

# RAPPORTO DI REVISIONE CORMAN- DROSTEN

CASA PRINCIPALE RAPPORTO DI REVISIONE APPENDICE  
LETTERA DI RETRAZIONE  
RISPOSTA EUROSORVEGLIANZA CONSORZIO  
FALSI POSITIVI ARTICOLI PODCAST SCOPERTA  
DOWNLOAD IMPRONTA SPECCHI

A CURA DI UN CONSORZIO  
INTERNAZIONALE DI SCIENZIATI  
IN SCIENZE DELLA VITA (ICSLS)  
[NOV 2020 - GEN 2021]

## Rapporto di revisione Corman-Drosten et al. Eurosorveglianza 2020

📅 27 novembre 2020

Questo ampio rapporto di revisione è stato ufficialmente presentato al comitato editoriale di Eurosurveillance il 27 novembre 2020 tramite il loro portale di presentazione, allegata a questo rapporto di revisione c'è una [lettera di richiesta di ritiro](#), firmata da tutti i principali e coautori. Il nome e il cognome elencati sono il primo e il secondo autore principale. Tutti i nomi in mezzo sono coautori.

### La revisione paritaria esterna del test RTPCR per rilevare SARS-CoV-2 rivela 10 principali difetti scientifici a livello molecolare e metodologico: conseguenze per risultati falsi positivi.

---

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

### ASTRATTO

---

Nella pubblicazione intitolata “Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR” (Eurosurveillance 25(8) 2020) gli autori presentano un workflow diagnostico e un protocollo RT-qPCR per il rilevamento e la diagnostica di 2019-nCoV (ora noto come SARS-CoV-2), che affermano di essere convalidato, oltre ad essere una solida metodologia diagnostica per l'uso in ambienti di laboratorio della sanità pubblica.

Alla luce di tutte le conseguenze derivanti da questa stessa pubblicazione per le società di tutto il mondo, un gruppo di ricercatori indipendenti ha eseguito una revisione punto per punto della suddetta pubblicazione in cui 1) tutti i componenti del progetto di test presentato sono stati verificati, 2) le raccomandazioni del protocollo RT-qPCR sono state valutate secondo la buona pratica di laboratorio e 3) i parametri esaminati rispetto alla letteratura scientifica pertinente che copre il campo.

Il protocollo RT-qPCR pubblicato per il rilevamento e la diagnostica di 2019-nCoV e il manoscritto soffrono di numerosi errori tecnici e scientifici, tra cui un disegno di primer insufficiente, un protocollo RT-qPCR problematico e insufficiente e l'assenza di un'accurata convalida del test. Né il test presentato né il manoscritto stesso soddisfano i requisiti per una pubblicazione scientifica accettabile. Inoltre, non vengono menzionati gravi conflitti di interesse degli autori. Infine, il brevissimo lasso di tempo tra la presentazione e l'accettazione della pubblicazione (24 ore) indica che un processo di revisione tra pari sistematico o non è stato eseguito qui o è di scarsa qualità problematica. Forniamo prove convincenti di diverse inadeguatezze scientifiche, errori e difetti.

Considerando le pecche scientifiche e metodologiche qui presentate, siamo fiduciosi che il comitato editoriale di Eurosurveillance non abbia altra scelta che ritirare la pubblicazione.

## **RAPPORTO SINTETICO DI REVISIONE**

---

Questo documento mostrerà numerosi gravi difetti nel documento Corman-Drosten, il cui significato ha portato a diagnosi errate in tutto il mondo di infezioni attribuite a SARS-CoV-2 e associate alla malattia COVID-19. Ci troviamo di fronte a rigidi blocchi che hanno distrutto la vita e i mezzi di sussistenza di molte persone, l'accesso limitato all'istruzione e queste restrizioni imposte dai governi di tutto il mondo sono un attacco diretto ai diritti fondamentali delle persone e alle loro libertà personali, con conseguenti danni collaterali per intere economie su un scala globale.

**Ci sono dieci problemi fatali con l'articolo di Corman-Drosten che illustreremo e spiegheremo in maggior dettaglio nelle sezioni seguenti.**

Il primo e principale problema è che il romanzo Coronavirus SARS-CoV-2 (nella pubblicazione denominata 2019-nCoV e nel febbraio 2020 denominata SARS-CoV-2 da un consorzio internazionale di esperti di virus) si basa su sequenze in silico (teoriche), fornito da un laboratorio in Cina [1], perché all'epoca non era disponibile per gli autori né materiale di controllo di SARS-CoV-2 infettivo ("vivo") o inattivato né RNA genomico isolato del virus. Ad oggi non è stata eseguita alcuna convalida da parte della paternità basata su virus SARS-CoV-2 isolati o sul suo RNA a lunghezza intera. Secondo Corman et al.:

***"Volevamo sviluppare e implementare una solida metodologia diagnostica da utilizzare in ambienti di laboratorio di sanità pubblica senza disporre di materiale virale disponibile". [1]***

L'attenzione qui dovrebbe essere posta sui due obiettivi dichiarati: a) *sviluppo e implementazione di un test diagnostico per l'uso in ambienti di laboratorio della sanità pubblica*. Questi obiettivi non sono raggiungibili senza disporre di materiale virale effettivo (ad esempio per determinare la carica virale infettiva). In ogni caso, solo un protocollo con la massima accuratezza può essere l'obiettivo obbligatorio e primario in qualsiasi scenario-risultato di questa portata. La determinazione della carica virale critica è un'informazione obbligatoria ed è responsabilità del gruppo di Christian Drosten eseguire questi esperimenti e fornire i dati cruciali.

Tuttavia queste sequenze in silico sono state utilizzate per sviluppare una metodologia di test RT-PCR per identificare il suddetto virus. Questo modello si basava sul presupposto che il nuovo virus fosse molto simile al SARS-CoV del 2003 poiché entrambi sono beta-coronavirus.

Il test PCR è stato quindi progettato utilizzando la sequenza genomica di SARS-CoV come materiale di controllo per il componente Sarbeco; lo sappiamo dalla nostra comunicazione e-mail personale con [2] uno dei coautori dell'articolo di Corman-Drosten. Questo metodo per modellare SARS-CoV-2 è stato descritto nel documento Corman-Drosten come segue:

*“ l'istituzione e la convalida di un flusso di lavoro diagnostico per lo screening 2019-nCoV e la conferma specifica, progettato in assenza di isolati di virus disponibili o campioni originali dei pazienti. La progettazione e la convalida sono state rese possibili dalla stretta relazione genetica con il SARS-CoV del 2003 e aiutate dall'uso della tecnologia dell'acido nucleico sintetico”.*

La reazione a catena della trascrizione inversa-polimerasi (RT-PCR) è un'importante tecnologia biomolecolare per rilevare rapidamente frammenti di RNA rari, che sono noti in anticipo. Nella prima fase, le molecole di RNA presenti nel campione vengono retrotrascritte per produrre cDNA. Il cDNA viene quindi amplificato nella reazione a catena della polimerasi utilizzando una coppia di primer specifica e un enzima DNA polimerasi termostabile. La tecnologia è altamente sensibile e il suo limite di rilevamento è teoricamente di 1 molecola di cDNA. La specificità della PCR è fortemente influenzata da errori di progettazione biomolecolare.

### **Cosa è importante quando si progetta un test RT-PCR e il test RT-qPCR quantitativo descritto nella pubblicazione Corman-Drosten?**

#### **1. I primer e le sonde:**

- a) la concentrazione di primer e sonde deve essere nell'intervallo ottimale (100-200 nM)
- b) deve essere specifica per il gene bersaglio che si desidera amplificare
- c) deve avere una percentuale ottimale di contenuto di GC rispetto alle basi azotate totali (minimo 40%, massimo 60%)
- d) per la diagnostica del virus almeno 3 coppie di primer devono rilevare 3 geni virali (preferibilmente il più distanti possibile nel genoma virale)

#### **2. La temperatura alla quale avvengono tutte le reazioni:**

- a) Temperatura di fusione del DNA (>92°)
- b) Temperatura di amplificazione del DNA (specifica per TaqPol)
- c) T<sub>m</sub>; la temperatura di ricottura (la temperatura alla quale i primer e le sonde raggiungono il legame/distacco target, non superiore a 2 C per coppia di primer). T<sub>m</sub> dipende fortemente dal contenuto di GC dei primer

### **3. Il numero di cicli di amplificazione (inferiore a 35; preferibilmente 25-30 cicli);**

In caso di rilevamento del virus, >35 cicli rilevano solo segnali che non sono correlati al virus infettivo come determinato dall'isolamento in coltura cellulare [rivisto in 2]; se qualcuno è risultato positivo alla PCR quando viene utilizzata una soglia di 35 cicli o superiore (come avviene nella maggior parte dei laboratori in Europa e negli Stati Uniti), la probabilità che detta persona sia effettivamente infetta è inferiore al 3%, la probabilità che detto risultato è un falso positivo è del 97% [recensito in 3]

**4. Convalide di biologia molecolare; i prodotti di PCR amplificati devono essere convalidati eseguendo i prodotti in un gel con un righello del DNA o mediante sequenziamento diretto del DNA**

**5. Devono essere specificati controlli positivi e negativi per confermare/confutare il rilevamento di virus specifici specifici**

**6. Dovrebbe essere disponibile una procedura operativa standard (SOP)**

SOP specifica in modo inequivocabile i parametri di cui sopra, in modo che tutti i laboratori siano in grado di impostare esattamente le stesse condizioni di prova. Avere una POS universale convalidata è essenziale, perché consente il confronto dei dati all'interno e tra i paesi.

