im oben schon erwähnten Ringversuch 340 im April tauchte ein Problem mit falsch positiven Ergebnissen auf, welches wie folgt kommentiert wurde (Seite 20 unten): „Zusätzlich weisen in einigen Fällen die Untersuchungen mit den SARS-CoV-2-negativen Kontrollproben 340060, 340062 und 340065 auf Spezifitätsprobleme hin, die unabhängig von Vertauschungen der Proben 340064 und 340065 sind. Es ist abzuklären, ob diese **falsch positiven Ergebnisse**

*auf ein **Spezifitätsproblem der angewendeten Teste oder auf eine Verschleppung von SARS-CoV-2 bei der Testdurchführung bzw. auf Verwechslungen mit anderen Proben** in diesem Ringversuch in den betreffenden Laboren zurückzuführen sind.“* (Seite 21 unten in <https://www.instand-ev.de/System/rv-files/340%20DE%20SARS-CoV-2%20Genom%20April%202020%2020200502j.pdf>). Zur Verwechslung in diesem Ringversuch siehe Details weiter oben unter „Ringversuche“.

Wenn man vor diesem Hintergrund ferner sieht, wie z.B. nach einem BBC-Bericht in großen Testlaboren in England offen und extrem kontaminationsanfällig mit ungeschultem Personal gearbeitet wird (Film aktuell nicht mehr offen zugänglich <https://www.youtube.com/watch?v=Uk1VK1reNtE>), verwundert es nicht, wenn sich auch in Deutschland (wo es solche Beiträge bisher nicht gefilmt gibt) gelegentlich Meldungen über „falsch positive Fälle“ durch Laborkontaminationen in den Medien finden (Z.B. MVZ Augsburg - Link am Ende des Abschnitts). Selbst unter kontrollierten Laborbedingungen sind Kontaminationen durch die Arbeitsschritte der PCR bei so einer hochempfindlichen Methode nicht sicher auszuschließen. So wurde auf die Problematik von falsch positiven PCR-Ergebnissen in der SARS-CoV-2 Diagnostik aufgrund von Laborabläufen und bereits in der ersten Publikation der RT-qPCR (Corman et al., DOI: [10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045)) hingewiesen: „*In four individual test reactions, weak initial reactivity was seen but they were negative upon retesting with the same assay*“ [.....] „..... **most probably to handling issues....“**

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>

Bewertung:

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.

1.3.5. Kommerzielle PCR Testkits: Zulassung für Diagnostik?

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 den Großteil der zur Routinediagnostik eingesetzten Kits in Deutschland ausmachen.

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

Inzwischen (Stand Juli 2021) 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 (z.b. hier: https://www.genesig.com/assets/files/Path_COVID_19_CE_STED_IFU_Issue_500.pdf). In der Beschreibung diese kits 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**“

1.4. 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>). Bzw. aktueller auf der CDC - Seite (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.html>

): **„NAATs weisen ein oder mehrere virale Ribonukleinsäure (RNA)-Gene nach und weisen auf eine aktuelle Infektion oder eine kürzlich erfolgte Infektion hin, sind aber aufgrund des verlängerten Nachweises viraler RNA nicht immer ein direkter Beweis für das Vorhandensein von Viren, die sich replizieren oder auf andere übertragen werden können.**“ im Original: „NAATs detect one or more viral ribonucleic acid (RNA) genes and indicate a current infection or a recent infection but, due to prolonged viral RNA detection, are not always direct evidence for the presence of virus capable of replicating or being transmitted to others.“

„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](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 ein Gericht in Heidelberg (Anonymisiert hier einzusehen: <https://www.corodok.de/wp-content/uploads/2021/05/Gutachten-Prof.-Drosten-v.-31.3.2021-anonymisiert.pdf>) bestätigt der Fachgutachter C. Drosten, dass ein RT-PCR Test auch dann positiv werden kann, wenn **„zumindest der nachzuweisende Abschnitt aus dem Erbgut des Virus in der getesteten Probe vorliegt.“** , bedeutet: auch Erbgutfragmente können ohne dass 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,....“**

1.5. Fazit: Aussagekraft der RT-qPCR Tests zur Erkennbarkeit einer Infektiosität mit dem Coronavirus SARS-CoV-2

1. Vor dem Hintergrund der im Punkt 1.3 dargelegten Probleme ist die RT-qPCR kein geeignetes zuverlässiges (und zugelassenes) Diagnostikum 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 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.