

# Informe de revisión Corman-Drosten et al. Eurosurveillance 2020

27 de noviembre de 2020

Este extenso informe de revisión se presentó oficialmente al consejo editorial de Eurosurveillance el 27 de noviembre de 2020 a través de su portal de envío, adjunto a este informe de revisión hay una carta de solicitud de retractación, firmada por todos los autores principales y coautores. Los primeros y últimos nombres enumerados son el primer y segundo autor principal. Todos los nombres intermedios son coautores.

## **La revisión por pares externos de la prueba RTPCR para detectar el SARS-CoV-2 revela 10 fallas científicas importantes a nivel molecular y metodológico: consecuencias de los resultados falsos positivos.**

---

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

## **RESUMEN**

---

En la publicación titulada “Detección del nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV) por RT-PCR en tiempo real” (Eurosurveillance 25 (8) 2020) los autores presentan un flujo de trabajo diagnóstico y un protocolo RT-qPCR para la detección y diagnóstico de 2019-nCoV (ahora conocido como SARS-CoV-2), que afirman estar validado, además de ser una metodología de diagnóstico sólida para su uso en entornos de laboratorio de salud pública.

A la luz de todas las consecuencias que resultan de esta misma publicación para las sociedades de todo el mundo, un grupo de investigadores independientes realizó una revisión punto por punto de la publicación mencionada en la que 1) todos los componentes del diseño de prueba presentado fueron verificados en forma cruzada, 2) Las recomendaciones del protocolo RT-qPCR se evaluaron con arreglo a las buenas prácticas de laboratorio y 3) los parámetros se examinaron frente a la literatura científica relevante que cubre el campo.

El protocolo RT-qPCR publicado para la detección y el diagnóstico de 2019-nCoV y el manuscrito sufren numerosos errores técnicos y científicos, incluido un diseño de cebador insuficiente, un protocolo RT-qPCR problemático e insuficiente y la ausencia de una validación de prueba precisa. Ni la prueba presentada ni el manuscrito en sí cumplen los requisitos para una publicación científica aceptable. Además, no se mencionan los conflictos de intereses graves de los autores. Por último, el breve período de tiempo entre la presentación y la aceptación de la publicación (24 horas) significa que aquí no se llevó a cabo un proceso de revisión por pares sistemático, o que fue de mala calidad. Proporcionamos pruebas convincentes de varias deficiencias, errores y defectos científicos.

Teniendo en cuenta las imperfecciones científicas y metodológicas aquí presentadas, estamos seguros de que el consejo editorial de Eurosurveillance no tiene más remedio que retractarse de la publicación.

## **INFORME DE REVISIÓN CONCISA**

---

Este artículo mostrará numerosas fallas graves en el artículo de Corman-Drosten, cuya importancia ha llevado a un diagnóstico erróneo en todo el mundo de las infecciones atribuidas al SARS-CoV-2 y asociadas con la enfermedad COVID-19. Nos enfrentamos a estrictos bloqueos que han destruido la vida y los medios de subsistencia de muchas personas, el acceso limitado a la educación y estas restricciones impuestas por los gobiernos de todo el mundo son un ataque directo a los derechos básicos de las personas y sus libertades personales, lo que resulta en daños colaterales para economías enteras en un escala global.

**Hay diez problemas fatales con el documento de Corman-Drosten que describiremos y explicaremos con mayor detalle en las siguientes secciones.**

El primer y principal problema es que el nuevo Coronavirus SARS-CoV-2 (en la publicación denominada 2019-nCoV y en febrero de 2020 denominada SARS-CoV-2 por un consorcio internacional de expertos en virus) se basa en secuencias in silico (teóricas) , suministrado por un laboratorio en China [1], porque en ese momento los autores no disponían de material de control del SARS-CoV-2 infeccioso ("vivo") o inactivado ni del ARN genómico aislado del virus. Hasta la fecha, la autoría no ha realizado ninguna validación basada en virus SARS-CoV-2 aislados o ARN de longitud completa de los mismos. Según Corman et al .:

*"Nuestro objetivo era desarrollar e implementar una metodología de diagnóstico sólida para su uso en entornos de laboratorio de salud pública sin tener disponible material de virus". [1]*

El enfoque aquí debe centrarse en los dos objetivos establecidos:  
a) *desarrollo y b) implementación de una prueba de diagnóstico para su uso en entornos de laboratorio de salud pública* . Estos objetivos no se pueden lograr sin disponer de material viral real (por ejemplo, para determinar la carga viral infecciosa). En cualquier caso, solo un protocolo con la máxima precisión puede ser el objetivo principal y obligatorio en cualquier escenario-resultado de esta magnitud. La determinación de la carga viral crítica es información obligatoria y es responsabilidad del grupo de Christian Drosten realizar estos experimentos y proporcionar los datos cruciales.

Sin embargo, estas secuencias in silico se utilizaron para desarrollar una metodología de prueba de RT-PCR para identificar el virus mencionado. Este modelo se basó en la suposición de que el nuevo virus es muy similar al SARS-CoV de 2003 ya que ambos son beta-coronavirus.

Por lo tanto, la prueba de PCR se diseñó utilizando la secuencia genómica del SARS-CoV como material de control para el

componente Sarbeco; lo sabemos por nuestra comunicación personal por correo electrónico con [2] uno de los coautores del artículo de Corman-Drosten. Este método para modelar el SARS-CoV-2 se describió en el artículo de Corman-Drosten de la siguiente manera:

*“ El establecimiento y validación de un flujo de trabajo de diagnóstico para el cribado y la confirmación específica de 2019-nCoV , diseñado en ausencia de aislados de virus disponibles o muestras originales de pacientes. El diseño y la validación fueron posibles gracias a la estrecha relación genética con el SARS-CoV de 2003, y fueron ayudados por el uso de tecnología de ácido nucleico sintético ”.*

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) es una tecnología biomolecular importante para detectar rápidamente fragmentos de ARN raros, que se conocen de antemano. En el primer paso, las moléculas de ARN presentes en la muestra se transcriben de forma inversa para producir ADNc. A continuación, el ADNc se amplifica en la reacción en cadena de la polimerasa utilizando un par de cebadores específicos y una enzima ADN polimerasa termoestable. La tecnología es muy sensible y su límite de detección es teóricamente 1 molécula de cDNA. La especificidad de la PCR está muy influenciada por errores de diseño biomolecular.

## **¿Qué es importante al diseñar una prueba de RT-PCR y la prueba cuantitativa de RT-qPCR descrita en la publicación de Corman-Drosten?**

### **1. Los cebadores y sondas:**

- a) la concentración de cebadores y sondas debe estar en el rango óptimo (100-200 nM)
- b) debe ser específica del gen objetivo que desea amplificar
- c) debe tener un porcentaje óptimo de contenido de GC en relación con las bases nitrogenadas totales ( mínimo 40%, máximo 60%)
- d) para el diagnóstico de virus al menos 3 pares de cebadores deben

detectar 3 genes virales (preferiblemente lo más alejados posible en el genoma viral)

## **2. La temperatura a la que tienen lugar todas las reacciones:**

- a) temperatura de fusión del ADN ( $> 92^{\circ}$ )
- b) temperatura de amplificación del ADN (específica de TaqPol)
- c)  $T_m$ ; la temperatura de recocido (la temperatura a la que los cebadores y las sondas alcanzan la unión / desprendimiento del objetivo, que no debe superar los  $2^{\circ}\text{C}$  por par de cebadores).  $T_m$  depende en gran medida del contenido de GC de los cebadores

## **3. El número de ciclos de amplificación (menos de 35; preferiblemente 25-30 ciclos);**

En caso de detección de virus,  $> 35$  ciclos solo detecta señales que no se correlacionan con virus infecciosos según lo determinado por aislamiento en cultivo celular [revisado en 2]; Si alguien es probado por PCR como positivo cuando se usa un umbral de 35 ciclos o más (como es el caso en la mayoría de los laboratorios en Europa y EE. UU.), la probabilidad de que dicha persona esté realmente infectada es menos del 3%, la probabilidad de que dicho resultado es un falso positivo es del 97% [revisado en 3]

## **4. Validaciones biológicas moleculares; Los productos de PCR amplificados deben validarse mediante la ejecución de los productos en un gel con una regla de ADN o mediante la secuenciación directa de ADN.**

## **5. Deben especificarse controles positivos y negativos para confirmar / refutar la detección de virus específicos.**

## **6. Debe haber un procedimiento operativo estándar (POE) disponible**

SOP específica de manera inequívoca los parámetros anteriores, de modo que todos los laboratorios puedan configurar exactamente las mismas condiciones de prueba. Tener un POE universal validado es esencial, porque permite la comparación de datos dentro y entre países.