## **MINORI PREOCCUPAZIONI CON LA CARTA CORMAN-DROSTEN**

1. Nella tabella 1 dell'articolo Corman-Drosten, sono indicate diverse abbreviazioni: "nM" è specificato, "nm" no. Inoltre, per quanto riguarda la nomenclatura corretta, nm significa "nanometro", quindi nm dovrebbe leggere nM qui.

2. È consenso generale scrivere sequenze genetiche sempre nella direzione 5'-3', inclusi i primer inversi. È molto insolito eseguire l'allineamento con la scrittura complementare inversa della sequenza di primer come hanno fatto gli autori nella figura 2 dell'articolo di Corman-Drosten. Qui, inoltre, una base oscillante è contrassegnata come "y" senza descrizione delle basi per cui Y sta per.

3. Due errori fuorvianti nell'articolo di Corman-Drosten sono che la loro Tabella 1 non include i valori T<sub>m</sub> (valori di temperatura di ricottura), né mostra i valori GC (numero di G e C nelle sequenze come basi totali).

## **PRINCIPALI PREOCCUPAZIONI CON LA CARTA CORMAN-DROSTEN**

### **UN SOTTOFONDO**

Gli autori introducono il contesto per il loro lavoro scientifico come: "L'epidemia in corso del nuovo coronavirus emerso di recente (2019-nCoV) rappresenta una sfida per i laboratori di sanità pubblica poiché gli isolati del virus non sono disponibili mentre vi sono prove crescenti che l'epidemia è più diffusa di inizialmente pensato, e la diffusione internazionale attraverso i viaggiatori già si verifica".

Secondo BBC News [4] e Google Statistics [5] ci sono stati 6 decessi in tutto il mondo il 21 gennaio 2020, il giorno in cui è stato presentato il manoscritto. Perché gli autori hanno assunto

una sfida per i laboratori di sanità pubblica mentre non c'erano prove sostanziali a quel tempo per indicare che l'epidemia era più diffusa di quanto inizialmente pensato?

Come obiettivo, gli autori hanno dichiarato di sviluppare e implementare una solida metodologia diagnostica da utilizzare in ambienti di laboratorio della sanità pubblica senza disporre di materiale virale. Inoltre, riconoscono che "Il presente studio dimostra l'enorme capacità di risposta raggiunta attraverso il coordinamento di laboratori accademici e pubblici nelle reti di ricerca nazionali ed europee".

## B) MODALITÀ E RISULTATI

### 1. Progettazione di primer e sonda

#### 1a) Concentrazioni di primer errate

I protocolli di test PCR affidabili e accurati sono normalmente progettati utilizzando tra 100 nM e 200 nM per primer [7]. Nella carta di Corman-Drosten, osserviamo concentrazioni di primer insolitamente alte e variabili per diversi primer (tabella 1). Per le coppie di primer RdRp\_SARSr-F e RdRp\_SARSr-R, sono descritti rispettivamente 600 nM e 800 nM. Allo stesso modo, per il set di primer N\_Sarbeco\_F e N\_Sarbeco\_R, consigliano rispettivamente 600 nM e 800 nM [1].

Dovrebbe essere chiaro che queste concentrazioni sono troppo alte per essere ottimali per amplificazioni specifiche dei geni bersaglio. **Non esiste alcun motivo specifico per utilizzare queste concentrazioni estremamente elevate di primer in questo protocollo. Piuttosto, queste concentrazioni portano ad un aumento del legame non specifico e all'amplificazione del prodotto PCR.**

Tabella 1: Primer e sonde (adattato da carta Corman-Drosten; sono evidenziate concentrazioni di primer errate)

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence <sup>a</sup>	Concentration <sup>b</sup>
RdRP gene	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV. Use 100 nM per reaction and mix with P1
	RdRp_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs. Use 100 nM per reaction and mix with P2
	RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	Use 800 nM per reaction
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 400 nm per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 200 nm per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 400 nm per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Use 600 nm per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 200 nm per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 600 nm per reaction

<sup>a</sup> W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C. FAM: 6-carboxyfluorescein; BBQ: blackberry quencher.  
<sup>b</sup> Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µL of a 10 µM primer stock solution per 25 µL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

#### 1b) Sequenze di primer e sonde non specificate ("Wobbly")

Per ottenere risultati riproducibili e comparabili, è essenziale definire distintamente le coppie di primer. Nell'articolo di Corman-Drosten abbiamo osservato sei posizioni non specificate, indicate dalle lettere R, W, M e S (Tabella 2). La lettera W significa che in questa posizione può esserci una A o una T; R significa che può esserci una G o una A; M indica che la posizione può

essere una A o una C; la lettera S indica che può esserci una G o una C in questa posizione.

Questo numero elevato di varianti non solo è insolito, ma crea anche molta confusione per i laboratori. Queste sei posizioni non specificate potrebbero facilmente portare alla progettazione di diverse sequenze di primer alternative che non si riferiscono a SARS-CoV-2 (2 primer RdRp\_SARsr\_F distinti + 8 sonde RdRp\_SARS\_P1 distinte + 4 RdRp\_SARsr\_R distinti). **Le variazioni di progettazione porteranno inevitabilmente a risultati che non sono nemmeno correlati alla SARS CoV-2. Pertanto, la confusa descrizione non specifica nel documento di Corman-Drosten non è adatta come protocollo operativo standard. Queste posizioni non specificate avrebbero dovuto essere progettate in modo inequivocabile.**

Queste sequenze traballanti hanno già creato una fonte di preoccupazione nel campo e hanno portato a una lettera all'editore scritta da Pillonel et al. [8] riguardo a palesi errori nelle sequenze descritte. Questi errori sono evidenti nel Corman et al. anche supplemento.

**Tabella 2: Primer e sonde (adattati da carta Corman-Drosten; sono evidenziati nucleotidi non specificati ("Wobbly") nei primer)**

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence <sup>a</sup>	Concentration <sup>b</sup>
RdRP gene	RdRp_SARsr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARsr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV.
	RdRp_SARsr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Use 100 nM per reaction and mix with P1 Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs.
	RdRp_SARsr-R	CARATGTAAASACACTATTAGCATA	Use 800 nM per reaction
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 400 nm per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 200 nm per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 400 nm per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGAATC	Use 600 nm per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 200 nm per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 800 nm per reaction

W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C. FAM: 6-carboxyfluorescein; BBQ: blackberry quencher.  
<sup>b</sup> Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µL of a 10 µM primer stock solution per 25 µL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

Il protocollo dell'OMS (Figura 1), che deriva direttamente dall'articolo di Corman-Drosten, conclude che per confermare la presenza di SARS-CoV-2, devono essere identificati due geni di controllo (i geni E e RdRp). nel saggio. Va notato che il gene RdRp ha una posizione incerta ("wobbly") nel forward-primer (R=G/A), due posizioni incerte nel reverse-primer (R=G/A; S=G/C) e ha tre posizioni incerte nella sonda RdRp (W=A/T; R=G/A; M=A/C). Quindi, per il gene RdRp possono essere sintetizzati due diversi primer forward, quattro diversi primer reverse e otto sonde distinte. Insieme, ci sono 64 possibili combinazioni di primer e sonde!