## **PREOCUPACIONES MENORES CON EL PAPEL DROSTEN CORMAN**

1. En la Tabla 1 del artículo de Corman-Drosten, se indican diferentes abreviaturas: se especifica "nM", no "nm". Además, en lo que respecta a la nomenclatura correcta, nm significa "nanómetro", por lo tanto, nm debe leer nM aquí.
2. Es consenso general escribir secuencias genéticas siempre en la dirección 5'-3', incluidos los cebadores inversos. Es muy inusual hacer la alineación con la escritura complementaria inversa de la secuencia del cebador como lo hicieron los autores en la figura 2 del artículo de Corman-Drosten. Aquí, además, una base oscilante se marca como "y" sin descripción de las bases que representan la Y.
3. Dos escollos engañosos en el artículo de Corman-Drosten son que su Tabla 1 no incluye valores de T<sub>m</sub> (valores de temperatura de recocido), ni muestra valores de GC (número de G y C en las secuencias como % -valor de bases totales).

## **PRINCIPALES PREOCUPACIONES CON EL PAPEL DROSTEN CORMAN**

### **UN FONDO**

Los autores presentan los antecedentes de su trabajo científico como: "El brote en curso del nuevo coronavirus recientemente surgido (2019-nCoV) plantea un desafío para los laboratorios de salud pública, ya que los aislamientos de virus no están disponibles mientras hay evidencia creciente de que el brote está más extendido que inicialmente pensado, y la difusión internacional a través de los viajeros ya se da".

Según BBC News [4] y Google Statistics [5], hubo 6 muertes en todo el mundo el 21 de enero de 2020, el día en que se envió el manuscrito. ¿Por qué los autores asumieron un desafío para los laboratorios de salud pública cuando no había evidencia sustancial en ese momento que indicara que el brote estaba más extendido de lo que se pensaba inicialmente?

Como objetivo, los autores declararon desarrollar e implementar una metodología de diagnóstico sólida para su uso en entornos de laboratorio de salud pública sin tener material de virus disponible. Además, reconocen que “El presente estudio demuestra la enorme capacidad de respuesta lograda mediante la coordinación de laboratorios académicos y públicos en redes de investigación nacionales y europeas”.

## B) MÉTODOS Y RESULTADOS

### 1. Diseño de cebador y sonda

#### *1a) Concentraciones de cebador erróneas*

Los protocolos de prueba de PCR fiables y precisos se diseñan normalmente utilizando entre 100 nM y 200 nM por cebador [7]. En el artículo de Corman-Drosten, observamos concentraciones de cebadores inusualmente altas y variables para varios cebadores (tabla 1). Para los pares de cebadores RdRp\_SARSr-F y RdRp\_SARSr-R, se describen 600 nM y 800 nM, respectivamente. De manera similar, para el conjunto de cebadores N\_Sarbeco\_F y N\_Sarbeco\_R, recomiendan 600 nM y 800 nM, respectivamente [1].

Debe quedar claro que estas concentraciones son demasiado altas para ser óptimas para amplificaciones específicas de genes diana. **No existe una razón específica para utilizar estas concentraciones extremadamente altas de cebadores en este protocolo. Más bien, estas concentraciones conducen a un aumento de la unión inespecífica y a la amplificación del producto de la PCR.**

**Tabla 1: Primers y sondas (adaptado del artículo de Corman-Drosten; las concentraciones de primers erróneas están resaltadas)**

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	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	CACATTGGCACCCGCAATC	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

<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) Secuencias de cebador y sonda no especificadas ("tambaleantes")*

Para obtener resultados reproducibles y comparables, es esencial definir distintivamente los pares de cebadores. En el trabajo de Corman-Drosten observamos seis posiciones no especificadas, indicadas por las letras R, W, M y S (Tabla 2). La letra W significa que en esta posición puede haber una A o una T; R significa que puede haber una G o una A; M indica que la posición puede ser una A o una C; la letra S indica que puede haber una G o una C en esta posición.

Este alto número de variantes no solo es inusual, sino que también es muy confuso para los laboratorios. Estas seis posiciones no especificadas podrían fácilmente dar como resultado el diseño de varias secuencias de cebadores alternativas diferentes que no se relacionan con el SARS-CoV-2 (2 cebadores RdRp\_SARSR\_F distintos + 8 sondas RdRp\_SARS\_P1 distintas + 4 RdRp\_SARSR\_R distintos). **Las variaciones de diseño conducirán inevitablemente a resultados que ni siquiera están relacionados con el SARS CoV-2. Por lo tanto, la descripción confusa e inespecífica del artículo de Corman-Drosten no es adecuada como protocolo operativo estándar. Estas posiciones no especificadas deberían haberse diseñado de manera inequívoca.**



Estas secuencias tambaleantes ya han creado una fuente de preocupación en el campo y han dado lugar a una Carta al Editor escrita por Pillonel et al. [8] sobre errores flagrantes en las secuencias descritas. Estos errores son evidentes en el Corman et al. suplemento también.

**Tabla 2: Primers y sondas (adaptado del artículo de Corman-Drosten; los nucleótidos no especificados ("Wobbly") en los primers están resaltados)**

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
	RdRp_SARSR-R	CARATGTAAASACACTATTAGCATA	Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs.
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 100 nM per reaction and mix with P2
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 800 nM per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 400 nm per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Use 200 nm per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 600 nm per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 200 nm per reaction

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

<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.

El protocolo de la OMS (Figura 1), que se deriva directamente del trabajo de Corman-Drosten, concluye que para confirmar la presencia de SARS-CoV-2, se deben identificar dos genes de control (los genes E y RdRp) en el ensayo. Cabe señalar que el gen RdPd tiene una posición incierta ("tambaleante") en el cebador directo (R = G / A), dos posiciones inciertas en el cebador inverso (R = G / A; S = G / C) y tiene tres posiciones inciertas en la sonda RdRp (W = A / T; R = G / A; M = A / C). Por tanto, se pueden sintetizar dos cebadores directos diferentes, cuatro cebadores inversos diferentes y ocho sondas distintas para el gen RdPd. ¡Juntos, hay 64 combinaciones posibles de cebadores y sondas!