L'articolo di Corman-Drosten identifica ulteriormente un terzo gene che, secondo il protocollo dell'OMS, non è stato ulteriormente convalidato e ritenuto non necessario:

*"Da notare che anche il test del gene N ha funzionato bene, ma non è stato sottoposto a un'ulteriore convalida intensiva perché era leggermente meno sensibile".*

Questa è stata una sfortunata omissione in quanto sarebbe stato meglio utilizzare tutte e tre le PCR genetiche come test di conferma e ciò avrebbe portato a un protocollo di strumento diagnostico per il rilevamento dell'RNA del virus quasi sufficiente. Tre fasi del test di conferma

minimizzerebbero almeno errori e incertezze ad ogni fase di piegatura per quanto riguarda i punti "traballanti". (Tuttavia, il protocollo sarebbe ancora al di sotto di qualsiasi "buona pratica di laboratorio", quando si tiene conto di tutti gli altri errori di progettazione).

Così com'è, il saggio del gene N purtroppo non è proposto nella raccomandazione dell'OMS (Figura 1) come terzo passaggio di conferma obbligatorio e cruciale, né è enfatizzato nel documento di Corman-Drosten come importante assicurazione facoltativa "per un flusso di lavoro di routine" (Tavolo 2).

**Di conseguenza, in quasi tutte le procedure di test in tutto il mondo, sono state utilizzate solo 2 corrispondenze di primer invece di tutte e tre. Questa svista rende inutile l'intero protocollo di test per quanto riguarda la fornitura di risultati di test accurati di reale significato in una pandemia in corso.**

Figura 1: Il test di conferma dell'N-Gene non è né enfatizzato come terzo passaggio necessario nella raccomandazione ufficiale del protocollo Drosten-Corman dell'OMS di seguito [8] né è richiesto come passaggio cruciale per una maggiore accuratezza del test nella pubblicazione di Eurosurveillance.

#### **Background**

We used known SARS- and SARS-related coronaviruses (bat viruses from our own studies as well as literature sources) to generate a non-redundant alignment (excerpts shown in Annex). We designed candidate diagnostic RT-PCR assays before release of the first sequence of 2019-nCoV. Upon sequence release, the following assays were selected based on their matching to 2019-nCoV as per inspection of the sequence alignment and initial evaluation (Figures 1 and 2).

**All assays can use SARS-CoV genomic RNA as positive control. Synthetic control RNA for 2019-nCoV E gene assay is available via EVAg. Synthetic control for 2019-nCoV RdRp is expected to be available via EVAg from Jan 21st onward.**

**First line screening assay: E gene assay  
Confirmatory assay: RdRp gene assay**

*1c) Contenuto GC errato (discusso in 2c, insieme alla temperatura di ricottura (Tm))*

*1d) Rilevazione di geni virali*

La RT-PCR non è raccomandata per la diagnostica primaria dell'infezione. Questo è il motivo per cui il test RT-PCR utilizzato nella routine clinica per il rilevamento di COVID-19 non è indicato per la diagnosi di COVID-19 su base normativa.

*“I medici devono riconoscere la maggiore accuratezza e velocità delle tecniche diagnostiche molecolari per la diagnosi delle infezioni, ma anche comprenderne i limiti. I risultati di laboratorio devono essere sempre interpretati nel contesto della presentazione clinica del paziente e per ottenere risultati affidabili dei test sono necessari sito, qualità e tempistica appropriati per la raccolta dei campioni”. [9]*

Tuttavia, può essere utilizzato per aiutare la diagnosi differenziale del medico quando deve discriminare tra diverse infezioni del polmone (influenza, Covid-19 e SARS hanno sintomi molto simili). Per una diagnosi confermativa di un virus specifico, devono essere applicate almeno 3 coppie di primer specifici per rilevare 3 geni specifici del virus. Preferibilmente, questi geni bersaglio dovrebbero essere localizzati alla massima distanza possibile nel genoma virale (incluse le estremità opposte).

Sebbene l'articolo di Corman-Drosten descriva 3 primer, questi primer coprono solo circa la metà del genoma del virus. Questo è un altro fattore che riduce la specificità per il rilevamento dell'RNA del virus COVID-19 intatto e aumenta la quotazione dei risultati dei test falsi positivi.

Pertanto, anche se otteniamo tre segnali positivi (cioè le tre coppie di primer danno 3 diversi prodotti di amplificazione) in un campione, questo non prova la presenza di un virus. **Un disegno di primer migliore avrebbe primer terminali su entrambe le estremità del genoma virale. Questo perché l'intero genoma virale sarebbe coperto e tre segnali positivi possono discriminare meglio tra un virus completo (e quindi potenzialmente infettivo) e genomi virali frammentati (senza potenza infettiva).** Per dedurre qualcosa di significativo sull'infettività del virus, il gene Orf1, che codifica per l'enzima replicasi essenziale dei virus SARS-CoV, avrebbe dovuto essere incluso come bersaglio (Figura 2). Il posizionamento dei bersagli nella regione del genoma virale che è più pesantemente e variamente trascritto è un'altra debolezza del protocollo.

Kim et al. dimostrare un'espressione 3' altamente variabile dell'RNA subgenomico in Sars-CoV-2 [23]. Questi RNA sono attivamente monitorati come firme per pazienti asintomatici e non infettivi [10]. È altamente discutibile sottoporre a screening una popolazione di persone asintomatiche con primer qPCR che hanno 6 coppie di basi primer-dimero sull'estremità 3 prime di un primer (Figura 3).

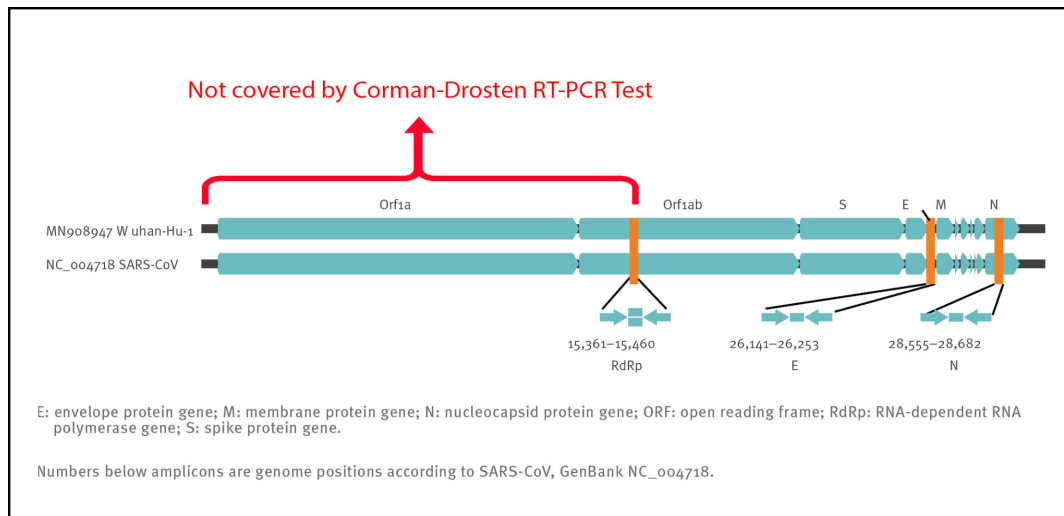
Apparentemente l'OMS raccomanda questi primer. Abbiamo testato tutti i derivati di wobble dalla carta Corman-Drosten con lo strumento web primer dimer di Thermofisher [11]. Il primer forward RdRp ha omologia 6bp 3prime con Sarbeco E Reverse. Ad alte concentrazioni di primer questo è sufficiente per creare imprecisioni.

Da notare: esiste una corrispondenza perfetta di uno dei primer N con un patogeno clinico (Pantoea), riscontrato nei pazienti immunocompromessi. Il primer inverso colpisce anche Pantoea ma non nella stessa regione (Figura 3).