El artículo de Corman-Drosten identifica además un tercer gen que, según el protocolo de la OMS, no se validó más y se consideró innecesario:

*"Es de destacar que el ensayo del gen N también funcionó bien, pero no se sometió a una validación adicional intensiva porque era un poco menos sensible".*

Esta fue una omisión desafortunada, ya que sería mejor usar los tres genes PCR como ensayos de confirmación, y esto habría resultado en un protocolo de herramienta de diagnóstico de detección de ARN de virus casi suficiente. Tres pasos de ensayo de confirmación al menos minimizarían los errores e incertidumbres en cada paso de plegado con respecto a los puntos "tambaleantes". (No obstante, el protocolo aún no alcanzaría ninguna "buena práctica de laboratorio", si se tienen en cuenta todos los demás errores de diseño).

En su forma actual, el análisis del gen N lamentablemente no se propone en la recomendación de la OMS (Figura 1) como un tercer paso de confirmación obligatorio y crucial, ni se enfatiza en el artículo de Corman-Drosten como una garantía opcional importante "para un flujo de trabajo de rutina". (Tabla 2).

**En consecuencia, en casi todos los procedimientos de prueba en todo el mundo, solo se utilizaron 2 coincidencias de cebadores en lugar de las tres. Esta supervisión hace que todo el protocolo de prueba sea inútil con respecto a la entrega de resultados de prueba precisos de importancia real en una pandemia en curso.**

**Figura 1: El ensayo confirmatorio N-Gene no se destaca como tercer paso necesario en la recomendación oficial del protocolo Drosten-Corman de la OMS a continuación [8] ni se requiere como un paso crucial para una mayor precisión de la**

**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

prueba en la publicación de Eurosurveillance.

*1c) Contenido de GC erróneo (discutido en 2c, junto con la temperatura de recocido ( $T_m$ ))*

*1d) Detección de genes virales*

No se recomienda la RT-PCR para el diagnóstico primario de infección. Esta es la razón por la que la prueba RT-PCR utilizada en la rutina clínica para la detección de COVID-19 no está indicada para el diagnóstico de COVID-19 de forma reglamentaria.

*“Los médicos deben reconocer la mayor precisión y velocidad de las técnicas de diagnóstico molecular para el diagnóstico de infecciones, pero también deben comprender sus limitaciones. Los resultados de laboratorio siempre deben interpretarse en el contexto de la presentación clínica del paciente, y se requiere el lugar, la calidad y el momento adecuados para la recolección de la muestra para obtener resultados confiables ”. [9]*

Sin embargo, se puede utilizar para ayudar al médico en el diagnóstico diferencial cuando tiene que discriminar entre diferentes infecciones del pulmón (la gripe, la Covid-19 y el SARS tienen síntomas muy similares). Para un diagnóstico confirmativo de un virus específico, se

deben aplicar al menos 3 pares de cebadores específicos para detectar 3 genes específicos del virus. Preferiblemente, estos genes diana deben ubicarse a la mayor distancia posible en el genoma viral (incluidos los extremos opuestos).

Aunque el artículo de Corman-Drosten describe 3 cebadores, estos solo cubren aproximadamente la mitad del genoma del virus. Este es otro factor que disminuye la especificidad para la detección de ARN del virus COVID-19 intacto y aumenta la cotización de resultados falsos positivos.

Por lo tanto, incluso si obtenemos tres señales positivas (es decir, los tres pares de cebadores dan 3 productos de amplificación diferentes) en una muestra, esto no prueba la presencia de un virus. **Un mejor diseño de cebador tendría cebadores terminales en ambos extremos del genoma viral. Esto se debe a que todo el genoma viral estaría cubierto y tres señales positivas pueden discriminar mejor entre un virus completo (y por lo tanto potencialmente infeccioso) y genomas virales fragmentados (sin potencia infecciosa).** Para inferir algo de importancia sobre la infectividad del virus, el gen Orf1, que codifica la enzima replicasa esencial de los virus del SARS-CoV, debería haberse incluido como diana (Figura 2). El posicionamiento de los objetivos en la región del genoma viral que se transcribe de manera más intensa y variable es otra debilidad del protocolo.

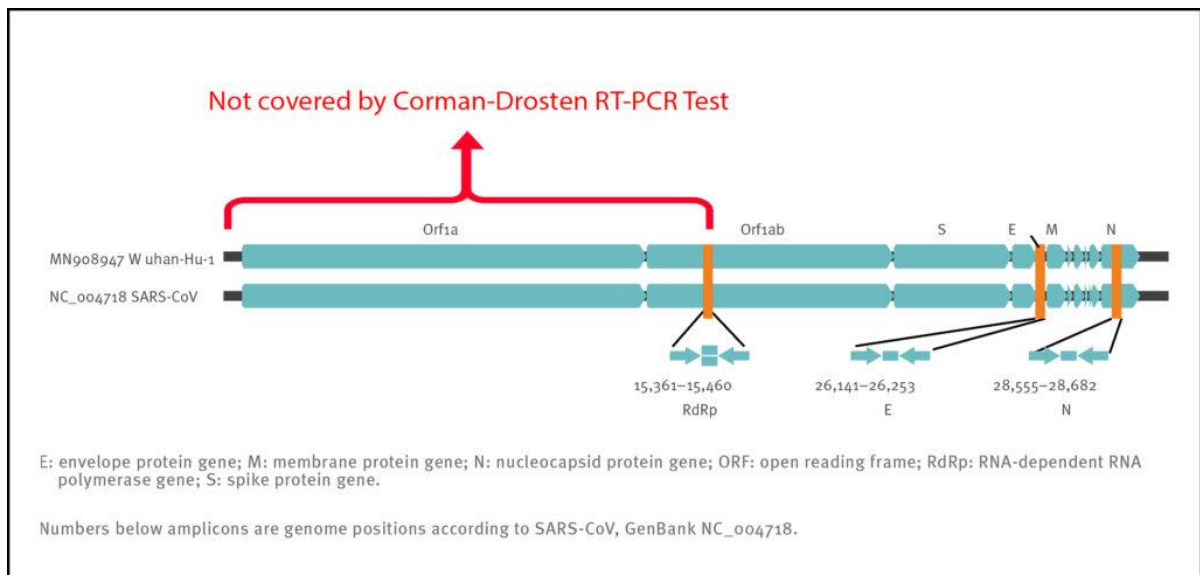
Kim y col. demuestran una expresión 3 'altamente variable de ARN subgenómico en Sars-CoV-2 [23]. Estos ARN se controlan activamente como firmas para pacientes asintomáticos y no infecciosos [10]. Es muy cuestionable cribar una población de personas asintomáticas con cebadores qPCR que tienen 6 pares de bases cebador-dímero en el extremo 3' de un cebador (Figura 3).

Al parecer, la OMS recomienda estos cebadores. Probamos todos los derivados de oscilación del papel Corman-Drosten con la herramienta de red de dímero de imprimación de Thermofisher [11]. El cebador directo RdRp tiene una homología 3' de 6 pb con Sarbeco E Reverse. A altas concentraciones de imprimación, esto es suficiente para crear inexactitudes.

Nota: hay una combinación perfecta de uno de los cebadores N con un patógeno clínico (Pantoea), que se encuentra en pacientes inmunodeprimidos. El cebador inverso también golpea a Pantoea, pero no en la misma región (Figura 3).

**Estos son errores de diseño graves, ya que la prueba no puede discriminar entre el virus completo y los fragmentos virales. La prueba no se puede utilizar como diagnóstico para los virus del SARS.**

**Figura 2: Posiciones relativas de los objetivos de amplicón en el coronavirus del SARS y el genoma del nuevo coronavirus de 2019. ORF: marco de lectura abierto; RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN. Los números por debajo del amplicón son posiciones del genoma según SARS-CoV, NC\_004718 [1];**



**Figura 3: Una prueba con la herramienta de red de dímeros de cebadores de Thermofischer revela que el cebador directo RdRp tiene una homología primaria de 6 pb en 3 'con Sarbeco E Reverse (cuadro de la izquierda). Otra prueba revela que existe una combinación perfecta de uno de los cebadores N con un patógeno clínico (Pantoea) que se encuentra en pacientes inmunodeprimidos (recuadro de la derecha).**

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. Temperaturas de reacción

### 2a) Temperatura de fusión del ADN (> 92 °).

Abordado adecuadamente en el artículo de Corman-Drosten.