**Si tratta di gravi errori di progettazione, poiché il test non è in grado di discriminare tra l'intero virus e i frammenti virali. Il test non può essere utilizzato come diagnostica per i virus SARS.**

**Figura 2: posizioni relative dei bersagli ampliconi sul coronavirus SARS e sul genoma del nuovo coronavirus 2019. ORF: cornice di lettura aperta; RdRp: RNA polimerasi RNA-dipendente. I numeri sotto l'amplicone sono le posizioni del genoma secondo SARS-CoV, NC\_004718 [1];**





**Figura 3: Un test con lo strumento web primer dimer di Thermofischer rivela che il primer forward di RdRp ha un'omologia di 6bp 3'prime con Sarbeco E Reverse (riquadro a sinistra). Un altro test rivela che esiste una corrispondenza perfetta per uno degli N-primer con un agente patogeno clinico (Pantoea) trovato in pazienti immunocompromessi (riquadro a destra).**

Cross Primer Dimers:

Corman\_RdRp\_SARs\_F1 with Corman\_E\_Sarbeco\_R  
Corman\_RdRp\_SARs\_F1  
5-gtgaaatggtcatgtgtggcgg->  
|||||  
<-acacacgcatgacgacgttata-5

Corman\_RdRp\_SARs\_F2 with Corman\_E\_Sarbeco\_R  
Corman\_RdRp\_SARs\_F2  
5-gtgagatggtcatgtgtggcgg->  
|||||  
<-acacacgcatgacgacgttata-5

>Corman\_N\_Sarbeco\_F  
**CACATTGGCACCCGCAATC**

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

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

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

Query 1 CACATTGGCACCCGCAATC 19  
Sbjct 2326019 CACATTGGCACCCGCAATC 2326037

## 2. Temperature di reazione

### 2a) Temperatura di fusione del DNA (>92°).

Adeguatamente affrontato nel documento Corman-Drosten.

### 2b) Temperatura di amplificazione del DNA.

Adeguatamente affrontato nel documento Corman-Drosten.

### 2c) Contenuti GC e Tm . errati

La temperatura di ricottura determina a quale temperatura il primer si attacca/si stacca dalla sequenza target. Per un'amplificazione efficiente e specifica, il contenuto di GC dei primer deve soddisfare un minimo del 40% e un massimo del 60% di amplificazione. **Come indicato nella tabella 3, tre dei primer descritti nella carta Corman-Drosten non rientrano nell'intervallo normale per il contenuto di GC. Due primer (RdRp\_SARs\_F e RdRp\_SARs\_R) hanno valori GC insoliti e molto bassi del 28%-31% per tutte le possibili varianti di basi oscillanti, mentre il primer E\_Sarbeco\_F ha un valore GC del 34,6% (Tabella 3 e secondo pannello della Tabella 3) .**

Va notato che il contenuto di GC determina in gran parte il legame al suo bersaglio specifico a causa dei suoi tre legami idrogeno nell'accoppiamento delle basi. Quindi, più basso è il contenuto di GC del primer, minore è la sua capacità di legame con la sua specifica sequenza del gene bersaglio (cioè il gene da rilevare). Ciò significa che per riconoscere una sequenza target dobbiamo scegliere una temperatura che sia il più vicino possibile alla temperatura di annealing reale (valore di buona pratica) affinché il primer non si stacchi nuovamente, mentre allo stesso tempo selezionando specificamente il sequenza bersaglio.

Se il valore  $T_m$  è molto basso, come osservato per tutte le varianti oscillanti dei primer inversi RdRp, i primer possono legarsi in modo non specifico a diversi bersagli, diminuendo la specificità e aumentando potenziali risultati falsi positivi.

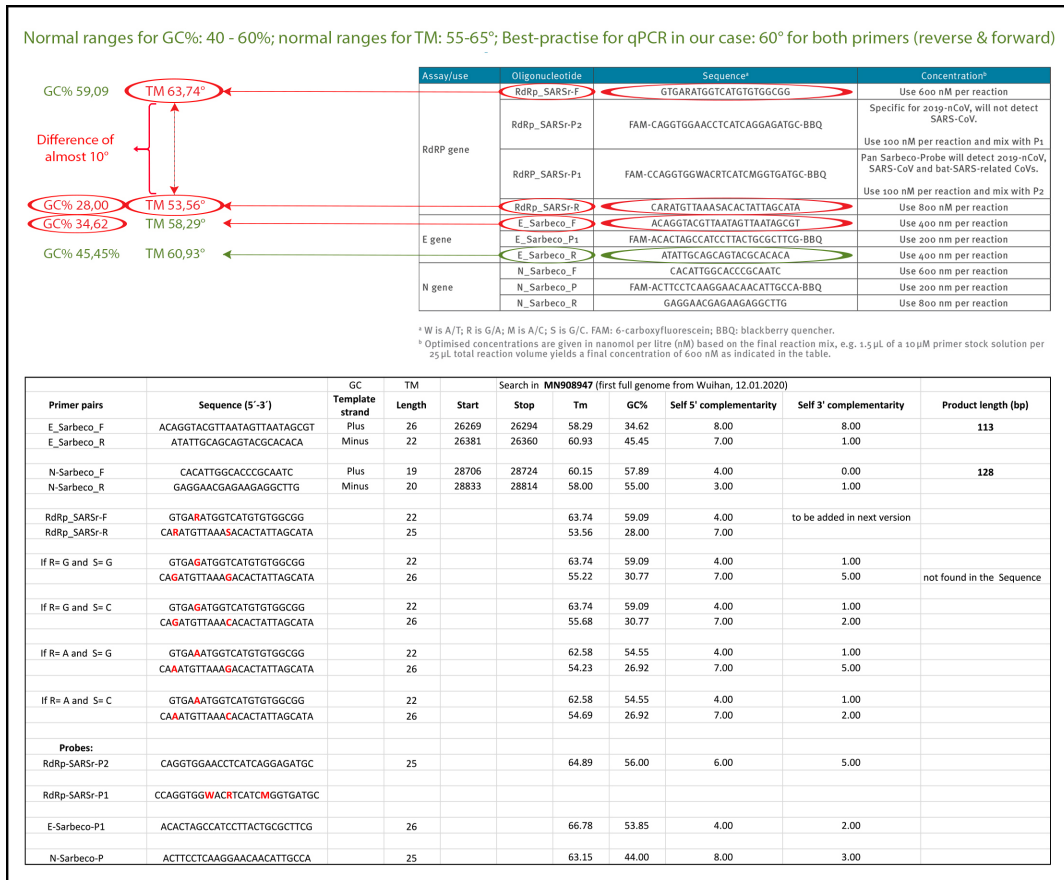
La temperatura di annealing ( $T_m$ ) è un fattore cruciale per la determinazione della specificità/accuratezza della procedura qPCR ed essenziale per valutare l'accuratezza dei protocolli qPCR. Raccomandazione di buona pratica: entrambi i primer (avanti e indietro) dovrebbero avere un valore quasi simile, preferibilmente lo stesso valore.

Abbiamo utilizzato il software di progettazione primer disponibile gratuitamente Primer-BLAST [12, 25] per valutare i valori di best practice per tutti i primer utilizzati nella carta Corman-Drosten (Tabella 3). Abbiamo tentato di trovare un valore  $T_m$  di 60° C, cercando allo stesso modo il valore GC% più alto possibile per tutti i primer. Una differenza massima di  $T_m$  di 2°C all'interno delle coppie di primer è stata considerata accettabile. Testando le coppie di primer specificate nella carta Corman-Drosten, abbiamo osservato una differenza di 10° C rispetto alla temperatura di annealing  $T_m$  per la coppia di primer1 (RdRp\_SARSr\_F e RdRp\_SARSr\_R). **Questo è un errore molto grave e rende inutile il protocollo come strumento diagnostico specifico.**

Ulteriori test hanno dimostrato che solo la coppia di primer progettata per amplificare il gene N (N\_Sarbeco\_F e N\_Sarbeco\_R) ha raggiunto lo standard adeguato per operare in un test diagnostico, poiché ha un contenuto di GC sufficiente e la differenza di  $T_m$  tra i primer (N\_Sarbeco\_F e N\_Sarbeco\_R) è 1,85° C (al di sotto del massimo cruciale di 2° C di differenza). È importante sottolineare che questo è il gene che non è stato testato nei campioni di virus (Tabella 2) né enfatizzato come test di conferma. Oltre alle temperature di fusione altamente variabili e alle sequenze degenerate in questi primer, c'è un altro fattore che influisce sulla specificità della procedura: i dNTP (0,4 uM) sono 2 volte superiori a quelli raccomandati per un'amplificazione altamente specifica. C'è anche solfato di magnesio addizionale aggiunto alla reazione. Questa procedura combinata con una bassa temperatura di ricottura può creare amplificazioni non specifiche. Quando è necessario ulteriore magnesio per qPCR, la specificità del dosaggio deve essere ulteriormente esaminata.