### 2b) temperatura de amplificación del ADN.

Abordado adecuadamente en el artículo de Corman-Drosten.

### 2c) Contenido de GC y Tm erróneos

La temperatura de hibridación determina a qué temperatura se adhiere / separa el cebador de la secuencia objetivo. Para una amplificación eficiente y específica, el contenido de GC de los cebadores debe alcanzar un mínimo del 40% y un máximo del 60% de amplificación. **Como se indica en la tabla 3, tres de los cebadores descritos en el artículo de Corman-Drosten no están dentro del rango normal para el contenido de GC. Dos cebadores (RdRp\_SARSr\_F y RdRp\_SARSr\_R) tienen valores GC inusuales y muy bajos de 28% -31% para todas las variantes posibles de bases oscilantes, mientras que el cebador E\_Sarbeco\_F tiene un valor GC del 34,6% (Tabla 3 y segundo panel de la Tabla 3) .**

Cabe señalar que el contenido de GC determina en gran medida la unión a su objetivo específico debido a sus tres enlaces de hidrógeno en el apareamiento de bases. Por tanto, cuanto menor es el contenido

de GC del cebador, menor es su capacidad de unión a su secuencia de genes diana específica (es decir, el gen que se va a detectar). Esto significa que para que se reconozca una secuencia objetivo, tenemos que elegir una temperatura que sea lo más cercana posible a la temperatura de recocido real (valor de mejores prácticas) para que el cebador no se desprenda nuevamente, mientras que al mismo tiempo se selecciona específicamente el secuencia objetivo.

Si el valor de  $T_m$  es muy bajo, como se observa para todas las variantes oscilantes de los cebadores inversos RdRp, los cebadores pueden unirse de manera no específica a varios objetivos, disminuyendo la especificidad y aumentando los posibles resultados falsos positivos.

La temperatura de recocido ( $T_m$ ) es un factor crucial para la determinación de la especificidad / precisión del procedimiento de qPCR y esencial para evaluar la precisión de los protocolos de qPCR. Recomendación de mejores prácticas: Ambos cebadores (directo e inverso) deben tener un valor casi similar, preferiblemente el mismo valor.

Utilizamos el software de diseño de imprimaciones de uso gratuito Primer-BLAST [12, 25] para evaluar los valores de las mejores prácticas para todos los imprimadores utilizados en el artículo de Corman-Drosten (Tabla 3). Intentamos encontrar un valor de  $T_m$  de 60 ° C, mientras buscamos de manera similar el valor de % de GC más alto posible para todos los cebadores. Se consideró aceptable una diferencia máxima de  $T_m$  de 2 ° C dentro de los pares de cebadores. Al probar los pares de cebadores especificados en el artículo de Corman-Drosten, observamos una diferencia de 10 ° C con respecto a la temperatura de hibridación  $T_m$  para el par de cebadores1 (RdRp\_SARSr\_F y RdRp\_SARSr\_R). **Este es un error muy grave y hace que el protocolo sea inútil como herramienta de diagnóstico específica.**

Pruebas adicionales demostraron que solo el par de cebadores diseñado para amplificar el gen N (N\_Sarbeco\_F y N\_Sarbeco\_R) alcanzó el estándar adecuado para operar en una prueba de diagnóstico, ya que tiene suficiente contenido de GC y la diferencia de  $T_m$  entre los cebadores (N\_Sarbeco\_F y N\_Sarbeco\_R ) es de 1,85 ° C (por debajo del máximo crucial de 2 ° C de diferencia). Es

importante destacar que este es el gen que no se probó en las muestras de virus (Tabla 2) ni se enfatizó como prueba de confirmación. Además de las temperaturas de fusión altamente variables y las secuencias degeneradas en estos cebadores, hay otro factor que afecta la especificidad del procedimiento: los dNTP (0,4 uM) son 2 veces más altos que los recomendados para una amplificación muy específica. También se añade sulfato de magnesio adicional a la reacción. Este procedimiento combinado con una temperatura de recocido baja puede crear amplificaciones no específicas. Cuando se requiere magnesio adicional para qPCR, la especificidad del ensayo debe examinarse más a fondo.

**Los errores de diseño descritos aquí son tan graves que es muy poco probable que se produzca una amplificación específica del material genético del SARS-CoV-2 utilizando el protocolo del documento de Corman-Drosten.**

**Tabla 3: Contenido de GC de los cebadores y sondas (adaptado del artículo de Corman-Drosten; se destacan las aberraciones del contenido de GC optimizado. El segundo panel muestra una lista de tablas de todos los valores de las mejores prácticas de Primer-BLAST para todos los cebadores y sondas utilizados en el artículo de Corman-Drosten del Prof.Dr. Ulrike Kämmerer y su equipo**



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

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

Primer pairs	Sequence (5'-3')	GC Template strand	TM Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self 5' complementarity	Self 3' complementarity	Product length (bp)
E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Plus	26	26269	26294	58.29	34.62	8.00	8.00	113
E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Minus	22	26381	26360	60.93	45.45	7.00	1.00	
N-Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Plus	19	28706	28724	60.15	57.89	4.00	0.00	128
N-Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Minus	20	28833	28814	58.00	55.00	3.00	1.00	
RdRp_SARs-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG		22			63.74	59.09	4.00	to be added in next version	
RdRp_SARs-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA		25			53.56	28.00	7.00		
If R= G and S= G	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG		22			63.74	59.09	4.00	1.00	
	CAGATGTTAAAGACACTATTAGCATA		26			55.22	30.77	7.00	5.00	not found in the Sequence
If R= G and S= C	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG		22			63.74	59.09	4.00	1.00	
	CAGATGTTAAACACACTATTAGCATA		26			55.68	30.77	7.00	2.00	
If R= A and S= G	GTGAATGGTCATGTGTGGCGG		22			62.58	54.55	4.00	1.00	
	CAATGTTAAAGACACTATTAGCATA		26			54.23	26.92	7.00	5.00	
If R= A and S= C	GTGAATGGTCATGTGTGGCGG		22			62.58	54.55	4.00	1.00	
	CAATGTTAAACACACTATTAGCATA		26			54.69	26.92	7.00	2.00	
<b>Probes:</b>										
RdRp-SARs-P2	CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC		25			64.89	56.00	6.00	5.00	
RdRp-SARs-P1	CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC									
E-Sarbeco-P1	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG		26			66.78	53.85	4.00	2.00	
N-Sarbeco-P	ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA		25			63.15	44.00	8.00	3.00	

### 3. El número de ciclos de amplificación

Cabe señalar que no se menciona en ninguna parte del artículo de Corman-Drosten que una prueba sea positiva o negativa, o de hecho lo que define un resultado positivo o negativo. Estos tipos de pruebas de diagnóstico virológico deben basarse en un POE, incluido un número fijo y validado de ciclos de PCR (valor Ct) después de los cuales una muestra se considera positiva o negativa. El valor Ct máximo razonablemente confiable es de 30 ciclos. Por encima de un Ct de 35 ciclos, debe esperarse un número rápidamente creciente de falsos positivos.

**Los datos de PCR evaluados como positivos después de un valor Ct de 35 ciclos son completamente poco fiables.**

Citando a Jaafar et al. 2020 [3]: "En Ct = 35, el valor que usamos para informar un resultado positivo para la PCR, <3% de los cultivos son positivos". **En otras palabras, no hubo un aislamiento exitoso del virus del SARS-CoV-2 con esos valores elevados de Ct.**

**Además, los estudios científicos muestran que solo se detectan virus no infecciosos (muertos) con valores de Ct de 35 [22].**

Entre 30 y 35 hay una zona gris, donde no se puede establecer con certeza una prueba positiva. Esta área debe excluirse. Por supuesto, se podrían realizar 45 ciclos de PCR, como se recomienda en el protocolo de la OMS de Corman-Drosten (Figura 4), pero luego también hay que definir un valor Ct razonable (que no debe exceder los 30). Pero un resultado analítico con un valor Ct de 45 no tiene ningún significado científico y diagnóstico (un valor Ct razonable no debe exceder 30). Todo esto debe comunicarse con mucha claridad. Es un error significativo que el artículo de Corman-Drosten no mencione el valor máximo de Ct en el que una muestra puede considerarse inequívocamente como un resultado de prueba positivo o negativo. Este importante límite de umbral de ciclo tampoco se especifica en ninguna presentación de seguimiento hasta la fecha.

**Figura 4: Recomendación del kit de RT-PCR en el protocolo oficial de la OMS de Corman-Drosten [8]. Sólo se puede encontrar un valor de “ciclador” (ciclos) sin un Ct (valor de corte) correspondiente y científicamente razonable. Este o cualquier otro valor de ciclos no se encuentra en ninguna parte del documento Corman-Drosten real.**

3. Discriminatory assay		
<u>RdRp assay:</u>		
<u>MasterMix:</u>	Per reaction	
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_SARSr-F2 (10 µM stock solution)	1.5 µl	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
Primer RdRP_SARSr-R1 (10 µM stock solution)	2 µl	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
Probe RdRP_SARSr-P2 (10 µM stock solution)	0.5 µl	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGAGATGC-BBQ
SSIII/Taq EnzymeMix*	1 µl	
Total reaction mix	20 µl	
Template RNA, add	5 µl	
Total volume	25 µl	
* Thermo Fischer/Invitrogen: SuperScriptIII OneStep RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase ** MgSO <sub>4</sub> (50 mM) [Sigma]. This component is not provided with the OneStep RT-PCR kit *** non-acetylated [Roche].		
<u>Cycler:</u>		
55°C	10'	
94°C	3'	
94°C	15"	
58°C	30"	45x

#### 4. Validaciones biomoleculares

Para determinar si los productos amplificados son realmente genes del SARS-CoV-2, es esencial la validación biomolecular de los productos de PCR amplificados. Para una prueba de diagnóstico, esta validación es una necesidad absoluta.

La validación de los productos de PCR se debe realizar procesando el producto de PCR en un gel de agarosa-EtBr al 1% junto con un indicador de tamaño (regla de ADN o escalera de ADN) para poder estimar el tamaño del producto. El tamaño debe corresponder al tamaño calculado del producto de amplificación. Pero es incluso mejor secuenciar el producto de amplificación. Este último dará un 100% de certeza sobre la identidad del producto de amplificación. Sin validación molecular, no se puede estar seguro de la identidad de los productos de PCR amplificados. Teniendo en cuenta los graves errores de diseño descritos anteriormente, los productos de PCR amplificados pueden ser cualquier cosa.

Tampoco se menciona en el artículo de Corman-Drosten el caso de pequeños fragmentos de qPCR (alrededor de 100 pb): podría ser un gel de agarosa al 1,5% o incluso un gel de acrilamida.

**El hecho de que estos productos de PCR no hayan sido validados a nivel molecular es otro error llamativo del protocolo, que hace que cualquier prueba basada en él sea inútil como herramienta de diagnóstico específica para identificar el virus SARS-CoV-2.**

#### 5. Controles positivos y negativos para confirmar / refutar la detección de virus específicos.

La suposición no confirmada descrita en el artículo de Corman-Drosten es que el SARS-CoV-2 es el único virus del grupo del beta-coronavirus similar al SARS que actualmente causa infecciones en humanos. Las secuencias en las que se basa su método de PCR son secuencias in silico, suministradas por un laboratorio en China [23], debido a que en el momento de desarrollo de la prueba de PCR no había material de control de SARS-CoV- infeccioso (“vivo”) o inactivado. 2 estaba disponible para los autores. Por lo tanto, la prueba de PCR se diseñó utilizando la secuencia del conocido SARS-CoV como material de control para el componente Sarbeco (Dr. Meijer,

coautor del artículo Corman-Drosten en un intercambio de correo electrónico con el Dr. Peter Borger) [2].

Se supone que todas las personas que dan positivo en la prueba de RT-PCR, como se describe en el artículo de Corman-Drosten, son positivas para las infecciones por SARS-CoV-2. Hay tres fallas graves en su suposición. En primer lugar, una prueba positiva para las moléculas de ARN descritas en el artículo de Corman-Drosten no puede equipararse a una "infección por un virus". Una prueba de RT-PCR positiva simplemente indica la presencia de moléculas de ARN viral. Como se demostró en el punto 1d (anterior), **la prueba de Corman-Drosten no se diseñó para detectar el virus de longitud completa, sino solo un fragmento del virus. Ya llegamos a la conclusión de que esto clasifica la prueba como inadecuada como prueba de diagnóstico para las infecciones por el virus del SARS.**

En segundo lugar, y de gran relevancia, la funcionalidad de la prueba RT-PCR publicada no se demostró con el uso de un control positivo (ARN aislado del SARS-CoV-2), que es un estándar de oro científico esencial.

En tercer lugar, el artículo de Corman-Drosten afirma:

*“Para demostrar que los ensayos pueden detectar otros virus relacionados con el SARS asociados a murciélagos, utilizamos el ensayo del gen E para analizar seis muestras fecales derivadas de murciélagos disponibles en Drexler et al. [...] Und Muth et al. [...]. Estas muestras positivas al virus procedían de murciélagos rinolófidos europeos. La detección de estos valores atípicos filogenéticos dentro del clado CoV relacionado con el SARS sugiere que es probable que se detecten todos los virus asiáticos. Teóricamente, esto garantizaría una amplia sensibilidad incluso en el caso de múltiples adquisiciones independientes de virus variantes de un reservorio animal ”.*

**Esta declaración demuestra que el gen E utilizado en la prueba de RT-PCR, como se describe en el artículo de Corman-Drosten, no es específico del SARS-CoV-2.**

Los cebadores del gen E también detectan un amplio espectro de otros virus del SARS.

El genoma del coronavirus es el más grande de todos los virus de ARN que infectan a los humanos y todos tienen una estructura molecular muy similar. Aún así, el SARS-CoV1 y el SARS-CoV-2 tienen dos huellas genéticas altamente específicas, que los distinguen de los otros coronavirus. Primero, una secuencia de huellas dactilares única (KTFPPTEPKKDKKKK) está presente en la proteína N de SARS-CoV y SARS-CoV-2 [13,14,15]. En segundo lugar, tanto el SARS-CoV1 como el SARS-CoV2 no contienen la proteína HE, mientras que todos los demás coronavirus poseen este gen [13, 14]. **Por lo tanto, para detectar específicamente un producto de PCR de SARS-CoV1 y SARS-CoV-2, la región anterior en el gen N debería haber sido elegida como el objetivo de amplificación.** Una prueba de diagnóstico fiable debe centrarse en esta región específica del gen N como prueba de confirmación. **La PCR para este gen N no fue validada ni recomendada como gen de prueba por el artículo de Drosten-Corman, debido a que "no es tan sensible" con la sonda original del SARS-CoV [1].**

Además, la ausencia del gen HE tanto en el SARS-CoV1 como en el SARS-CoV-2 hace que este gen sea el control negativo ideal para excluir otros coronavirus. El papel de Corman-Drosten no contiene este control negativo, ni contiene ningún otro control negativo. **La prueba de PCR en el artículo de Corman-Drosten, por lo tanto, no contiene ni un control positivo único ni un control negativo para excluir la presencia de otros coronavirus. Este es otro defecto de diseño importante que clasifica la prueba como inadecuada para el diagnóstico.**

## **6. El procedimiento operativo estándar (POE) no está disponible**

Debe haber un procedimiento operativo estándar (POE) disponible, que especifique inequívocamente los parámetros anteriores, de modo que todos los laboratorios puedan establecer las mismas condiciones de prueba idénticas. Tener un POE universal validado es esencial,

porque facilita la comparación de datos dentro y entre países. **Es muy importante especificar todos los parámetros del cebador de forma inequívoca. Observamos que esto no se ha hecho.** Además, no se especifica el valor Ct para indicar cuándo una muestra debe considerarse positiva o negativa. Tampoco se especifica cuando una muestra se considera infectada con los virus del SARS-CoV. Como se muestra arriba, la prueba no puede discernir entre virus y fragmentos de virus, por lo que el valor Ct que indica positividad es de crucial importancia. Este valor Ct debería haber sido especificado en el Procedimiento Operativo Estándar (SOP) y puesto en línea para que todos los laboratorios que realizan esta prueba tengan exactamente las mismas condiciones de contorno. Señala a la ciencia defectuosa que tal POE no existe. Por lo tanto, los laboratorios son libres de realizar la prueba como lo consideren apropiado, lo que resulta en una enorme cantidad de variación. Los laboratorios de toda Europa se quedan con una multitud de preguntas; que cartillas pedir? ¿Qué nucleótidos llenar en los lugares indefinidos? ¿Qué valor de Tm elegir? ¿Cuántos ciclos de PCR se deben ejecutar? ¿A qué valor Ct es positiva la muestra? ¿Y cuándo es negativo? ¿Y cuántos genes probar? ¿Deben probarse todos los genes, o solo el gen E y RpRd como se muestra en la Tabla 2 del artículo de Corman-Drosten? ¿Debería probarse también el gen N? ¿Y cuál es su control negativo? ¿Cuál es su control positivo?

**El protocolo descrito es, lamentablemente, muy vago y erróneo en su diseño, por lo que uno puede ir en docenas de direcciones diferentes. No parece haber ninguna estandarización ni un POE, por lo que no está claro cómo se puede implementar esta prueba.**

## **7. Consecuencias de los errores descritos en 1-5: resultados falsos positivos.**

La prueba de RT-PCR descrita en el artículo de Corman-Drosten contiene tantos errores de diseño biológico molecular (ver 1-5) que no es posible obtener resultados inequívocos. Es inevitable que esta prueba genere una gran cantidad de los llamados "falsos positivos". La definición de falsos positivos es una muestra negativa, que inicialmente obtiene una puntuación positiva, pero que es negativa después de volver a realizar la prueba con la misma prueba. Los falsos positivos son resultados de prueba positivos erróneos, es decir, muestras negativas que dan positivo. Y esto es de hecho lo que se

encuentra en el artículo de Corman-Drosten. En la página 6 del PDF del manuscrito, los autores demuestran que, incluso en condiciones de laboratorio bien controladas, se genera un porcentaje considerable de falsos positivos con esta prueba:

*“En cuatro reacciones de prueba individuales, se observó una débil reactividad inicial, sin embargo, fueron negativas al volver a realizar la prueba con el mismo ensayo. Estas señales no se asociaron con ningún virus en particular, y para cada virus con el que se produjo una reactividad positiva inicial, hubo otras muestras que contenían el mismo virus en una concentración más alta pero que no dieron positivo. Dados los resultados de la amplia calificación técnica descrita anteriormente, se concluyó que esta reactividad inicial no se debió a la inestabilidad química de las sondas de PCR en tiempo real y muy probablemente a problemas de manejo causados por la rápida introducción de nuevas pruebas de diagnóstico y controles durante esta evaluación. estudiar.” [1]*

**La primera oración de este extracto es una clara evidencia de que la prueba de PCR descrita en el artículo de Corman-Drosten genera falsos positivos.** Incluso bajo las condiciones bien controladas del laboratorio Charité de última generación, 4 de 310 pruebas primarias son falsos positivos por definición. Cuatro muestras negativas inicialmente dieron positivo, luego fueron negativas al volver a realizar la prueba. Este es el ejemplo clásico de un falso positivo. En este caso los autores no los identifican como falsos positivos, lo cual es intelectualmente deshonesto.

Otra observación reveladora en el extracto anterior es que los autores explican los falsos positivos como "problemas de manejo causados por la rápida introducción de nuevas pruebas de diagnóstico". Imagine los laboratorios que tienen que introducir la prueba sin toda la información necesaria que normalmente se describe en un POE.

**8. El artículo de Corman-Drosten no fue revisado por pares.**

Antes de la publicación formal en una revista académica, los artículos científicos y médicos se certifican tradicionalmente mediante una "revisión por pares". En este proceso, los editores de la revista reciben el consejo de varios expertos ("árbitros") que han evaluado el artículo y pueden identificar debilidades en sus supuestos, métodos y conclusiones. Por lo general, una revista solo publicará un artículo una vez que los editores estén satisfechos de que los autores han abordado las preocupaciones de los árbitros y que los datos presentados respaldan las conclusiones extraídas en el artículo ". Este proceso también se describe en Eurosurveillance [16].

El artículo de Corman-Drosten se envió a Eurosurveillance el 21 de enero de 2020 y se aceptó para su publicación el 22 de enero de 2020. El 23 de enero de 2020 el artículo estaba en línea. El 13 de enero de 2020 se publicó la versión 1-0 del protocolo en el sitio web oficial de la OMS [17], actualizado el 17 de enero de 2020 como versión del documento 2-1 [18], incluso antes de que se publicara el artículo de Corman-Drosten el 23 de enero en Eurosurveillance.

Normalmente, la revisión por pares es un proceso que requiere mucho tiempo, ya que al menos dos expertos del campo tienen que leer y comentar críticamente el documento enviado. En nuestra opinión, este documento no fue revisado por pares. Veinticuatro horas simplemente no son suficientes para llevar a cabo una revisión exhaustiva por pares. Nuestra conclusión está respaldada por el hecho de que encontramos una gran cantidad de defectos de diseño muy graves, que hacen que la prueba de PCR sea completamente inadecuada como herramienta de diagnóstico para identificar el virus SARS-CoV-2. Cualquier biólogo molecular familiarizado con el diseño de RT-PCR habría observado fácilmente los graves errores presentes en el artículo de Corman-Drosten antes del proceso de revisión real. Le pedimos a Eurosurveillance el 26 de octubre de 2020 que nos enviara una copia del informe de revisión por pares. Hasta la fecha, no hemos recibido este informe y en una carta del 18 de noviembre de 2020, el ECDC como anfitrión de Eurosurveillance se negó a proporcionar acceso sin proporcionar razones científicas sustanciales para su decisión. Por el contrario, escriben que "la divulgación socavaría el propósito de las investigaciones científicas". [24].

## **9. Autores como editores**



Un último punto es de gran preocupación. Resulta que dos autores del artículo de Corman-Drosten, Christian Drosten y Chantal Reusken, también son miembros del consejo editorial de esta revista [19]. Por lo tanto, existe un grave conflicto de intereses que refuerza las sospechas de que el documento no fue revisado por pares. Parece que la publicación rápida fue posible simplemente porque los autores también formaban parte del consejo editorial de Eurosurveillance. Esta práctica se clasifica como comprometida con la integridad científica.

## **CATÁLOGO RESUMEN DE ERRORES ENCONTRADOS EN EL DOCUMENTO**

---

El documento de Corman-Drosten contiene los siguientes errores específicos:

1. No existe una razón específica para utilizar estas concentraciones extremadamente altas de cebadores en este protocolo. Las concentraciones descritas conducen a un aumento de las uniones inespecíficas y amplificaciones del producto de PCR, lo que hace que la prueba no sea adecuada como herramienta de diagnóstico específica para identificar el virus SARS-CoV-2.
2. Seis posiciones oscilantes no especificadas introducirán una enorme variabilidad en las implementaciones de laboratorio del mundo real de esta prueba; la descripción confusa e inespecífica en el documento de Corman-Drosten no es adecuada como protocolo operativo estándar, lo que hace que la prueba no sea adecuada como herramienta de diagnóstico específica para identificar el virus SARS-CoV-2.
3. La prueba no puede discriminar entre el virus completo y los fragmentos virales. Por lo tanto, la prueba no se puede utilizar como diagnóstico para virus intactos (infecciosos), lo que hace que la prueba no sea adecuada como herramienta de diagnóstico específica para identificar el virus SARS-CoV-2 y hacer inferencias sobre la presencia de una infección.
4. Una diferencia de 10 ° C con respecto a la temperatura de hibridación  $T_m$  para el par de cebadores1 (RdRp\_SARSr\_F y RdRp\_SARSr\_R) también hace que la prueba no sea adecuada como

herramienta de diagnóstico específica para identificar el virus SARS-CoV-2.

5. Un error grave es la omisión de un valor Ct en el que una muestra se considera positiva y negativa. Este valor Ct tampoco se encuentra en las presentaciones de seguimiento, lo que hace que la prueba no sea adecuada como una herramienta de diagnóstico específica para identificar el virus SARS-CoV-2.

6. Los productos de PCR no se han validado a nivel molecular. Este hecho hace que el protocolo sea inútil como herramienta de diagnóstico específica para identificar el virus SARS-CoV-2.

7. La prueba de PCR no contiene un control positivo único para evaluar su especificidad para el SARS-CoV-2 ni un control negativo para excluir la presencia de otros coronavirus, lo que hace que la prueba no sea adecuada como herramienta de diagnóstico específica para identificar el SARS-CoV-2. virus.

8. El diseño de prueba en el documento de Corman-Drosten es tan vago y defectuoso que uno puede ir en docenas de direcciones diferentes; nada está estandarizado y no hay POE. Esto cuestiona en gran medida la validez científica de la prueba y la hace inadecuada como herramienta de diagnóstico específica para identificar el virus SARS-CoV-2.

9. Lo más probable es que el artículo de Corman-Drosten no haya sido revisado por pares, lo que hace que la prueba no sea adecuada como herramienta de diagnóstico específica para identificar el virus SARS-CoV-2.

10. Encontramos graves conflictos de interés para al menos cuatro autores, además de que dos de los autores del artículo de Corman-Drosten (Christian Drosten y Chantal Reusken) son miembros del consejo editorial de Eurosurveillance. Se agregó un conflicto de intereses el 29 de julio de 2020 (Olfert Landt es CEO de TIB-Molbiol; Marco Kaiser es investigador senior en GenExpress y se desempeña como asesor científico de TIB-Molbiol), que no se declaró en la versión original (y aún lo es falta en la versión de PubMed); TIB-Molbiol es la empresa que fue “la primera” en producir kits de PCR (Light Mix) basados en el protocolo publicado en el manuscrito de

Corman-Drosten, y según sus propias palabras, distribuyeron estos kits de prueba de PCR antes de que se publicara la publicación. incluso presentado [20]; Además, Victor Corman y Christian Drosten no mencionó su segunda afiliación: el laboratorio de pruebas comerciales "Labor Berlin". Ambos son responsables del diagnóstico de virus allí [21] y la empresa opera en el ámbito de las pruebas de PCR en tiempo real.

**A la luz de nuestro reexamen del protocolo de prueba para identificar el SARS-CoV-2 descrito en el documento de Corman-Drosten, hemos identificado errores y falacias inherentes que hacen que la prueba de PCR del SARS-CoV-2 sea inútil.**

## CONCLUSIÓN

---

La decisión sobre qué protocolos de prueba se publican y se ponen a disposición de todos está directamente en manos de Eurosurveillance. La decisión de reconocer los errores aparentes en el artículo de Corman-Drosten tiene el beneficio de minimizar en gran medida el costo humano y el sufrimiento en el futuro.

¿No le conviene a Eurosurveillance retractarse de este documento? Nuestra conclusión es clara. A la vista de todos los tremendos defectos y errores de diseño del protocolo de PCR descritos aquí, concluimos: No queda mucha elección en el marco de la integridad y la responsabilidad científicas.

## REFERENCIAS

---

[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. Detección del nuevo coronavirus de 2019 (2019-nCoV) mediante RT-PCR en tiempo real. Euro Surveill. 2020; 25 (3): pii = 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

[2] Comunicación por correo electrónico entre el Dr. Peter Borger y el Dr. Adam Meijer: [Material complementario](#)

[3] Jafaar et al., Correlación entre 3790 muestras positivas de reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa y cultivos celulares positivos, incluidos 1941 aislados de

coronavirus 2 de síndrome respiratorio agudo severo. <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa1491/5912603>

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

[5] Google Analytics: muertes por COVID19 en todo el mundo: <https://bit.ly/3fndemJ>  
Archivo: <https://archive.is/PpqEE>

[6] Pruebas de laboratorio para COVID-19 Emergency Response Technical Center, NIVD under China CDC 15 de marzo de 2020: <http://www.chinacdc.cn/en/COVID19/202003/P020200323390321297894.pdf>

[7] Manual de PCR en tiempo real Life Technologies: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>

Nolan T, Huggett J, Sanchez E. Guía de buenas prácticas para la aplicación de PCR cuantitativa (qPCR) Primera edición 2013

[8] Trestan Pillonel et al, Carta al editor: detección de SARS-CoV-2 por RT-PCR en tiempo real: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7268274/>

[9] Kurkela, Satu y David WG Brown. "Técnicas de diagnóstico molecular". Medicina 38.10 (2009): 535-540.

[10] Wolfel et al., Evaluación virológica de pacientes hospitalizados con COVID-2019 <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x>

[11] Herramienta web Thermofischer Primer Dimer: <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>

### Material complementario

[12] Primer-BLAST, NCBI - Centro Nacional de Información Biotecnológica: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

[13] Marra MA, Steven MJ, Caroline RA, Robert AH, Angela BW y col. (2003) Ciencia. La secuencia del genoma del coronavirus asociado al SARS. Science 300 (5624): 1399-1404.

[14] Aislamiento del coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo Wuhan-Hu-1,  
genoma completo : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947>

[15] Borger P. Se esperaba un coronavirus similar al SARS, pero no se hizo nada para estar preparado. 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) ;  
Archivo: <https://archive.is/i76Hu>

[16] Proceso de evaluación / revisión del documento de  
Eurosurveillance: <https://www.eurosurveillance.org/evaluation>

[17] Recomendación oficial del protocolo y manuscrito Corman-Drosten de la OMS,  
publicado el 13 de enero de 2020 como versión 1.0 del documento:  
<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-ensayo-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf> ; archivo: <https://bit.ly/3m3jXVH>

[18] Recomendación oficial de la OMS para el protocolo Corman / Drosten RT-qPCR,  
que  
deriva directamente de la publicación Eurosurveillance, versión del documento 2-1,  
publicada el  
17 de enero de 2020: [https://www.who.int/docs/fuente-predeterminada/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c\\_2](https://www.who.int/docs/fuente-predeterminada/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2)

[19] Comité editorial de Eurosurveillance,  
2020: <https://www.eurosurveillance.org/upload/site-assets/imgs/2020-09-Editorial%20Board%20PDF.pdf> ;  
Archivo: <https://bit.ly/2TqXBjX>

[20] Instrucciones de uso LightMix SarbecoV E-gene plus EAV Control, TIB-Molbiol & Roche  
Molecular Solutions, 11 de enero de 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)  
Archivo, marca de tiempo - 11 de enero de 2020: <https://archive.is/Vulo5> ;  
Archivo: <https://bit.ly/3fm9bXH>

[21] Christian Drosten y Victor Corman, responsables del diagnóstico viral en Labor Berlin:  
<https://www.laborberlin.com/fachbereiche/virologie/>  
Archivo: <https://archive.is/CDEUG>

[22] Tom Jefferson, Elizabeth Spencer, Jon Brassey, Carl Heneghan Cultivos virales para la evaluación  
de la infectividad de COVID- 19. Revisión sistemática. Revisión sistemática doi:  
<https://doi.org/10.1101/2020.08.04.20167932> <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.08.04.20167932v4>

[23] Kim et al., The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420304062>

[24] Respuesta del ECDC al Dr. Peter Borger, 18 de noviembre de 2020:  
[Material suplementario](#)

[25] Prof. Dr. Ulrike Kämmerer y equipo, encuesta y tabla Primer-BLAST:  
[Material complementario](#)

Bibliografía **adicional**: Descripción RT-PCR RKI Alemania, en la página 10 de este enlace:  
[https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBE/DownloadsJ/JoHM\\_S5\\_2020\\_Studienprotokoll\\_CORONA\\_MONITORING\\_lokal.pdf?blobile](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBE/DownloadsJ/JoHM_S5_2020_Studienprotokoll_CORONA_MONITORING_lokal.pdf?blobile)

## **Afiliaciones del autor :**

---

1) **Dr. Pieter Borger** (MSc, PhD), Genética Molecular, W + W Research Associate, Lörrach, Alemania

2) **Rajesh Kumar Malhotra** (Alias de artista: **Bobby Rajesh Malhotra** ), ex artista 3D / Visualizaciones científicas en CeMM - Centro de Medicina Molecular de la Academia de Ciencias de Austria (2019-2020), Universidad de Artes Aplicadas - Departamento de Artes Digitales de Viena, Austria

3) **Dr. Michael Yeadon** BS (Hons) Biochem Tox U Surrey, PhD Farmacología U Surrey. Director General, Yeadon Consulting Ltd, ex Científico Jefe de Pfizer, Reino Unido

4) **Dr. Clare Craig** MA, (Cantab) BM, BCh (Oxon), FRCPath, Reino Unido

5) **Kevin McKernan** , BS Emory University, director científico, fundador de Medical Genomics, diseñó el proceso de secuenciación en WIBR / MIT para el Proyecto del Genoma Humano, inventó y desarrolló el secuenciador SOLiD, obtuvo patentes relacionadas con PCR, aislamiento y secuenciación de ADN, EE. UU.

6) **Prof.Dr. Klaus Steger** , Departamento de Urología, Urología y Andrología Pediátrica, Andrología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de la Universidad Justus Liebig, Giessen, Alemania

7) **Dr. Paul McSheehy** (BSc, PhD), bioquímico y farmacólogo industrial, Loerrach, Alemania

- 8) **Dra. Lidiya Angelova** , MSc en Biología, PhD en Microbiología, Ex investigadora del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID), Maryland, EE. UU.
- 9) **Dr. Fabio Franchi** , Ex Dirigente Medico (MD) en un Pabellón de Enfermedades Infecciosas, especializado en “Enfermedades Infecciosas” y “Higiene y Medicina Preventiva”, Società Scientifica per il Principio di Precauzione (SSPP), Italia
- 10) Dr. med. Thomas Binder, internista y cardiólogo (FMH), Suiza
- 11) Prof.Dr. med. Henrik Ullrich, especialista en Radiología diagnóstica, Médico Jefe del Centro de Radiología del Hospital Collm Oschatz, Alemania
- 12) **Prof.Dr. Makoto Ohashi** , Profesor emérito, PhD en Microbiología e Inmunología, Universidad de Tokushima, Japón
- 13) Dr. Stefano Scoglio, B.Sc. Ph.D., microbiólogo, nutricionista, Italia
- 14) Dr. Marjolein Doesburg-van Kleffens (MSc, PhD), especialista en Medicina de laboratorio (química clínica), Maasziekenhuis Pantein, Beugen, Países Bajos
- 15) Dra. Dorothea Gilbert (MSc, PhD), PhD Química Ambiental y Toxicología. Servicios de consultoría DGI, Oslo, Noruega
- 16) Dr. Rainer J. Klement, PhD. Departamento de Oncología Radioterápica, Hospital Leopoldina Schweinfurt, Alemania
- 17) Dra. Ruth Schrufer, PhD, genética / inmunología humana, Munich, Alemania,
- 18) Dra. Berber W. Pieksma, médico general, Países Bajos
- 19) Dr. med. Jan Bonte (GJ), neurólogo consultor, Países Bajos
- 20) Dr. Bruno H. Dalle Carbonare (biólogo molecular), especialista en PI, BDC Basel, Suiza
- 21) **Dr. Kevin P. Corbett** , MSc Nursing (Kings College London) PhD (London South Bank) Ciencias sociales (Estudios de ciencia y tecnología) Londres, Inglaterra, Reino Unido
- 22) Prof.Dr. Ulrike Kämmerer, especialista en Virología / Inmunología / Biología Humana / Biología Celular, Hospital Universitario de Würzburg, Alemania

## **Contribuciones del autor:**

PB: Planifiqué y realicé los análisis y la investigación, conceptualizando el manuscrito.

BRM: Planificó y realizó la investigación, conceptualizando las figuras y el manuscrito.

MY: Realizó los análisis y la investigación.

KMcK: Realizó los análisis y la investigación, conceptualizó el manuscrito.

KS: Realizó los análisis y la investigación.

PMcS: Revisión de los análisis e investigaciones.

LA: Revisión de los análisis y la investigación.

FF: Revisión de los análisis e investigaciones.

TB: Revisión de los análisis e investigaciones.

HU: Revisión de los análisis e investigaciones.

MO: Revisión de los análisis e investigaciones.

SS: Revisión de los análisis e investigaciones.

MDvK: Revisión de los análisis e investigaciones.

DG: Revisión de los análisis e investigaciones.

RJK: Revisión de los análisis e investigaciones.

RS: Revisión de los análisis e investigaciones y del manuscrito.

BWK: Revisión de los análisis e investigaciones.

RvV: Revisión de los análisis e investigaciones.

JB: Revisión de análisis e investigación.

KC: Revisión de los análisis e investigaciones.

Reino Unido: planificó y realizó los análisis y la investigación, conceptualizando el manuscrito.



## **Lectores de pruebas adicionales:**

Saji N Hameed, Informática Ambiental, Universidad de Aizu, Tsuruga, Ikki-machi, Aizuwakamatsu-shi, Fukushima, Japón

Howard R. Steen, MA Chem. Ing. Cantab, ex director de investigación, Alemania

próximo "