**Gli errori di progettazione qui descritti sono così gravi che è altamente improbabile che si verifichi un'amplificazione specifica del materiale genetico SARS-CoV-2 utilizzando il protocollo dell'articolo di Corman-Drosten.**

Tabella 3: Contenuto GC dei primer e delle sonde (adattato dalla carta Corman-Drosten; sono evidenziate le aberrazioni dai contenuti GC ottimizzati. Il secondo pannello mostra una tabella con un elenco di tutti i valori delle migliori pratiche Primer-BLAST per tutti i primer e le sonde utilizzati in l'articolo Corman-Drosten della prof.ssa Dr. Ulrike Kämmerer e del suo team



### 3. Il numero di cicli di amplificazione

Va notato che non c'è menzione da nessuna parte nell'articolo di Corman-Drosten di un test positivo o negativo, o addirittura di ciò che definisce un risultato positivo o negativo. Questi tipi di test diagnostici virologici devono essere basati su una SOP, compreso un numero fisso e convalidato di cicli di PCR (valore Ct) dopo il quale un campione è considerato positivo o negativo. Il valore Ct massimo ragionevolmente affidabile è di 30 cicli. Al di sopra di un Ct di 35 cicli, ci si deve aspettare un numero rapidamente crescente di falsi positivi.

**I dati della PCR valutati come positivi dopo un valore Ct di 35 cicli sono completamente inaffidabili.**

Citando Jaafar et al. 2020 [3]: "A Ct = 35, il valore che abbiamo usato per riportare un risultato positivo per la PCR, <3% delle colture è positivo." **In altre parole, non è stato possibile isolare con successo il virus SARS-CoV-2 a quei valori di Ct elevati.**

**Inoltre, studi scientifici mostrano che solo i virus non infettivi (morti) vengono rilevati con valori Ct di 35 [22].**

Tra 30 e 35 c'è una zona grigia, dove non è possibile stabilire con certezza un test positivo. Questa zona dovrebbe essere esclusa. Naturalmente, si potrebbero eseguire 45 cicli di PCR, come raccomandato nel protocollo WHO Corman-Drosten (Figura 4), ma poi bisogna anche definire un valore Ct ragionevole (che non dovrebbe superare i 30). Ma un risultato analitico con un valore Ct di 45 è scientificamente e diagnosticamente assolutamente privo di significato (un valore Ct ragionevole non dovrebbe superare 30). Tutto questo dovrebbe essere comunicato molto chiaramente. È un errore significativo che la carta Corman-Drosten non menzioni il valore Ct massimo al quale un campione può essere considerato inequivocabilmente come un risultato del test positivo o negativo. Anche questo importante limite di soglia del ciclo non è stato specificato in nessuna presentazione di follow-up fino ad oggi.

**Figura 4: Raccomandazione del kit RT-PCR nel protocollo ufficiale dell'OMS Corman-Drosten [8]. Si deve trovare solo un valore "Ciclotore" (cicli) senza Ct (valore limite) corrispondente e scientificamente ragionevole. Questo o qualsiasi altro valore dei cicli non si trova da nessuna parte nell'attuale documento di Corman-Drosten.**

3. Discriminatory assay		
<b>RedRo assay:</b>		
<b>MasterMix:</b>	<b>Per reaction</b>	
H <sub>2</sub> O (RNAse free)	1.1 µl	
2x Reaction mix*	12.5 µl	
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	0.4 µl	
BSA (1 mg/ml)**	1 µl	
Primer RdRP_SARS-F2 (10 µM stock solution)	1.5 µl	GTGARATGGTCATGTGGCGG
Primer RdRP_SARS-R1 (10 µM stock solution)	2 µl	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
Probe RdRP_SARS-P2 (10 µM stock solution)	0.5 µl	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ
SSIII/Taq EnzymeMix*	1 µl	
Total reaction mix	20 µl	
Template RNA, add	5 µl	
Total volume	25 µl	
<p>* Thermo Fischer/Invitrogen: SuperScriptIII OneStep RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase  ** MgSO<sub>4</sub> (50 mM) [Sigma]. This component is not provided with the OneStep RT-PCR kit  *** non-acetylated [Roche].</p>		
<b>Cycler:</b>		
55°C	10'	
94°C	3'	
94°C	15"	
58°C	30"	45x

#### 4. Convalide biomolecolari

Per determinare se i prodotti amplificati sono effettivamente geni SARS-CoV-2, è essenziale la convalida biomolecolare dei prodotti PCR amplificati. Per un test diagnostico, questa convalida è un must assoluto.

La convalida dei prodotti della PCR deve essere eseguita eseguendo il prodotto della PCR in un gel di agarosio-EtBr all'1% insieme a un indicatore di dimensione (righello del DNA o scala del DNA) in modo da poter stimare la dimensione del prodotto. La dimensione deve corrispondere alla dimensione calcolata del prodotto di amplificazione. Ma è ancora meglio sequenziare il prodotto di amplificazione. Quest'ultimo darà il 100% di certezza sull'identità del prodotto di amplificazione. Senza la convalida molecolare non si può essere sicuri dell'identità dei prodotti della PCR amplificati. Considerando i gravi errori di progettazione descritti in precedenza, i prodotti PCR amplificati possono essere qualsiasi cosa.

Anche non menzionato nell'articolo di Corman-Drosten è il caso di piccoli frammenti di qPCR (circa 100 bp): potrebbe essere gel di agarosio all'1,5% o persino un gel di acrilammide.

**Il fatto che questi prodotti PCR non siano stati convalidati a livello molecolare è un altro errore eclatante del protocollo, rendendo inutile qualsiasi test basato su di esso come strumento diagnostico specifico per identificare il virus SARS-CoV-2.**

#### 5. Controlli positivi e negativi per confermare/confutare il rilevamento di virus specifici.

L'ipotesi non confermata descritta nel documento di Corman-Drosten è che SARS-CoV-2 sia l'unico virus del gruppo beta-coronavirus simile alla SARS che attualmente causa infezioni nell'uomo. Le sequenze su cui si basa il loro metodo PCR sono sequenze in silico, fornite da un laboratorio in Cina [23], perché al momento dello sviluppo del test PCR nessun materiale di controllo di SARS-CoV-infettivo ("vivo") o inattivato 2 era a disposizione degli autori. Il test PCR è stato quindi progettato utilizzando la sequenza del noto SARS-CoV come materiale di controllo per il componente Sarbeco (Dr. Meijer, coautore Corman-Drosten paper in uno scambio di e-mail con il Dr. Peter Borger) [2].

Si presume che tutti gli individui risultati positivi al test RT-PCR, come descritto nel documento Corman-Drosten, siano positivi per le infezioni da SARS-CoV-2. Ci sono tre gravi difetti nella loro ipotesi. In primo luogo, un test positivo per le molecole di RNA descritte nell'articolo di Corman-Drosten non può essere equiparato a "infezione da virus". Un test RT-PCR positivo indica semplicemente la presenza di molecole di RNA virale. Come dimostrato al punto 1d (sopra), **il test di Corman-Drosten non è stato progettato per rilevare il virus a lunghezza intera, ma solo un frammento del virus. Abbiamo già concluso che questo classifica il test come inadatto come test diagnostico per le infezioni da virus SARS.**

In secondo luogo e di grande rilevanza, la funzionalità del test RT-PCR pubblicato non è stata dimostrata con l'uso di un controllo positivo (RNA isolato SARS-CoV-2) che è un gold standard scientifico essenziale.

In terzo luogo, l'articolo di Corman-Drosten afferma:

*“Per dimostrare che i test possono rilevare altri virus correlati alla SARS associati ai pipistrelli, abbiamo utilizzato il test del gene E per testare sei campioni fecali derivati da pipistrelli disponibili da Drexler et al. [...] und Muth et al. [...]. Questi campioni positivi al virus provenivano da pipistrelli rinolofidi europei. Il rilevamento di questi valori anomali filogenetici all'interno del clade CoV correlato alla SARS suggerisce che è probabile che vengano rilevati tutti i virus asiatici. Ciò, in teoria, garantirebbe un'ampia sensibilità anche in caso di acquisizioni multiple indipendenti di virus varianti da un serbatoio animale».*

**Questa affermazione dimostra che il gene E utilizzato nel test RT-PCR, come descritto nel documento Corman-Drosten, non è specifico per SARS-CoV-2.**

I primer del gene E rilevano anche un ampio spettro di altri virus SARS. Il genoma del coronavirus è il più grande di tutti i virus a RNA che infettano l'uomo e hanno tutti una struttura molecolare molto simile. Tuttavia, SARS-CoV1 e SARS-CoV-2 hanno due impronte genetiche altamente specifiche, che li distinguono dagli altri coronavirus. Innanzitutto, una sequenza di impronte digitali univoca (KTFPPTPEPKKDKKKK) è presente nella proteina N di SARS-CoV e SARS-CoV-2 [13,14,15]. In secondo luogo, sia SARS-CoV1 che SARS-CoV2 non contengono la proteina HE, mentre tutti gli altri coronavirus possiedono questo gene [13, 14]. **Quindi, per rilevare specificamente un prodotto PCR SARS-CoV1 e SARS-CoV-2, la regione sopra nel gene N avrebbe dovuto essere scelta come target di amplificazione.** Un test diagnostico affidabile dovrebbe concentrarsi su questa regione specifica nel gene N come test di conferma. **La PCR per questo gene N non è stata ulteriormente convalidata né raccomandata come gene di prova dall'articolo di Drosten-Corman, perché "non così sensibile" con la sonda**

**originale SARS-CoV [1].**

Inoltre, l'assenza del gene HE sia in SARS-CoV1 che in SARS-CoV-2 rende questo gene il controllo negativo ideale per escludere altri coronavirus. La carta Corman-Drosten non contiene questo controllo negativo, né contiene altri controlli negativi. **Il test PCR nel documento Corman-Drosten quindi non contiene né un unico controllo positivo né un controllo negativo per escludere la presenza di altri coronavirus. Questo è un altro importante difetto di progettazione che classifica il test come inadatto alla diagnosi.**

**6. La procedura operativa standard (SOP) non è disponibile**

Dovrebbe essere disponibile una Procedura Operativa Standard (SOP) che specifichi in modo univoco i parametri di cui sopra, in modo che tutti i laboratori siano in grado di impostare le stesse condizioni di prova identiche. Avere una POS universale convalidata è essenziale, perché facilita il confronto dei dati all'interno e tra i paesi. **È molto importante specificare tutti i parametri del primer in modo inequivocabile. Notiamo che ciò non è stato fatto.** Inoltre, non è specificato il valore Ct per indicare quando un campione deve essere considerato positivo o negativo. Non è inoltre specificato quando un campione è considerato infetto da virus SARS-CoV. Come mostrato sopra, il test non è in grado di distinguere tra virus e frammenti di virus, quindi il valore Ct che indica la positività è di fondamentale importanza. Questo valore Ct avrebbe dovuto essere specificato nella Procedura Operativa Standard (SOP) e messo in linea in modo che tutti i laboratori che effettuano questo test abbiano esattamente le stesse condizioni limite. Indica la scienza imperfetta che tale SOP non esiste. I laboratori sono quindi liberi di condurre il test come ritengono opportuno, determinando un'enorme quantità di variazioni. I laboratori di tutta Europa sono lasciati con una moltitudine di domande; quali primer ordinare? quali nucleotidi riempire nei posti indefiniti? quale valore Tm scegliere? Quanti cicli di PCR eseguire? A quale valore Ct il campione è positivo? E quando è negativo? E quanti geni testare? Devono essere testati tutti i geni o solo il gene E e RpRd come mostrato nella tabella 2 dell'articolo di Corman-Drosten? Dovrebbe essere testato anche il gene N? E qual è il loro controllo negativo? Qual è il loro controllo positivo?

**Il protocollo come descritto è purtroppo molto vago ed erroneo nel suo design che si può andare in dozzine di direzioni diverse. Non sembra esserci alcuna standardizzazione né una SOP, quindi non è chiaro come questo test possa essere implementato.**

**7. Conseguenze degli errori descritti ai punti 1-5: risultati falsi positivi.**

Il test RT-PCR descritto nell'articolo di Corman-Drosten contiene così tanti errori di progettazione biologica molecolare (vedi 1-5) che non è possibile ottenere risultati univoci. È inevitabile che questo test generi un numero enorme di cosiddetti "falsi positivi". La definizione di falsi positivi è un campione negativo, che inizialmente ottiene un punteggio positivo, ma che è negativo dopo aver ripetuto il test con lo stesso test. I falsi positivi sono risultati del test positivi errati, ovvero campioni negativi che risultano positivi. Ed è proprio questo che si trova nel documento Corman-Drosten. A pagina 6 del PDF del manoscritto gli autori dimostrano, che anche in condizioni di laboratorio ben controllate, con questo test viene generata una percentuale considerevole di falsi positivi:

***“In quattro singole reazioni al test, è stata osservata una debole reattività iniziale, tuttavia sono risultate negative***

*dopo aver ripetuto il test con lo stesso dosaggio. Questi segnali non erano associati a nessun virus particolare e per ogni virus con cui si è verificata una reattività positiva iniziale, c'erano altri campioni che contenevano lo stesso virus a una concentrazione più elevata ma non erano risultati positivi. Dati i risultati dell'ampia qualificazione tecnica sopra descritta, si è concluso che questa reattività iniziale non era dovuta all'instabilità chimica delle sonde PCR in tempo reale e molto probabilmente a problemi di gestione causati dalla rapida introduzione di nuovi test diagnostici e controlli durante questa valutazione studia."*

[1]

La prima frase di questo estratto è una chiara prova che il test PCR descritto nell'articolo di Corman-Drosten genera falsi positivi. Anche nelle condizioni ben controllate del laboratorio Charité all'avanguardia, 4 su 310 test primari sono falsi positivi per definizione. Quattro campioni negativi inizialmente sono risultati positivi, poi sono risultati negativi al nuovo test. Questo è il classico esempio di falso positivo. In questo caso gli autori non li identificano come falsi positivi, il che è intellettualmente disonesto.

Un'altra osservazione rivelatrice nell'estratto sopra è che gli autori spiegano i falsi positivi come "problemi di gestione causati dalla rapida introduzione di nuovi test diagnostici". Immaginate i laboratori che devono introdurre il test senza tutte le informazioni necessarie normalmente descritte in una SOP.

## 8. Il documento Corman-Drosten non è stato sottoposto a peer review

Prima della pubblicazione formale in una rivista accademica, gli articoli scientifici e medici sono tradizionalmente certificati da una "revisione tra pari". In questo processo, i redattori della rivista si avvalgono della consulenza di vari esperti ("referenti") che hanno valutato il documento e possono identificare punti deboli nelle sue ipotesi, metodi e conclusioni. In genere una rivista pubblicherà un articolo solo una volta che gli editori saranno convinti che gli autori abbiano affrontato le preoccupazioni dei revisori e che i dati presentati supportino le conclusioni tratte nel documento. Questo processo è anche descritto per Eurosurveillance [16].

Il paper Corman-Drosten è stato presentato a Eurosurveillance il 21 gennaio 2020 e accettato per la pubblicazione il 22 gennaio 2020. Il 23 gennaio 2020 il paper era online. Il 13 gennaio 2020 la versione 1-0 del protocollo è stata pubblicata sul sito ufficiale dell'OMS [17], aggiornata il 17 gennaio 2020 come documento versione 2-1 [18], ancor prima che il documento Corman-Drosten fosse pubblicato il 23 gennaio su Eurosorveglianza.

Normalmente, la revisione tra pari è un processo che richiede tempo poiché almeno due esperti del settore devono leggere e commentare criticamente il documento presentato. A

nostro avviso, questo documento non è stato sottoposto a peer review. Ventiquattro ore non sono semplicemente sufficienti per eseguire un'approfondita revisione tra pari. La nostra conclusione è supportata dal fatto che abbiamo riscontrato un numero enorme di difetti di progettazione molto gravi, che rendono il test PCR completamente inadatto come strumento diagnostico per identificare il virus SARS-CoV-2. Qualsiasi biologo molecolare che abbia familiarità con la progettazione della RT-PCR avrebbe facilmente osservato i gravi errori presenti nell'articolo di Corman-Drosten prima dell'effettivo processo di revisione. Abbiamo chiesto a Eurosurveillance il 26 ottobre 2020 di inviarci una copia del rapporto di revisione tra pari. Ad oggi, non abbiamo ricevuto questo rapporto e in una lettera del 18 novembre 2020, l'ECDC in quanto ospitante per Eurosurveillance ha rifiutato di fornire l'accesso senza fornire ragioni scientifiche sostanziali per la loro decisione. Al contrario, scrivono che "la divulgazione pregiudicherebbe lo scopo delle indagini scientifiche". [24].

## 9. Autori come redattori

Un ultimo punto è di grande preoccupazione. Risulta che due autori dell'articolo Corman-Drosten, Christian Drosten e Chantal Reusken, sono anche membri del comitato editoriale di questa rivista [19]. Esiste quindi un grave conflitto di interessi che rafforza i sospetti che il documento non sia stato sottoposto a peer review. Sembra che la rapida pubblicazione sia stata possibile semplicemente perché gli autori facevano anche parte del comitato editoriale di Eurosurveillance. Questa pratica è classificata come compromettente l'integrità scientifica.

## CATALOGO SINTETICO DEGLI ERRORI TROVATI NELLA CARTA

---

Il documento Corman-Drosten contiene i seguenti errori specifici:

1. Non esiste alcun motivo specifico per utilizzare queste concentrazioni estremamente elevate di primer in questo protocollo. Le concentrazioni descritte portano ad un aumento dei legami non specifici e delle amplificazioni del prodotto PCR, rendendo il test inadatto come strumento diagnostico specifico per identificare il virus SARS-CoV-2.
2. Sei posizioni traballanti non specificate introdurranno un'enorme variabilità nelle implementazioni di laboratorio del mondo reale di questo test; la confusa descrizione non specifica nel documento di Corman-Drosten non è adatta come protocollo operativo standard, rendendo il test inadatto come strumento diagnostico specifico per identificare il virus SARS-CoV-2.
3. Il test non è in grado di discriminare tra l'intero virus e i frammenti virali. Pertanto, il test non può essere utilizzato come diagnostico per virus intatti (infettivi), rendendo il test inadatto come strumento diagnostico specifico per identificare il virus SARS-CoV-2 e fare inferenze sulla presenza di un'infezione.
4. Una differenza di 10° C rispetto alla temperatura di annealing  $T_m$  per la coppia di primer1 (RdRp\_SARsR\_F e RdRp\_SARsR\_R) rende inoltre il test inadatto come strumento diagnostico specifico per identificare il virus SARS-CoV-2.
5. Un errore grave è l'omissione di un valore Ct al quale un campione è considerato positivo e negativo. Questo valore Ct non si trova anche nelle richieste di follow-up, rendendo il test inadatto come strumento diagnostico specifico per identificare il virus SARS-CoV-2.
6. I prodotti della PCR non sono stati convalidati a livello molecolare. Questo fatto rende inutile il protocollo come strumento diagnostico specifico per identificare il virus SARS-CoV-2.



7. Il test PCR non contiene né un controllo positivo univoco per valutare la sua specificità per SARS-CoV-2 né un controllo negativo per escludere la presenza di altri coronavirus, rendendo il test inadatto come strumento diagnostico specifico per identificare il SARS-CoV-2 virus.

8. Il disegno del test nell'articolo di Corman-Drosten è così vago e imperfetto che si può andare in dozzine di direzioni diverse; nulla è standardizzato e non c'è SOP. Ciò mette fortemente in dubbio la validità scientifica del test e lo rende inadatto come strumento diagnostico specifico per identificare il virus SARS-CoV-2.

9. Molto probabilmente, il documento di Corman-Drosten non è stato sottoposto a revisione paritaria, rendendo il test inadatto come strumento diagnostico specifico per identificare il virus SARS-CoV-2.

10. Troviamo gravi conflitti di interesse per almeno quattro autori, oltre al fatto che due degli autori dell'articolo Corman-Drosten (Christian Drosten e Chantal Reusken) sono membri del comitato editoriale di Eurosurveillance. Il 29 luglio 2020 è stato aggiunto un conflitto di interessi (Olfert Landt è CEO di TIB-Molbiol; Marco Kaiser è ricercatore senior presso GenExpress e funge da consulente scientifico per TIB-Molbiol), che non era dichiarato nella versione originale (ed è tuttora mancante nella versione PubMed); TIB-Molbiol è l'azienda che è stata "la prima" a produrre kit PCR (Light Mix) basati sul protocollo pubblicato nel manoscritto Corman-Drosten e, secondo le loro stesse parole, ha distribuito questi kit PCR-test prima che la pubblicazione fosse anche presentato [20]; inoltre, Victor Corman & Christian Drosten non ha menzionato la loro seconda affiliazione: il laboratorio di test commerciale "Labor Berlin". Entrambi sono responsabili della diagnostica dei virus lì [21] e l'azienda opera nel campo dei test PCR in tempo reale.

**Alla luce del nostro riesame del protocollo di test per identificare SARS-CoV-2 descritto nel documento Corman-Drosten, abbiamo identificato errori e fallacie intrinseche che rendono inutile il test PCR SARS-CoV-2.**

## CONCLUSIONE

---

La decisione su quali protocolli di test vengono pubblicati e resi ampiamente disponibili spetta esattamente a Eurosurveillance. La decisione di riconoscere gli errori evidenti nel documento Corman-Drosten ha il vantaggio di ridurre notevolmente i costi e le sofferenze umane in futuro.

Non è nel migliore interesse di Eurosurveillance ritirare questo documento? La nostra conclusione è chiara. Di fronte a tutti i tremendi difetti ed errori di progettazione del protocollo PCR descritti qui, concludiamo: non è rimasta molta scelta nel quadro dell'integrità scientifica e della responsabilità.

## RIFERIMENTI

---

[1] Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Rilevamento del nuovo coronavirus del 2019 (2019-nCoV) mediante RT-PCR in tempo reale. *Sorveglianza dell'euro*. 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

[2] Comunicazione e-mail tra il Dr. Peter Borger e il Dr. Adam Meijer: [materiale supplementare](#)

- [3] Jafaar et al., Correlazione tra 3790 campioni quantitativi di reazione a catena della polimerasi-positivi e colture cellulari positive, inclusi gli isolati di coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave del 1941.  
<https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa1491/5912603>
- [4] BBC, 21 gennaio 2020: <https://www.bbc.com/news/world-asia-china-51185836> ;  
Archivio: <https://archive.is/0qRmZ>
- [5] Google Analytics – Morti COVID19 nel mondo: <https://bit.ly/3fndemJ>  
Archivio: <https://archive.is/PpqEE>
- [6] Test di laboratorio per il Centro tecnico di risposta alle emergenze COVID-19, NIVD in Cina CDC 15 marzo 2020: <http://www.chinacdc.cn/en/COVID19/202003/P020200323390321297894.pdf>
- [7] Real-Time PCR Handbook Life Technologies:  
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-Handbook.pdf>
- Nolan T, Huggett J, Sanchez E. Guida alle buone pratiche per l'applicazione della PCR quantitativa (qPCR) Prima edizione 2013
- [8] Trestan Pillonel et al, Lettera all'editore: rilevamento SARS-CoV-2 mediante RT-PCR in tempo reale:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7268274/>
- [9] Kurkela, Satu e David WG Brown. "Tecniche di diagnostica molecolare". Medicina 38.10 (2009): 535-540.
- [10] Wolfel et al., Valutazione virologica dei pazienti ospedalizzati con COVID-2019  
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x>
- [11] Strumento web Thermofischer Primer Dimer: [https://www.thermofischer.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html](https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html)
- Materiale supplementare
- [12] Primer-BLAST, NCBI – Centro nazionale per le informazioni sulla biotecnologia:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- [13] Marra MA, Steven JM], Caroline RA, Robert AH, Angela BW et al. (2003) Scienza. La sequenza del genoma del coronavirus associato alla SARS. Scienza 300(5624): 1399-1404.
- [14] Sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 isolato Wuhan-Hu-1, genoma completo : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN908947>
- [15] Borger P. Ci si aspettava un Coronavirus simile alla SARS, ma non è stato fatto nulla per essere preparati. Am J Biomed Sci Res 2020. <https://biomedgrid.com/pdf/AJBSR.MS.ID.001312.pdf>  
[https://www.researchgate.net/publication/341120750\\_A\\_SARS-like\\_Coronavirus\\_was\\_Expected\\_but\\_nothing\\_was\\_done\\_to\\_be\\_Prepared](https://www.researchgate.net/publication/341120750_A_SARS-like_Coronavirus_was_Expected_but_nothing_was_done_to_be_Prepared) ;  
Archivio: <https://archive.is/i76Hu>
- [16] Processo di valutazione/revisione del documento Eurosurveillance: <https://www.eurosurveillance.org/evaluation>
- [17] Raccomandazione ufficiale del protocollo e manoscritto Corman-Drosten dell'OMS, pubblicata il 13 gennaio 2020 come versione 1.0 del documento:  
<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf> ; archivio: <https://bit.ly/3m3jXVH>

[18] Raccomandazione ufficiale dell'OMS per il protocollo RT-qPCR di Corman/Drosten, che deriva direttamente dalla pubblicazione di Eurosurveillance, documento-versione 2-1, pubblicata il 17 gennaio 2020: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2)

[19] Eurosurveillance Comitato Editoriale, 2020: <https://www.eurosurveillance.org/upload/site-beni/imgs/2020-09-editoriale%20Board%20PDF.pdf> ;  
Archivio: <https://bit.ly/2TqXBJX>

[20] Istruzioni per l'uso LightMix SarbecoV E-gene plus EAV Control, TIB-Molbiol & Roche Molecular Solutions, 11 gennaio 2020: [https://www.roche-as.es/lm\\_pdf/MDx\\_40-0776\\_96\\_Sarbeco-E-gene\\_V200204\\_09164154001\(1\).pdf](https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_40-0776_96_Sarbeco-E-gene_V200204_09164154001(1).pdf)  
Archivio, timestamp - 11 gennaio 2020: <https://archive.is/Vulo5> ;  
Archivio: <https://bit.ly/3fm9bXH>

[21] Christian Drosten & Victor Corman, responsabili della diagnostica virale presso Labor Berlin: <https://www.laborberlin.com/fachbereiche/virologie/>  
Archivio: <https://archive.is/CDEUG>

[22] Tom Jefferson, Elizabeth Spencer, Jon Brassey, Carl Heneghan Colture virali per la valutazione dell'infettività COVID- 19. Revisione sistematica. Revisione sistematica doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.04.20167932> <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.08.04.20167932v4>

[23] Kim et al., L'architettura del trascrittoma SARS-CoV-2: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420304062>

[24] Risposta dell'ECDC al Dr. Peter Borger, 18 novembre 2020:  
[Materiale supplementare](#)

[25] Prof. Dr. Ulrike Kämmerer & team, sondaggio e tabella Primer-BLAST:  
[materiale supplementare](#)

#### Letteratura supplementare:

Descrizione RT-PCR RKI Germania, a pagina 10 di questo link:

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

## Affiliazioni dell'autore :

---

1) **Dr. Pieter Borger** (MSc, PhD), Genetica molecolare, W+W Research Associate, Lörrach, Germania

2) **Rajesh Kumar Malhotra** (Artist Alias: **Bobby Rajesh Malhotra** ), Ex artista 3D / Scientific Visualizations at CeMM – Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences (2019-2020), University for Applied Arts – Department for Digital Arts Vienna, Austria

3) **Dr. Michael Yeadon** BSs (Hons) Biochem Tox U Surrey, PhD Farmacologia U Surrey. Amministratore delegato, Yeadon Consulting Ltd, ex capo scienziato Pfizer, Regno Unito

- 4) **Dr. Clare Craig** MA, (Cantab) BM, BCh (Oxon), FRCPath, Regno Unito
  
- 5) **Kevin McKernan** , BS Emory University, Chief Scientific Officer, fondatore di Medical Genomics, ha progettato la pipeline di sequenziamento presso WIBR/MIT per il Progetto Genoma Umano, ha inventato e sviluppato il sequenziatore SOLiD, ha ottenuto brevetti relativi a PCR, isolamento e sequenziamento del DNA, USA
  
- 6) **Prof. Dr. Klaus Steger** , Dipartimento di Urologia, Urologia e Andrologia Pediatrica, Andrologia Molecolare, Centro di Ricerca Biomedica dell'Università Justus Liebig, Giessen, Germania
  
- 7) **Dr. Paul McSheehy** (BSc, PhD), biochimico e farmacologo industriale, Loerrach, Germania
  
- 8) **Dr. Lidiya Angelova** , MSc in Biology, PhD in Microbiology, Ex ricercatrice presso il National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Maryland, USA
  
- 9) **Dott. Fabio Franchi** , Ex Dirigente Medico (MD) in Reparto Malattie Infettive, specializzato in “Malattie Infettive” e “Igiene e Medicina Preventiva”, Società Scientifica per il Principio di Precauzione (SSPP), Italia
  
- 10) Dott. med. Thomas Binder, internista e cardiologo (FMH), Svizzera
  
- 11) Prof. Dr. med. Henrik Ullrich, specialista in radiologia diagnostica, medico capo presso il Centro di radiologia di Collm Oschatz-Hospital, Germania
  
- 12) **Prof. Dr. Makoto Ohashi** , Professore emerito, PhD in Microbiology and Immunology, Tokushima University, Japan
  
- 13) Dott. Stefano Scoglio, B.Sc. Ph.D., Microbiologo, Nutrizionista, Italia
  
- 14) Dr. Marjolein Doesburg-van Kleffens (MSc, PhD), specialista in medicina di laboratorio (chimica clinica), Maasziekenhuis Pantein, Beugen, Paesi Bassi
  
- 15) Dott.ssa Dorothea Gilbert (MSc, PhD), PhD in chimica ambientale e tossicologia. DGI Consulting Services, Oslo, Norvegia
  
- 16) Dott. Rainer J. Klement, PhD. Dipartimento di Radioterapia Oncologica, Leopoldina Hospital Schweinfurt, Germania
  
- 17) Dr. Ruth Schrufer, PhD, genetica umana/immunologia, Monaco di Baviera, Germania,
  
- 18) Dra. Berber W. Pieksma, medico generico, Paesi Bassi
  
- 19) Dott. Jan Bonte (GJ), Consulente Neurologo, Paesi Bassi

20) Dr. Bruno H. Dalle Carbonare (biologo molecolare), specialista in PI, BDC Basilea, Svizzera

21) **Dr. Kevin P. Corbett**, MSc Nursing (Kings College London) PhD (London South Bank)  
Scienze sociali (Studi scientifici e tecnologici) Londra, Inghilterra, Regno Unito

22) Prof. Dr. Ulrike Kämmerer, specialista in virologia/immunologia/biologia umana/biologia cellulare, Ospedale universitario di Würzburg, Germania

### **Contributi dell'autore:**

PB: Ha pianificato e condotto le analisi e la ricerca, concettualizzando il manoscritto.

BRM: Ha pianificato e condotto la ricerca, concettualizzando le figure e il manoscritto.

MY: Rileggere le analisi e le ricerche.

KMcK: Ha condotto le analisi e la ricerca, ha concettualizzato il manoscritto.

KS: Ha condotto le analisi e la ricerca.

PMcS: Rilettura delle analisi e della ricerca.

LA: Rilettura delle analisi e della ricerca.

FF: Rileggere le analisi e le ricerche.

TB: Rilettura delle analisi e della ricerca.

HU: Rileggere le analisi e le ricerche.

MO: Rileggere le analisi e le ricerche.

SS: Correzione delle analisi e della ricerca.

MDvK: Rilettura delle analisi e della ricerca.

DG: Rileggere le analisi e le ricerche.

RJK: Correzione delle bozze delle analisi e della ricerca.

RS: Rileggere le analisi e le ricerche, e il manoscritto.

BWK: Rileggere le analisi e le ricerche.

RvV: Rilettura delle analisi e della ricerca.

JB: Rileggere le analisi e le ricerche.

KC: Rileggere le analisi e le ricerche.

Regno Unito: pianificato e condotto le analisi e la ricerca, concettualizzando il manoscritto.

## Lettori di bozze aggiuntivi:

Saji N Hameed, Informatica ambientale, Università di Aizu, Tsuruga, Ikki-machi, Aizuwakamatsu-shi, Fukushima, Giappone

Howard R. Steen, MA Chem. ing. Cantab, ex responsabile della ricerca, Germania

## Addendum

Aggiornamento 2.12.2020:

*Contributo dell'autore* Il dott. Michael Yeadon è stato modificato in:  
Revisione delle analisi e della ricerca.

*Affiliazione* all'autore Kevin Mckernan modificato in:  
Medicinal Genomics.

Aggiornamento 5.3.2021

Titolo del co-firmatario cambiato in:  
Drs. Jan Bonte

C'è stato un errore di battitura che è stato corretto ora.

Il prossimo "

## Commenti

-  **Sebe Vpgel** ha detto:  
29 novembre 2020 alle 23:36

Grazie per il tuo eccellente lavoro!

-  **robvdz** dice:  
30 novembre 2020 alle 18:58

Oltre a tutto questo, non lascerò che qualcuno che non abbia una formazione medica si aggiri nelle mie cavità nasali per qualsiasi motivo.

-  **Bayaba** dice: