

**Bewertung der Eignung der RT-qPCR Technik zum
Nachweis einer möglichen Infektion und
Infektiosität von Personen bezüglich SARS-CoV-2**

Gutachten

Kämmerer, Ulrike

Präfix

Die **Polymerase-Chain-Reaktion** (Polymerase Kettenreaktion; PCR) ist eine phantastische molekulare Methode, mit der sich im Labor winzigste Spuren einer gesuchten Nukleinsäure (DNA oder RNA, je nach Variante der PCR) nachweisen lassen. Diese macht die Technik zu einer wertvollen Hilfe in der Analyse von Genmustern in kleinsten Proben in der Forschung aber auch in der Routinediagnostik wie bei der forensischen Spurensicherung, der Kontaminationsüberwachung großer Chargen von Lebensmitteln und Getränken, der Spurensuche nach nicht zugelassenen Tierarten z.B. in Fleisch/Wurstprodukten (Stichwort Pferdefleisch im Hackfleisch) oder der Überwachung von Blutprodukten auf virale Genome von HIV und Hepatitis-Viren.

Diese extreme Sensitivität macht die Technik allerdings auch sehr anfällig für Kontaminationen (s. „Phantom von Heilbronn unter Punkt 3.5) oder Überinterpretationen von Ergebnissen, wenn die PCR ohne weiteren Zusammenhang als alleiniges Kriterium herangezogen wird. So kann man eine gefundene Gensignatur einer gesuchten Person an einem Tatort nur als Indiz werten und damit weder sicher nachweisen, dass die Person dort persönlich anwesend war, noch ob die gefundene Genspur von einem Lebenden oder Toten stammt. Zum Vergleich: der Gennachweise mittels PCR ist so sensitiv, wie wenn ein Alkoholmeßgerät noch 0,0000000008-Promille Alkohol im Blut nachweisen könnte und als „alkoholisiert“ ausgeben und damit einen Autofahrer bei einer Kontrolle in Bedrängnis bringen würde, obwohl er keinen Tropfen Alkohol konsumiert und auch keinerlei Anzeichen für Alkoholkonsum hat.

Die Technik der PCR (auch RT-PCR oder RT-qPCR) kann unabhängig von der extremen Sensitivität jedoch immer nur das gesuchte Genstückchen vervielfältigen und nachweisen, ob dieses jedoch aus einem lebensfähigen oder vermehrungsfähigen Organismus stammt, kann mit der Technik nicht geklärt werden.

Die in der SARS-CoV-2 Fallsuche verwendete **Reverse-Transkriptase-quantitative Polymerase Chain Reaktion (RT-qPCR)** ist eine Variante der PCR, in der das Ausgangsmaterial RNA erst in DNA umgeschrieben um dann in der PCR so vervielfältigt zu werden, dass in jeder Kopierrunde Lichtsignale einen Rückschluss auf die Menge der verdoppelten Genome geben.

Als alleiniges Instrument der Diagnostik einer aktiven Infektion oder gar Infektiosität mit SARS-CoV-2 ist diese molekulare Technik aus zahlreichen Gründen bereits im Ansatz für eine Massentestung ungeeignet. Mittels der PCR Technik kann allerdings bei vorbestehender Symptomatik eine Differentialdiagnose unterstützt werden, indem die Gensignatur eines möglichen Erregers detektierbar wird, die dann durch den Kliniker mit den Symptomen des Patienten in Einklage gebracht werden kann. Jedoch darf und kann eine PCR nie alleiniges Diagnostikum einer möglichen Erkrankung sein.

In der Diskussion um die Eignung der RT-qPCR für die Identifizierung von Covid-19-Patienten wird häufig ein positiver PCR Test bei einer symptomfreien gesunden Person dazu verwendet, diese Person als „asymptomatischer Patient“ zu bezeichnen. Nach allgemein gültigen Begriffsdefinitionen ist eine Person ohne klinische Symptome ("asymptomatisch") jedoch weder infiziert noch ein Patient, siehe hierzu ANNEX 1 (Begriffsdefinitionen) und Punkte 1.5 und 1.6.

Gliederung:

1. Definition wichtiger Begriffe

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

2. Grundsätzliches zur diagnostischen Aussagekraft hinsichtlich der Frage „Infektiosität“

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

- A) Schweizer Amt für Bevölkerungsschutz (Labor Spiez) *Seite 8*
- B) Dr. Antony Fauci (Chief Medical Advisor to the US President, Head of the US National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) *Seite 8*
- C) Prof. Marion Koopmanns (Leitung Institut für Virologie, Erasmus University und beratende Expertin der WHO) *Seite 9*
- D) Schwedisches Gesundheitsministerium *Seite 10*
- E) National Centre for Infectious Disease in Singapore *Seite 11*
- F) Nature-Publikationen Wölfel R zu den ersten Fällen in Deutschland *Seite 11*
- G) Nature Reviews Arbeit von Isabella Eckerle (Genf) *Seite 12*

2.2. Die Aufbereitung der Proben schließt den Nachweis replikationsfähiger Viren aus *Seite 13*

2.3. Zwischenfazit *Seite 14*

2.4. Abbildung zur Übersicht der Diagnostikmethoden RT-qPCR, Antigen-Schnelltest und Virusisolation in Zellkultur *Seite 16*

3. Einflussfaktoren auf die Zuverlässigkeit des PCR Test *Seite 20*

3.1. Design der PCR und Spezifität *Seite 17*

3.2. Anzahl der unabhängigen Zielgene ("Targets") *Seite 18*

3.3. Anzahl der durchgeführten Zyklen (CT-Wert) *Seite 20*

3.3.1 Bedeutung des CT-Wertes

3.3.2 Belege für die Relevanz des CT-Wertes

3.3.3 Zwischenfazit

3.4. Adäquate Kontrollen *Seite 29*

3.4.1 Bereitstellung adäquater Kontrollen *Seite 30*

3.4.2 Ringversuche: Auffälligkeiten beim ersten Ansatz *Seite 31*

3.5. Ausschluss von Kontaminationen von Reagenzien und „Problemen im Handlungsablauf“. *Seite 32*

3.5.1 Kontamination innerhalb des Labors durch Fehler in der Durchführung *Seite 32*

3.5.2 Kontamination der Materialien/Reagenzien ab Hersteller *Seite 34*

3.5.3 Zwischenfazit *Seite 34*

3.6. Kommerzielle PCR Testkits *Seite 34*

4. Zusammenhang positiver Nukleinsäure-Nachweis in der RT-qPCR mit Erkrankung und Infektiosität *Seite 36*

5. Fazit und Zusammenfassung *Seite 39*

6. Anhänge

ANNEX 1: Definition von "Infektion" und "Patient"

ANNEX 2: PCR Beschreibung des Schweizer Amtes für Bevölkerungsschutz (Labor Spiez)

ANNEX 3: Graphische Darstellung der CT-Werte in Verhältnis zur Anzahl der Ausgangsgenome am Beispiel des Viasure Testkits

ANNEX 4: Hochrangig publizierte Übersichtsarbeit zur Wertung der verschiedenen Diagnostikverfahren von Isabella Eckerle, Nature Reviews Microbiology vom 02.12.2022 mit Hervorhebungen in gelb

ANNEX 5: Retraction Letter Science

1. Definition und Beschreibung wichtiger Begriffe

1.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In einer **Polymerasekettenreaktion (PCR)** wird mithilfe des Enzyms Polymerase ein definiertes kurzes (**üblicherweise 100-1000 Basen** umfassendes) Stück der Desoxyribonukleinsäure (DNA) vervielfältigt. Das zu vervielfältigende DNA-Stück wird mithilfe von zwei sehr kurzen einzelsträngigen DNA-Abschnitten, den „Primern“, eingegrenzt.

Diese **Primer** bestehen üblicherweise aus einer definierten Abfolge von 18-25 Nukleinsäurebasen (die Primersequenz), welche spezifisch zu den Regionen auf der DNA passen, welche den zu vervielfältigenden Abschnitt flankieren. Um die Spezifität der PCR sicherzustellen, dürfen diese Primer explizit nur zu diesem flankierenden Bereich und zu keinem weiteren Bereich einer DNA passen. Mithilfe großer Gendatenbanken und entsprechender Software-Programme (z.B. Primer-Blast <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) können im PCR-Design diese Primer hochspezifisch entworfen werden. Bei spezialisierten Firmen werden aus den eingesendeten Primer-Sequenzen dann die Molekülketten synthetisiert und an das PCR-Labor bzw. den Hersteller von PCR-Kits ausgeliefert. Hier müssen diese Primer dann mit validen positiven und negativen Kontrollen unter verschiedensten Versuchsbedingungen erprobt und im Einsatz optimiert werden. So wird sichergestellt, dass mit dem verwendeten Primerpaar ausschließlich die zu suchende DNA erkannt und vervielfältigt wird, aber keinerlei andere ähnliche DNA-Abschnitte.

Sind die Primer gefunden und spezifisch, kann in einem Reaktionsansatz die zu vervielfältigende DNA mit dem Primerpaar, verschiedenen Hilfschemikalien sowie dem Enzym Polymerase gemischt und die Kettenreaktion gestartet werden.

Ablauf der PCR: Diese läuft in zyklischen Wiederholungen der folgenden einzelnen Schritte ab:

1. Das Gemisch wird bei über 90°C aufgeköcht (denaturiert). Hierdurch werden die üblicherweise als Doppelstrang vorliegenden DNA-Stränge in Einzelstränge getrennt, um die spätere Anheftung der Primer zu ermöglichen.

2. Beim folgenden Abkühlen auf die sogenannte „**Annealing-Temperatur**“ können sich die Primer an ihre passenden Regionen an den aufgetrennten DNA-Strängen anheften. Die Bindung der Primer, das Annealing, erfolgt nur in einem eng begrenzten Temperaturbereich, der sog. Schmelztemperatur. Diese hängt vor allem von der Basenzusammensetzung der Primer ab und daher wird deren Sequenz im Idealfall immer so gewählt werden, dass beide Primer die gleiche Schmelztemperatur von ca. 60°C besitzen. Die angehefteten Primer bilden den Startpunkt für die Polymerase.

3. Diese Polymerase ergänzt von den Primern ausgehend die durch das Erhitzen vorliegende einzelsträngige DNA wieder zu einem passenden Doppelstrang (**Elongation**) meist bei ca. 72°C.

Durch die Lage der beiden Primer an den flankierenden Seiten des gesuchten DNA-Abschnittes sind an den Einzelsträngen die Elongationsreaktionen gegenläufig, da die Polymerase immer nur in eine Richtung arbeitet. Am Ende dieses Schrittes sind aus einer ursprünglichen doppelsträngigen DNA nun zwei identische doppelsträngige DNA-Moleküle entstanden, welche durch Aufkochen wieder getrennt, dann mithilfe der Primeranlagerung und der Polymerase in vier identische DNA-Moleküle vervielfältigt werden usw.

Jeder PCR-Zyklus aus Aufkochen-Annealing-Elongation bewirkt eine Verdopplung des gesuchten DNA-Abschnittes, so dass die Vervielfältigung im 2-er Logarithmus erfolgt und somit sehr schnell eine extrem hohe Anzahl von Kopien des ursprünglichen Ausgangsmaterials vorliegt.

So werden aus einem DNA-Strang nach 10 PCR Zyklen bereits $2^{10} = 1.024$ DNA-Kopien, bei 20 Zyklen schon über 1 Million (1.048.576) und bei 30 Zyklen über 1 Milliarde (1.073.741.824) Kopien.

1.2. Quantitative PCR (qPCR)

Bei der **quantitativen PCR (qPCR)** Technik, wie sie derzeit weltweit hauptsächlich zum Nachweis der genomischen RNA von SARS-CoV-2 eingesetzt wird, nutzt man ein drittes kurzes DNA Stück, ähnlich der beiden Primer, welches mittig in dem gesuchten DNA-Abschnitt passend binden kann, die „**Probe**“ (**Sonde**). Anders als die beiden Primer ist diese Sonde noch mit zwei Molekülen verbunden, einem Fluoreszenzfarbstoff an einem Ende und einem weiteren Molekül (Quencher), welches das Aussenden der Fluoreszenz verhindern kann, solange sich beide gleichzeitig (also in unmittelbarer Nähe zueinander) an der Probe befinden. Beim Elongationsschritt baut die Polymerase nun diese Sonde ab. Dadurch wird der Quencher abgetrennt und das Fluoreszenzmolekül kann nun sein Farbsignal aussenden. Dieses Farbsignal wird im PCR-durchführenden Gerät (Thermozykler) erfasst und gemessen. Bei jedem PCR-Zyklus werden also entsprechend der steigenden Anzahl der Kopien immer mehr Fluoreszenzsignale frei, die Sonde „leuchtet“ immer stärker. Und die Kurve der Farbsignalintensität steigt mit jedem Zyklus. Ab einem bestimmten Wert übersteigt die Kurve dann das Hintergrundrauschen (Schwellenwert) und wird als positiv gewertet. Die Zykluszahl, bei welcher dieses Überschreiten des Schwellenwertes erfolgt, wird als **CT-Wert** bezeichnet (CT steht dabei für „Cycle Threshold“ = Zyklusschwelle).

Je schneller die Fluoreszenz über den gesetzten Schwellenwert ansteigt (niedriger CT), umso mehr Ausgangskopien der gesuchten DNA waren im PCR Ansatz vorhanden. Da weder die Primer, noch das Enzym Polymerase immer 100% spezifisch arbeiten, wird in jedem PCR-

Ansatz auch ein Bruchteil unspezifische DNA mitkopiert. Und je mehr Zyklen die PCR durchläuft, umso größer ist die Gefahr, dass auch diese wenigen unspezifischen Reaktionen dann doch den Schwellenwert überschreiten. Ab einem CT-Wert von 40 ist daher mit größter Wahrscheinlichkeit von einem falsch positiven Signal aufgrund unspezifischer Ausgangsmaterialien auszugehen. Eine zuverlässige PCR sollte daher nicht mehr als 30-35 Zyklen benötigen, um ein deutliches Signal „positiv“ zu generieren, im Falle aktiver Infektionen mit gesuchten Viren ist von einer ausreichenden Zykluszahl von 25-30 auszugehen (siehe auch Punkt 3.2.).

1.3. Reverse Transkriptase (RT) Reaktion

Die **Reverse Transkriptase Reaktion (RT)** wird benötigt, wenn die zu vervielfältigende Ausgangsnukleinsäure nicht als DNA, sondern als Ribonukleinsäure (RNA) vorliegt, wie dies bei SARS-CoV-2 als RNA-Virus der Fall ist. Da in der PCR ausschließlich DNA vervielfältigt werden kann, muss eine RNA vorher in DNA überführt werden. Dies geschieht mithilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“, welche aus RNA einen komplementären Kopierstrang aus DNA erstellt, welcher dann als Ausgangsmaterial für die PCR dient.

Um die Zuverlässigkeit eines mittels RT-qPCR oder auch nur PCR erzielten Ergebnisses werten zu können, werden mithilfe von definierten Proben verdünnter korrekter Zielgene (z.B. RNA des gesuchten Virus) und sehr ähnlicher, aber nicht gesuchter Zielgene (z.B. naheverwandte Viren) die Sensitivität und die Spezifität des verwendeten Testsystems bewertet.

1.4. Sensitivität und Spezifität

Die **Sensitivität** gibt im Falle der PCR (in allen Variationen) an, wie empfindlich der Test auch noch kleinste Mengen des gesuchten Zielgens nachweise kann, die **Spezifität** beschreibt, wie zuverlässig der Test ausschließt, dass andere, naheverwandte Gene, auch zu einem positiven Ergebnis (**falsch positiv**) führen. Je höher die Spezifität, umso sicherer ist auszuschließen, dass durch das PCR System selber falsch positive Ergebnisse erzielt werden.

Hiervon unbenommen sind allerdings noch **falsch positive Ereignisse**, welche durch **Laborkontaminationen** mit Zielgenen, **Verunreinigungen von Testchemikalien** und **Kontaminationen direkt bei der Probenentnahme** entstehen können. Diese kontaminationsbedingten falsch positiven Ergebnisse können durch rigorose Qualitätssicherung und „Standard Operating Procedures“ (SOPs), dem Einsatz von speziell geschultem Fachpersonal sowie permanente externe Kontrolle in Form von Ringversuchen ausgeschlossen oder zumindest stark minimiert werden.

1.5. Infektion

Eine Infektion ist definiert als eine Situation, in der mindestens die folgenden drei Aspekte zusammen auftreten:

- Eindringen von Mikroorganismen (Keimen) wie Bakterien oder Viren in den Körper
- Diese eingedrungenen Mikroorganismen vermehren sich im Körper
- Und der Körper reagiert auf sie (Symptome)

Die Symptome einer Infektion mit dem SARS-CoV-2-Virus umfassen nach Angaben der CDC (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>)

- Fieber oder Schüttelfrost
- Husten
- Kurzatmigkeit oder Atembeschwerden
- Müdigkeit
- Muskel- oder Körperschmerzen
- Kopfschmerzen
- Neuer Verlust von Geschmack oder Geruch
- Halsschmerzen
- Verstopfte oder laufende Nase
- Übelkeit und/oder Erbrechen
- Diarrhöe

Weitere Quellenbeschreibungen für die allgemein gültige Definition des Begriffs "Infektion" siehe **ANNEX 1**

1.6. Patient

Ein Patient ist per Definitionem eine Person, die von professionellen Gesundheitsdienstleistern betreut wird, die Symptome von Krankheiten oder Verletzungen aufweist oder andere Einschränkungen der vollständigen Gesundheit zeigt.

Nach der Definition kann also eine gesunde "symptomlose" Person ohne medizinische Probleme nicht als "Patient" bezeichnet werden. Weitere Quellenbeschreibungen zu dieser allgemein gültigen Definition des Begriffs "Patient" siehe **ANNEX 1**

2. Grundsätzliches zur diagnostischen Aussagekraft hinsichtlich der Frage „Infektiosität“

Der Erfinder des PCR-Tests, der im August 2019 verstorbene Nobelpreisträger Kary Mullis, hat immer wieder darauf hingewiesen, dass sein Test allein dazu geeignet ist, ein ansonsten für das menschliche Auge unsichtbares Molekül (die Desoxyribonukleinsäure, DNA) oder Fragment der DNA durch Vervielfältigung (Amplifikation) sichtbar zu machen. Nicht aber, eine Aussage dazu zuzulassen, ob das, was sichtbar gemacht wurde, gefährlich ist oder krank macht.

Insbesondere kann ein PCR Test – auch wenn er korrekt durchgeführt wird - keinerlei Aussage dazu treffen, ob eine Person mit einem aktiven Erreger infiziert ist oder nicht. Denn der Test kann nicht unterscheiden zwischen „toter“ Materie*, wie zum Beispiel einem völlig harmlosen Genomfragment als Überbleibsel des Kampfes des körpereigenen Immunsystems gegen eine Erkältung oder eine Grippe (solche Genom-Fragmente finden sich noch viele Monate nachdem das Immunsystem das Problem „erledigt“ hat), und „lebender“ Materie, d.h. einem „frischen“, reproduktionsfähigen Virus.

* So wird die PCR beispielsweise auch in der Forensik eingesetzt, um aus Haarresten oder anderen Spurenmaterialien mittels PCR vorhandene Rest-DNA so zu vervielfältigen, dass die genetische Herkunft des/der Täter(s) erkennbar ist („Genetischer Fingerabdruck“).

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

A) Explizit wird auf dem Infoblatt des Schweizer Bundesamt für Bevölkerungsschutz BABS Labor Spiez wie folgt der Nachteil der PCR aufgeführt: „*Es können nur Erreger nachgewiesen werden, deren Gen-Sequenz bekannt ist. Ob ein Erreger infektiös (virulent, «lebendig») ist oder nicht bleibt unbekannt.*“

Die Originalseite ist zwischenzeitlich nicht mehr auffindbar, aber im Webarchiv (https://web.archive.org/web/20210706132230/https://www.labor-spiez.ch/pdf/de/dok/pos/88_021_Plakate_PCR_d.pdf) weiterhin verfügbar.

Das Dokument ist als **ANNEX 2** angefügt.

B) Eine entscheidende Aussage über die Eignung des PCR-Tests als Parameter für das Übertragungsrisiko von Infektionskrankheiten machte Antony Fauci, führender "Seuchenexperte und Regierungsberater" in den USA, in einer MSNBC-Sendung vom 30.12.2021 (der Rachel Maddow Show) (Washington DC 9:04 PM; <https://www.youtube.com/watch?v=bAICMQ1D5F8>; Ab Minute 6:35)

Frage des Reporters:

"...ist ein PCR-Test auch kein guter Parameter für die Übertragbarkeit und Isolierung? Wie kann man eigentlich feststellen, ob man in dem Zyklus, in dem man Covid hat, ansteckend ist? Wie kann man das messen, wenn nicht mit einem PCR-Test oder einem Antigentest?"

Dr. Fauci

"Ja, das ist eine sehr gute Frage, **denn die PCR misst nicht das replikationsfähige Virus,** sondern die Viruspartikel, die Nukleinsäure. Mit anderen Worten: Ich könnte infiziert sein, das replikationskompetente Virus aus mir entfernt haben, aber **ich kann noch mehrere Tage nach meiner Genesung PCR-positiv sein und überhaupt nicht mehr übertragbar sein.** Eine PCR ist also gut, um festzustellen, ob man infiziert ist - wenn ich infiziert bin, ja, ich bin infiziert, aber die Tatsache, dass sie positiv ist - der CDC-Direktor sagte, dass sie mehrere Tage und sogar Wochen später **keinen Hinweis darauf gibt, ob man übertragbar ist oder nicht.** Und ich denke, das ist die verständliche Verwirrung, die die Leute bei Tests haben. Tests sagen aus, ob man infiziert ist oder nicht, und nicht, ob man infiziert und übertragbar ist. **Der einzige Weg, um festzustellen, ob eine Infektion übertragbar ist, besteht darin, nachzuweisen, dass der Virus in einem lebt und sich vermehrt, und der Test misst das nicht.** (7:38) Er misst das Vorhandensein oder die Abwesenheit des Virus, und das Virus kann ein totes, inaktives Virus sein, das nicht übertragbar ist."

Im Original:

Question of Reporter:

"...is a PCR test not a good parameter either for transmissibility and isolation? How can people actually tell if they are contagious in the cycle of having covid? How do you measure that if not with either a PCR test or an antigen test?"

Dr. Fauci

"Yes, that is a very good question **because PCR doesn't measure replication competent virus** it measures viral particles, nucleic acid. So in other words I could be infected, have cleared the replication competent virus from me but **I can continue to be positive with the PCR for several days after recovering and not being transmissible at all.** So a PCR is good to tell you if you are infected - if I am infected yes I am infected but the very fact that it is positive - the CDC director said for several days and even weeks later **it doesn't give you any indication of whether or not you are transmissible.**

And I think that's the understandable confusion that people have about testing. Testing say whether you are infected or not versus are you infected plus transmissible.

The only way you can tell if it is transmissible if you can show that there really is life replication virus in you and the test don't measure that (7:38) They measure the presence or absence of the virus and the virus can be dead inactive virus that doesn't transmit"

C) Auch Marion Koopmanns, die Direktorin der Abteilung für Viruswissenschaften an der Erasmus Universität und Fachberaterin der WHO, somit eine der zentralen Virologinnen der Corona-Frage und gleichzeitig Mitautorin auf der RT-qPCR Publikation von Corman/Drosten in Eurosurveillance bestätigt in einem Interview mit NPO Radio 1 (26.11.2020 im Rahmen ihres Podcastes „Virusfeiten“ <https://www.nporadio1.nl/podcasts/virusfeiten/46542/4-blijvend-moe-na-corona-misschien-helpt-een-aspirientje>) dass die PCR nicht geeignet ist über den Stratus Infektiosität zu entscheiden. (Minute 0:09 in <https://www.youtube.com/watch?v=flsF7trvq2c>)

Explizit die entscheidende Passage des Interviews mit Marion Koopmanns (MK):

„MK: ...es kursieren einige Geschichten, die sagen, na ja, der PCR-Test ist nicht gut.

Interviewer: Zumindest zeigt es nicht unbedingt, dass man ansteckend ist.

*MK: Ja, genau. Und das stimmt auch. Denn die PCR zeigt, dass Sie die Virus-RNA mit sich führen. Das ist buchstäblich das, was die PCR tut. **Und ob diese RNA in einem Viruspartikel steckt, der noch intakt und auch infektiös ist. Oder ob es sich nur um Reste von RNA handelt, die noch lange nach einer Infektion nachgewiesen werden können. Das kann nicht unterschieden werden.** Sie können ein Gefühl dafür bekommen, indem Sie nachschauen "Wieviel gibt es?". Aber man kann diesen Unterschied nicht sehr gut erkennen. Das heißt: dieser Test ist prima, um zu sagen "Sie haben es gehabt", **aber dieser Test ist weniger geeignet, um zu sagen "zu diesem Zeitpunkt sind Sie noch ansteckend"**.*

Interviewer: Sie sprechen gerade über den PCR-Test, nicht wahr?

MK: Ja.

Im Original:

“ MK: ...er circuleren wat verhalen waarin gezegd wordt, nou ja, de PCR test ist niet goed.

Interviewer: Althans die toont niet perse aan dat je besmettelijk bent.

MK: Ja precies. En dat klopt ook. Want de PCR toont aan dat jij het virus RNA bij je hebt. Dat is letterlijk wat de PCR doet. En of dat RNA in een virus deeltje zit dat nog intact is en ook besmettelijk is. Of dat het gewoon restjes RNA zijn, die je nog een tijd lang nadat iemand geïnfecteerd is geweest, kunt aantonen, dat onderscheid zie je niet. Je kunt een beetje een gevoel krijgen door te kijken "hoeveel is het?". Maar dat verschil is niet goed te maken. Dat betekent, die test is prima om te zeggen "je hebt het gehad", maar die test is minder geschikt om te zeggen "op dit moment ben je nog besmettelijk".

Interviewer: Over de PCR test heb je het nu, huh?

MK: ja“

D) Das schwedische Gesundheitsministerium erklärt auf seiner offiziellen Webseite (<https://www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/publikationsarkiv/v/vagledning-om-kriterier-for-bedomning-av-smittfrihet-vid-covid-19/>): „Die PCR-Technologie, die in Tests

zum Nachweis von Viren verwendet wird, kann nicht zwischen Viren unterscheiden, die in der Lage sind, Zellen zu infizieren, und Viren, die vom Immunsystem unschädlich gemacht wurden, **und daher können diese Tests nicht verwendet werden, um festzustellen, ob jemand infektiös ist oder nicht.** RNA von Viren kann oft noch Wochen (manchmal Monate) nach der Infektion nachgewiesen werden, bedeutet aber nicht, dass eine Person noch infektiös ist.“

Im Original

„PCR-tekniken som används i test för att påvisa virus kan inte skilja på virus med förmåga att infektera celler och virus som oskadliggjorts av immunförsvaret och därför kan man inte använda dessa test för att avgöra om någon är smittsam eller inte. RNA från virus kan ofta påvisas i veckor (ibland månader) efter insjuknandet men innebär inte att man fortfarande är smittsam.“ Diese Beurteilung wurde am 19.04.2021 bestätigt.

E) Ebenfalls bereits im Mai 2020 wurde vom National Centre for Infectious Disease in Singapur ein Positionspapier veröffentlicht, in dem unter Punkt 5 darauf hingewiesen wird, dass es wichtig ist, darauf hinzuweisen, dass der Nachweis viraler RNA durch PCR nicht mit Infektiosität oder lebensfähigem Virus gleichzusetzen ist (<https://www.ncid.sg/Documents/Period%20of%20Infectivity%20Position%20Statementv2.pdf>).

Im Original:

„...it is important to note that viral RNA detection by PCR does not equate to infectiousness or viable virus“

F) In einer Nature-Publikation, in der die Analyse der ersten Covid-19-Fälle in Deutschland beschrieben wird (<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>), identifizierten die Autoren (darunter R. Wölfel, C. Drosten und V. Corman) die SARS-CoV-2-positiven Fälle durch die TIB-Molbiol/Roche-PCR für den Nachweis des E- und RdRp-Gens und verglichen die PCR-Ergebnisse mit dem Goldstandard: der Virusisolierung in Zellkultur“.

Hinsichtlich der PCR etablieren die Autoren ein eigenes Nachweissystem auf RT-PCR Basis, um: „...den Nachweis einer aktiven Virusreplikation bei fehlender Histopathologie zu erbringen, haben wir RT-PCR-Tests durchgeführt, um virale subgenomische RNA direkt in klinischen Proben zu identifizieren. (...) Virale subgenomische mRNA wird nur in infizierten Zellen transkribiert und nicht in Virionen verpackt und zeigt daher das Vorhandensein aktiv infizierter Zellen in Proben an.“

Im Original:

“To obtain proof of active virus replication in the absence of histopathology, we conducted RT-PCR tests to identify viral subgenomic RNAs directly in clinical samples. (...) Viral subgenomic mRNA is transcribed only in infected cells and is not packaged into virions, and therefore indicates the presence of actively infected cells in samples”.

Das bedeutet, dass schon sehr früh bekannt und publiziert war, **dass die üblichen RT-qPCRs**, die genomische RNA von SARS-CoV-2 nachweisen, **keine Entscheidung darüber zulassen, ob möglicherweise ein aktiv replizierendes Virus in der Probe vorhanden ist**. Spätestens zu diesem Zeitpunkt hätten also alle PCR-Empfehlungen der WHO auf den Nachweis subgenomischer RNA umgestellt werden müssen - was bedeutend besser wäre als der genomische Nachweis, aber dennoch nach wie vor nur die Wahrscheinlichkeit einer Virusreplikation auf RNA-Ebene angibt und kein endgültiger Nachweis eines infektiösen Virus ist.

G) In einer Übersichtsarbeit, welche am 02.12.2022 in Nature Reviews Microbiology (<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>) publiziert wurde, wird an mehreren Stellen explizit darauf hingewiesen, dass eine RT-PCR weder dazu geeignet ist, infektiöse Viren nachzuweisen noch infektiöse (ansteckende) Menschen sicher zu diagnostizieren. Bemerkenswert an dieser Publikation ist, dass sie mit Isabella Eckerle als Seniorautorin von einer engen Mitstreiterin von Christian Drosten verantwortet wird.

Zitate im Einzelnen:

Einleitung, erster Absatz:

*“Der Nachweis viraler RNA in Atemwegsproben mittels RT-PCR ist zwar hochempfindlich und spezifisch, unterscheidet aber nicht zwischen replikationsfähigen Viren und Rest-RNA.”
“Dies liegt daran, dass virale RNA (die von der RT-PCR erfasst würde) in Abwesenheit infektiöser Viren nachweisbar bleibt, während die Positivität von Ag-RDTs besser mit der Anwesenheit infektiöser Viren korreliert.“*

Im Original:

*„Although detection of viral RNA in respiratory specimens by RT-PCR is highly sensitive and specific, it does not distinguish between replication-competent virus and residual RNA.“
“This is because viral RNA (which would be picked up by RT-PCR) remains detectable in the absence of infectious virus, whereas positivity of Ag-RDTs better correlates with the presence of infectious virus.“*

Unter der Überschrift:“ Detection of RNA viral load”

*“Obwohl die RT-PCR die Infektiosität nicht direkt bestimmen kann, da sie nicht zwischen replikationsfähigem (infektiösem) Virus und restlicher (nicht infektiöser) viraler RNA unterscheiden kann, wurde nach einer Korrelation zwischen der RNA-Viruslast und dem Vorhandensein infektiöser Viren **gesucht**.“*

Im Original:

“Although RT-PCR cannot directly determine infectiousness owing to its inability to differentiate between replication-competent (infectious) virus and residual (non-infectious) viral RNA, a correlation between RNA viral load and the presence of infectious virus has been sought.“

Unter der Überschrift: "SARS-CoV-2 diagnostic in public health":

„Leider gibt es derzeit keinen diagnostischen Point-of-Care-Test zur Bestimmung der Infektiosität von SARS-CoV-2 in einer Patientenprobe, und die oben beschriebene Viruskultur ist für diagnostische Zwecke nicht geeignet. Daher wurde eine Reihe von Ansätzen vorgeschlagen, um einen Näherungswert für die Infektiosität zu finden, der die Isolierungszeiträume vorgibt“

Im Original:

„Unfortunately, no point-of-care diagnostic test currently exists to determine infectious SARS-CoV-2 in a patient sample, and virus culture as described above is not suited for diagnostic purposes. Thus, a range of approaches have been suggested to find a proxy for infectiousness to guide isolation periods.“

Anmerkung: es ist zu beachten, diese Aussage stammt aus dem Dezember 2022, also fast 3 Jahre nach dem Einführen der RT-qPCR zur direkten Testung (Point of care) von vermeintlich infektiösen Personen in den Testzentren und als Basis der Inzidenzen, der R-Werte und der daraus resultierenden Maßnahmen!!! Diese Aussage wird sogar in der Schlussfolgerung dieser Übersichtsarbeit nochmals explizit verstärkt:

Im Abschnitt "Conclusions":

„Obwohl während der Pandemie viele Fortschritte auf dem Gebiet der Diagnostik gemacht wurden, gibt es bis heute keine diagnostischen Tests, die das Vorhandensein eines infektiösen Virus zuverlässig nachweisen.“

Im Original:

„Although much progress has been made during the pandemic in the field of diagnostics, to date, no diagnostic tests exist that reliably determine the presence of infectious virus.“

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

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur Beurteilung der Frage, ob ein RT-qPCR Test eine Aussage über die Infektiosität einer positiv getesteten Person betrifft, also die Frage inwieweit das positive RT-qPCR Ergebnis auf die Anwesenheit von vermehrungsfähigen Viren schließen lässt, ist die Aufbereitung der Probe für die RT-qPCR.

Aus dem Abstrichmaterial muss die RNA des gesuchten Gens (hier: SARS-CoV-2 Virus Genom), isoliert werden, um für einen Gennachweis in der RT-qPCR einsetzbar zu sein. Ein entscheidender Schritt hierbei ist die komplette Denaturierung allen biologischen Materials und Abtrennung der Hauptkomponenten Eiweiß, Fette und Nukleinsäuren, um letztendlich die RNA als Startbasis für die RT-qPCR vorliegen zu haben. Das Originalprotokoll von Chomczynski und Sacchi aus dem Jahr 1987 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2440339/>,

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406285/>) ist nach wie vor Bestandteil nahezu aller Protokolle zur Aufreinigung biologischen Materials zur RNA Isolation, sei es laboreigen hergestellt oder in gekauften „Extraktionskits“. Komponenten der originalen Extraktionslösung sind Phenol/Chloroform und Isoamylalkohol, in verschiedenen abgewandelten kommerziellen Lösungen auch ähnlich wirkende jedoch weniger giftige Substanzen. Alle haben zu eigen, dass sie jede lebende oder vermehrungsfähige biologische Struktur komplett zerstören.

Dies bedeutet: **im Laborprozess der Aufbereitung einer Abstrichprobe, welcher zwingend der RT-qPCR vorgeschaltet ist, wird jedes biologische Material, sei es nun eine vitale Zelle, ein vermehrungsfähiges Virus oder auch nur Zelltrümmer und Genreste so denaturiert, dass keinerlei Aussage mehr möglich ist, ob das Material von einem intakten oder gar vermehrungsfähigen Organismus oder von bereits vorgeschädigten oder zerstörten Proben stammt.** Durch diesen Extraktions- und Aufbereitungsprozess bedingt kann keinesfalls aus einer positiven RT-qPCR welche Genom Fragmente Nachweist auf das Vorhandensein replikationsfähiger Viren in der Abstrichprobe geschlossen werden, es kann immer nur die isolierte RNA unabhängig von der Quelle, nachgewiesen werden.

2.3. Zwischenfazit:

Selbst wenn also bei der Durchführung der PCR inklusive aller vorbereitenden Schritte (PCR-Design und Etablierung, Probenentnahme, Aufbereitung und PCR Durchführung) alles „richtig“ gemacht wird, und der Test positiv ist, d.h.: eine Genom-Sequenz erkennt, welche ggf. auch in einem oder sogar dem konkreten „Corona“-Virus (SARS-CoV-2) existiert, **kann diese Technik unter keinen Umständen nachweisen, dass die Person, welche positiv getestet wurde, mit einem replizierenden SARS-CoV-2 infiziert und folglich für andere Personen ansteckend = gefährlich sein könnte.**

Eine bessere Plausibilität eines positiven PCR Ergebnisses hinsichtlich einer Virusinfektion und vor allem eines im Gewebe replizierenden Virus wäre der, bereits in der unter Punkt 2.1.F erwähnten Publikation beschreiben, Nachweis der subgenomischen RNA gewesen. **Da diese sgRNA nur bei der Bildung neuer Viren in einer Infizierten Zelle auftritt, kann sie immerhin als Indiz (Indikator) wenn auch nicht als Beweis einer aktiven Virusinfektion herangezogen werden.** Hierzu ist in der unter Punkt 2.1.G aufgeführten Publikation sehr gut unter dem Punkt „SARS-CoV-2 diagnostics in public health“ dargestellt:

„Ein Beispiel ist der Nachweis von sgRNA-Transkripten, die bei der Virusreplikation und insbesondere bei der Synthese von Negativstrang-RNA entstehen. Obwohl sgRNAs in infizierten Zellen transkribiert werden, sind sie nicht in den Virionen verpackt und können daher als Indikator für eine aktive Replikation und damit für infektiöse Viren dienen. Es wurden spezifische RT-PCR-Assays entwickelt, um sgRNAs zusätzlich zum diagnostischen Nachweis

genomischer SARS-CoV-2-RNA nachzuweisen, **doch haben sich diese Assays aufgrund ihrer geringeren Empfindlichkeit als herkömmliche RT-PCR-Assays nicht für den routinemäßigen diagnostischen Einsatz durchgesetzt.**

[....]

Obwohl das Fehlen von sgRNA auf eine fehlende Virusreplikation hinweist, ist das Vorhandensein von sgRNA also nicht unbedingt ein Hinweis auf Infektiosität.“

Im Original:

„One example is the detection of sgRNA transcripts, which are generated during virus replication, and specifically the synthesis of negative-strand RNA. Although sgRNAs are transcribed in infected cells, they are not packaged in the virions and can therefore serve as an indicator of active replication and thus of infectious virus. Specific RT-PCR assays were developed to detect sgRNAs in addition to the diagnostic detection of genomic SARS-CoV-2 RNA, but such assays have not made their way into routine diagnostic use owing to their lower sensitivity than conventional RT-PCR assays.

[....]

Thus, although the absence of sgRNA would indicate absence of viral replication, the presence of sgRNA does not necessarily indicate infectiousness“

Generell müssen für die Feststellung einer aktiven Infektion und der Beurteilung, ob eine Person ansteckende Viren „produziert“ und abgibt, neben der klinischen Symptombewertung weitere, und zwar konkrete diagnostische Methoden wie die Isolation von vermehrungsfähigen Viren eingesetzt werden (Goldstandard) . Hierzu findet sich unter der Überschrift „Detection of infectious Virus“ in der, unter Punkt 2.1.G aufgeführten Publikation, folgende zutreffende Aussage:

„Der Goldstandard für den Nachweis infektiöser (d. h. replikationsfähiger) Viren in Atemwegsproben ist die Gewinnung von Viren in Zellkulturen, ein Verfahren, das gemeinhin als Virusisolierung bezeichnet wird“

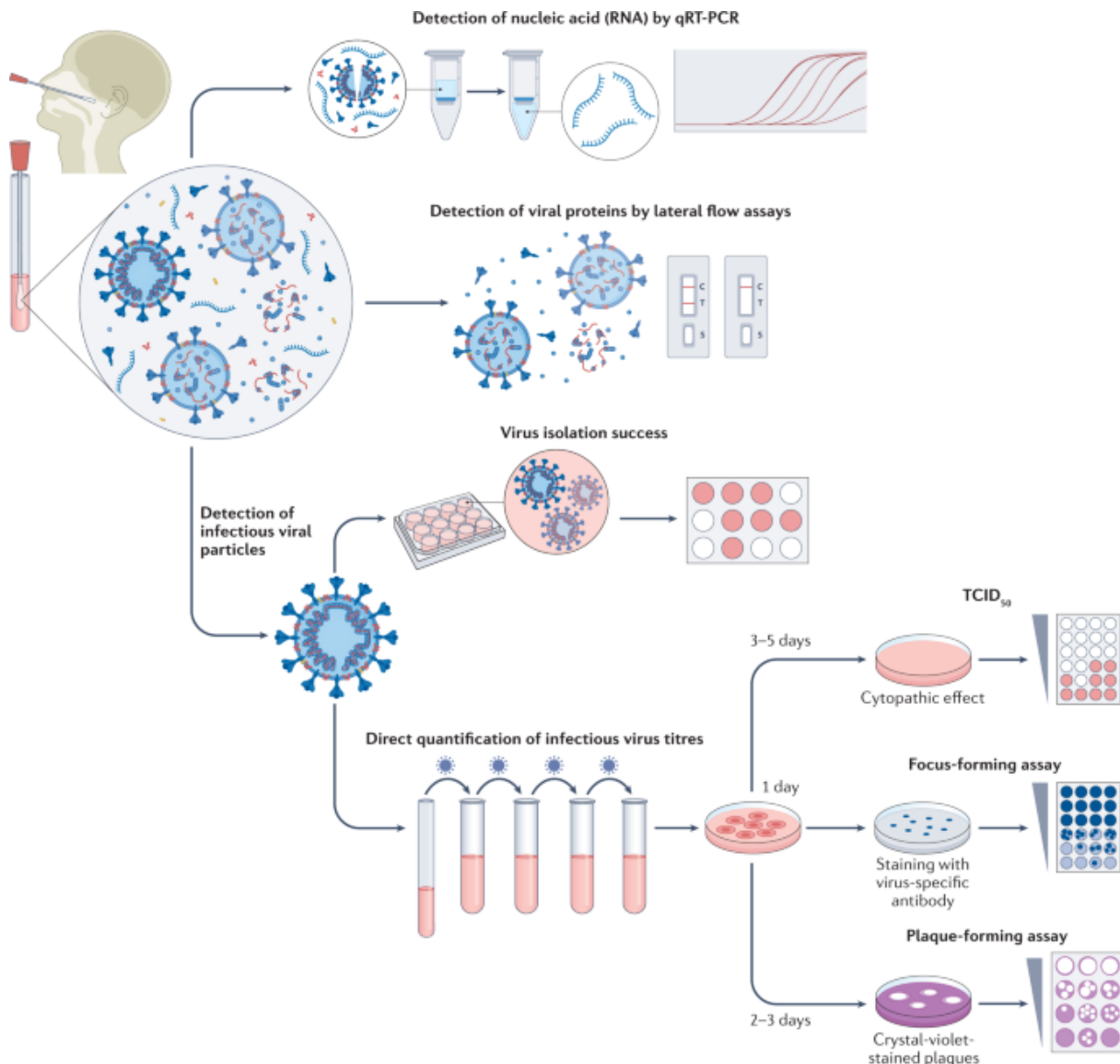
Im Original:

“The gold standard for determining the presence of infectious (that is, replication competent) virus in respiratory specimens is the recovery of virus in cell culture, a procedure that is commonly termed virus isolation“

2.4. Abbildung

Aus dieser Arbeit (<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>) sei hier zur besseren Übersicht die Abbildung 1 übernommen, in welcher die verschiedenen Nachweismethoden optisch dargestellt sind. Der Nachweis der viralen Nukleinsäure (RNA) mittels RT-qPCR (hier qRT-PCR genannt), der Nachweis viraler Eiweißbestandteile mittels Antigen-Schnelltest

(lateral-flow assay) und der Nachweis infektiöser Viren mittels verschiedener Isolationsmethoden in Zellkultur.



Abbildungslegende:

Zum Nachweis der SARS-CoV-2-Viruslast werden Abstrichproben aus dem Nasen-Rachen-Raum oder dem Oropharynx verwendet. Der Nachweis viraler Nukleinsäuren (RNA) erfolgt durch quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR). Die virale RNA wird aus lysiertem Virus extrahiert, revers transkribiert und mittels qPCR unter Verwendung von Primern, die für eine oder mehrere Zielregionen im viralen Genom spezifisch sind, amplifiziert. Der Amplifikationszyklus, bei dem die Proben den Schwellenwert überschreiten (Zyklusschwelle), bestimmt die Menge der viralen RNA. Die RNA-Viruslast kann als Anzahl der viralen RNA-Kopien pro Milliliter oder durch den willkürlichen testspezifischen Zyklusschwellenwert ausgedrückt werden. Lateral Flow Assays weisen das Vorhandensein spezifischer viraler Proteine in den lysierten Viruspartikeln nach. Das SARS-CoV-2-Nukleokapsid wird in den meisten Antigen-detektierenden (Schnell-)Diagnostetests verwendet. **Das Vorhandensein infektiöser (replikationsfähiger) Viren in respiratorischen Proben kann nur durch die Wiedergewinnung von Viren in Zellkulturen durch Isolierung oder durch Quantifizierung infektiöser Virustiter unter Verwendung der 50%igen infektiösen Gewebekulturdosis (TCID₅₀), fokusbildender Tests oder plaquebildender Tests festgestellt werden.** Die Virusisolierung erfolgt durch Auftragen von infektiösem Medium auf die Monoschicht von Zellen; der Erfolg der Isolierung wird durch das Auftreten eines zytopathischen Effekts etwa 3-5 Tage nach der Infektion bestimmt. Die weiße Farbe zeigt das Vorhandensein eines zytopathischen Effekts in den Zellen an. Zur Quantifizierung des infektiösen Virustiters werden serielle Verdünnungen von Respirationsproben durchgeführt und zur Inokulation auf der Monolage von Zellen verwendet. In TCID₅₀, 3-5 Tage nach der Infektion, wird der vireninduzierte zytopathische Effekt klassischerweise mit Hilfe der Mikroskopie bestimmt. Bei fokusbildenden Tests werden die Zellen 1 Tag nach der Infektion fixiert und eine Immunfärbung mit

virusspezifischen Antikörpern durchgeführt, um Gruppen von infizierten Zellen (Foci) zu erkennen. Die Foci, die auf das Vorhandensein infektiöser Viren hinweisen, sind blau dargestellt. Bei der Plaquebildung werden die Platten 2-3 Tage nach der Infektion fixiert und mit Kristallviolett angefärbt; Vertiefungen mit einzelnen Plaques werden zur Bestimmung des Virustiters verwendet. Die Plaques, die das Vorhandensein infektiöser Viren anzeigen, sind weiß dargestellt.

3. Einflussfaktoren auf die Zuverlässigkeit des PCR Test

Tatsächlich aber hängen die Ergebnisse eines PCR-Tests von einer Reihe von Parametern ab, die zum einen erhebliche Unsicherheiten bedingen und zum anderen so beeinflusst werden können, dass viele oder wenige (scheinbar) positive Ergebnisse erzielt werden.

3.1. Design der PCR und Spezifität

Eine PCR kann mithilfe von Datenbanken (z.B. Genbank, GISAID) und etablierter Software (sogenannte Primersuchprogramme) sehr komfortabel designt werden. Hierbei entscheidet die Zielsetzung (was soll wie genau nachgewiesen werden) über die Anforderungen an die eingesetzte Zielregion und die Passgenauigkeit der Primer.

Soll eine grobe Suche nach Vertretern einer großen Gruppe ähnlicher Viren (z.B. alle Coronaviren) angestrebt werden, werden die Primer in sogenannte konservierte gruppenspezifische Regionen gelegt. Dies ist ähnlich, wie wenn man eine Software sagen würde: Erkenne zuverlässig alle roten Autos auf einem Parkplatz (aber keine LKW, Motorräder und auch keine anderen Farben). Hiermit kann in einer Probe gesucht werden, ob überhaupt Genspuren von einem Vertreter der gesuchten Virusgruppe (z.B. Coronaviren) vorhanden sind.

Möchte man nur eine Subgruppe finden (z.B. Sarbecoviren innerhalb der Coronaviren), entsprechend einer Automarke innerhalb der Gruppe aller roten Autos (im Beispiel) dann können die Primer subgruppenspezifisch designt werden. Dies wurde im Fall der WHO empfohlenen PCR aus der Charité beim sogenannten „E-Gen“ aber auch beim RdRp-von Corman/Drosten zur Gruppe der Sarbeco-Viren, zu denen SARS-CoV-2 gehört, angewendet.

Es ist aber (nicht immer, aber oft) auch möglich, eine hochspezifische PCR zu entwerfen, mit der NUR das speziell gesuchte Gen (hier Virusgen von SARS-CoV-2) entdeckt und vervielfältigt wird. Analog dazu wäre das Erkennen eines speziellen Modells innerhalb der Gruppe der roten Autos einer Marke im Beispiel. Hierzu muss das Design beinhalten, dass die Region, die verwendet wird, keinerlei Homologien zu nahe verwandten Viren (z. B. SARS1 oder Fledermausviren zu SARS-CoV-2) oder auch irgendeiner anderen schon bekannten Gensignatur (Menschliches Genom, andere Organismen) hat.

Die Suchprogramme können dies sehr zuverlässig ermöglichen. Bei der qPCR kommt dann noch ein drittes Genstück dazu, welches spezifisch nur mit der gesuchten Genregion reagieren darf, das ist die „Probe“.

Insofern: ein gutes PCR Design umfasst für die normale PCR zwei und für die qPCR drei hochspezifisch nur die gewünschten Zielsequenz erkennende Primer/Sonden und kann dann in der Tat hochspezifisch nur das gewünschte Zielgen erfassen.

Auch für SARS-CoV-2 wäre solch ein spezifisches PCR-Design möglich gewesen, wurde aber in den ursprünglichen und maßgeblichen WHO-Protokollen unterlassen.

Nach dem Design **muss dann zwingend das Primerpaar und die Sonde an realen Proben im Labor überprüft werden.** Hierzu werden sichere Proben mit dem zu identifizierenden Genmaterial (hier: Proben von sicher SARS-CoV-2 infizierten Personen oder sogar ein komplett charakterisiertes Virusisolat) benötigt, ferner ein breites Spektrum von Viren und anderen Erregern, welche prinzipiell ähnliche Symptome in Patienten auslösen können und die kein Signal mit der eingesetzten PCR ergeben dürfen.

Wenn alle diese Bedingungen erfüllt sind: Die PCR findet genau das vom Designer angestrebt Zielgen - entweder wie beabsichtigt einer Gruppe oder eben hochspezifisch eines einzelnen Erregers und diese ist zweifelsfrei mit umfassenden positiv- und negativ Kontrollen im Labor experimentell nachgewiesen, dann kann dieses Design als Protokoll zur Unterstützung einer klinischen Diagnose auch zuverlässig als spezifisch verwendet werden.

3.2. Anzahl der unabhängigen Ziel-Gene („Targets“)

In dem ursprünglich von der WHO am 13.01.2020 publizierten Protokoll **„Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time PCR“** (<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf>) wird die Abfolge von PCR-Nachweisen von drei unabhängigen Teilgenen des später in SARS-CoV-2 umbenannten Virus beschrieben. Die Reihenfolge bezog sich auf das E-Gen, das RdRp-Gen und dann das N-Gen. Bereits am 17.01.2020 folgte eine Änderung durch die WHO mit dem Protokoll **„Diagnostic detection of 2019-nCoV by real time PCR“** (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2) in der das N-Gen als Nachweis entfernt wurde und somit **statt der ursprünglichen 3 Zielregionen nur noch 2 Genabschnitte empfohlen** wurden. Am 02.03.2020 wurde in einem erneut aktualisierten Testprotokoll der WHO **„Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases“** (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331329/WHO-COVID-19-laboratory-2020.4-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>) darauf hingewiesen, dass **„.... In Gebieten, in denen das COVID-19-Virus weit verbreitet ist, könnte ein einfacherer Algorithmus angewandt werden, bei dem z. B. ein Screening durch RT-PCR eines einzigen Unterscheidungstargets als ausreichend angesehen wird....** Im Original: **„..... In areas where COVID-19 virus is widely spread a simpler algorithm might be adopted in which for example screening by RT-PCR of a single discriminatory target is considered sufficient.....“** (Seite 3 unten) **woraufhin die Labors**

großflächig dazu übergangen, nur noch 1 Zielgen zu analysieren, und sich nur noch auf das als gruppenspezifische E-Gen als gültige PCR spezialisierten, wie z.B. explizit vom Labor Augsburg am 03.04. beschrieben (nur noch im Internetarchiv verfügbar: <https://www.oder-spree-piraten.de/wp-content/uploads/2020/05/Ge%C3%A4ndertes-Befundlayout-der-SARS-CoV2-PCR-Ergebnisse--Labor-Augsburg-MVZ-GmbH.pdf>)

Die herausragende Bedeutung der Anzahl der mittels PCR analysierten unabhängigen Zielgene bei unspezifischen Einzeltests wie in dem bevorzugt von der WHO empfohlenen Protokoll der Charité (und über TIB molBiol/Roche weltweit sehr schnell flächendeckend eingesetzt) ergibt sich aus folgender exemplarischer Rechnung:

Die im WHO-Protokoll ursprünglich für den Nachweis von SARS-CoV-2 angegebenen drei Zielregionen E, RdRp und N-Gen wurden zügig in vielen laboreigenen und kommerziellen Testsystemen eingesetzt. Ein erster Ringversuch vom Institut Instant e.V. (<https://corona-ausschuss.de/wp-content/uploads/2020/07/Instand-Ringversuch-Virusgenom-Nachweis-SARS-CoV-2.pdf>) ergab für diese Gene eine mittlere Spezifität von:

Zielgen des SARS-CoV-2 Genoms	Anzahl überprüfte Testkits	Spezifität nur Zellkultur (ohne Virus-RNA)	Spezifität mit verwandtem Coronavirus (HCoV 229E)	%	Mittlere Spezifität absolut	Mittlere Fehlerrate (1-abs. Spez.)
E-Gen	24	99,46%	95,17%	97,31	0,9731	0,0269
RdRp-Gen	13	97,80%	90,66 %	94,23	0,9423	0,0577
N-Gen	21	98,20%	87,95 %	93,08	0,9308	0,0692

In einer Mischpopulation von 100.000 Tests würde sich selbst bei keiner echt infizierten Person aufgrund der mittleren Fehlerrate ergeben:

Bei einem reinen E-Gen-Test: $100.000 \times 0,0269 =$ **2690** falsch positive

Bei E und RdRp-Test in Folge: $100.000 \times (0,0269 \times 0,0577) =$ **155** falsch positive

Bei allen drei Genen (E, RdRp, N): $100.000 \times (0,0269 \times 0,0577 \times 0,0692) =$ **10** falsch positive

Dies bedeutet, die Vorgabe der WHO im März 2020, also vor der offiziellen Pandemieausrufung, sukzessive die Anzahl der zu testenden Zielgene bei gleichzeitiger Beibehaltung der ursprünglichen PCR-Vorgaben („Corman/Drosten-Protokoll“) von SARS-CoV-2 von 3 auf 1 zu reduzieren, resultierte in einer Zunahme der falsch positiv getesteten Personen im obigen Rechenbeispiel von 10 bei 3 Genen auf fast 3000 bei nur noch dem E-Gen je 100.000 durchgeführter Tests.

Würden die 100.000 durchgeführten Tests repräsentativ bei 100.000 Bürgern einer Stadt/Landkreis innerhalb von 7 Tagen durchgeführt sein, so ergibt sich alleine aus dieser Fragestellung der verwendeten Zielgene hinsichtlich der „7-Tagesinzidenz“ ein Unterschied von 10 gegenüber 155 gegenüber 2690 und davon abhängig die Schwere der ergriffenen Freiheitsbeschränkungen der Bürger.

Zwischenbewertung: Das Rechenbeispiel zeigt, wie durch „Spielen an den Vorgaben“ bezüglich der nachzuweisenden Zielgene für die Labore die täglichen Fallzahlen beeinflusst werden können. Angesichts der immensen Auswirkungen auf die politischen Entscheidungen, welche von den Absolutzahlen positiver Tests und der daraus abgeleiteten „7-Tages-Inzidenz“ bestimmt werden, ist die Vorgabe der WHO (und auch des RKI) zur Reduktion der Zielgene klar dazu geeignet gewesen, die „Pandemie“ durch falsche Testvorgaben künstlich um den Faktor bis zu 300 aufzublähen.

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

Wäre konsequent die korrekte Anzahl von drei bzw. sogar besser (wie z.B. in Thailand ursprünglich eingesetzt) bis zu 6 Genen für die PCR Analyse verwendet worden, hätte sich die Rate der positiven Tests und damit die „7-Tagesinzidenz“ fast komplett auf null reduziert.

3.3. Anzahl der durchgeführten Zyklen (CT-Wert) bei der qPCR

„Infektiöse Personen haben in der Regel eine RNA-Viruslast von $>10^6$ Genomkopien pro Milliliter, was in den meisten RT-PCR-Tests einem Ct-Wert von 25 entspricht.“

Diese Definition eines sinnvollen CT-Werts wird explizit in der bereits unter 2.1.G zitierten Übersichtsarbeit, welche am 02.12.2022 in Nature Reviews Microbiology (<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>) erschienen ist, im Kapitel „SARS-CoV-2 Diagnostics in public health“ getroffen und fasst somit die im folgenden dargelegten Aspekte sinnvoll zusammen.

Im Original:

“Infectious individuals typically have RNA viral loads of $>10^6$ genome copies per millilitre, which corresponds largely with a Ct of 25 in most RT-PCR assays”

3.3.1 Bedeutung des CT-Wertes

Neben der Anzahl der nachgewiesenen Ziel-Gene, insbesondere bei nur einem oder maximal zwei Genen stellen unabhängig vom Design der PCR die Anzahl der Zyklen der Amplifikation in der qPCR bis zur Wertung „positiv“ und der daraus resultierende CT-Wert eine entscheidende Stellschraube dar. **Je kleiner der CT-Wert einer Probe in einer qPCR, desto höher war die Ausgangsmenge der DNA in der Probe.**

Dies korreliert unter standardisierten Bedingungen mit (im Falle von Viren) der Ausgangsmenge an viralen Genomen, der sog. **Viral load**, welche im Idealfall als „Anzahl viraler Kopien“ pro ml Probe angegeben werden sollte. Diese Viral load korreliert auch im Fall von SARS-CoV-2 mit der Anzüchtbarkeit infektiöser Viren in Zellkultur wie bereits im März 2020 publiziert wurde. (Abbildung 1e in Wölfel et al., <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>) **Hier war eine Mindestmenge von 10^6 RNA-Kopien/ml nötig, um aus der Probe entsprechend Viren anzüchten zu können**, in einer weiteren Arbeit unter Mitbeteiligung von C. Drosten aus dem Mai 2021 waren sogar im Schnitt 10^8 Viren in der Probe für eine positive Zellkultur notwendig (supplemental Figure S4 von <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34035154/>).

In letzterer Arbeit ergab sich auch, dass keiner der 25.381 getesteten Personen im Falle einer ermittelten Viruslast unter 10^5 virale Genome je ml in der Probe aufwies (Tabelle S1), wohingegen die RT-qPCR aus dem Ursprungsprotokoll (Corman V et al., <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>) bereits bei ca. 4 Kopien je Probenansatz (5µl entsprechend ca. 10^3 Kopien/ml) ein positives Ergebnis liefern kann, also bereits um den Faktor 1.000-10.000 eher als in einer Probe mit tatsächlich infektiöser Virus last.

Auch **kommerzielle PCR-Testsysteme**, sogenannte Kits, von denen es weltweit (Stand Mai 2022) bereits ca. 630 verschiedene gibt (<https://www.finddx.org/covid-19/test-directory>) weisen teilweise Nachweisgrenzen von weniger als 10 Kopien/Reaktion aus, wie z.B. Kits der Firma TIB-Molbiol (https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_53-0777_96_Wuhan-R-gene_V200204_09155376001%20%282%29.pdf)- Punkt 5 „Specification“. Ein Beispiel der Differenz zwischen Nachweisfähigkeit und einer sinnvollen Nachweisgrenze ist im Beispiel **ANNEX 3** gegeben.

Es ist hier fachlich zu unterscheiden von einer „Kontamination“* des Rachenraums mit einzelnen wenigen, aber keine Infektion auslösenden, Viren und einer echten „Infektion“. Letztere geht mit vermehrungsfähigen Viren einher, die dann a) zu einer symptomatischen Erkrankung und b) einer Infektiosität, d.h. der Fähigkeit, andere Personen anzustecken, einhergeht. Anmerkung: *zum Begriff: „Wir haben gelernt, dass es anders als mit Bakterien keine Normalbesiedlung mit Coronaviren auf der Schleimhaut gibt.“ (K. Henning im Podcast 58 mit C. Drosten)

Diesen **Aspekt der Kontamination versus echter Infektion** hat Christian Drosten bereits 2014 in einem Interview in der Wirtschaftswoche im Zusammenhang mit MERS beschrieben (<https://www.wiwo.de/technologie/forschung/virologe-drosten-im-gespraech-2014-die-who-kann-nur-empfehlungen-aussprechen/9903228-2.html>): „Ja, aber die Methode (Anmerkung: gemeint ist die PCR) ist so empfindlich, dass sie ein einzelnes Erbmolekül dieses Virus nachweisen kann. Wenn ein solcher Erreger zum Beispiel bei einer Krankenschwester mal eben einen Tag lang über die Nasenschleimhaut huscht (Anmerkung: das wäre die o.g. „Kontamination“), ohne dass sie erkrankt oder sonst irgend etwas davon bemerkt, dann ist sie plötzlich ein Mers-Fall. Wo zuvor Todkranke gemeldet wurden, sind nun plötzlich milde Fälle und Menschen, die eigentlich kerngesund sind, in der Meldestatistik enthalten.“ [...] „Denn was zunächst interessiert, sind die echten Fälle (Anmerkung: Das sind die „Infizierten“). **Ob symptomlose oder mild infizierte Krankenhausmitarbeiter wirklich Virusträger sind, halte ich für fraglich. Noch fraglicher ist, ob sie das Virus an andere weitergeben können.**“

Letzteres ist eine entscheidende Aussage auch in Bezug auf die sehr nahe mit MERS verwandten SARS-CoV-2 Viren.

Aber exakt dieser Punkt der Virusweitergabe (und damit dem Treiben der Pandemie) ist die Begründung für die eingreifenden Maßnahmen wie Quarantäne/Isolationsanordnungen, die „Lockdowns“ und die sogenannten AHA-Regeln.

3.3.2 Belege für die Relevanz des CT-Wertes

A) Eine kanadische Studie von Jared Bullard/Guillaume Poliquin in Clinical Infectious Diseases 2020, nachzulesen unter dem Link (<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa638>) kam bereits im Mai 2020 zu dem Ergebnis, dass oberhalb eines CT-Wertes von 24 kein reproduktionsfähiges Virus mehr gefunden wurde – dies bedeutet: Der Versuch, aus Abstrichproben, die erst bei einem höheren CT-Wert zu einem positiven Test führten, anschließend vermehrungsfähige Viren anzuzüchten, scheiterte. Oberhalb eines CT-Wertes von 24 ist laut dieser Studie die Menge nachweisbaren viralen Erbguts also so gering, dass sich der positive Test jedenfalls nicht mehr im Sinne einer aktiven Infektion interpretieren ließ. Eine große Studie von Jaffar et al. ([Doi 10.1093/cid/ciaa1491](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491)) setzte die Grenze zur Anzüchtbarkeit von SARS-CoV-2 aus Patientenprobenmaterial bei einem CT-Wert von 30 .

B) In einer Studie zum Vergleich Antigentest/RT-qPCR und Virusanzucht aus dem CDC (<https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciab303/6224406>) wurde eine erfolgreiche Virusanzucht für einen CT-Bereich von 17,4-28,8) beschrieben, wobei nur unter eine CT von 25 alle Proben von symptomatischen Personen stammten und mit einer erfolgreichen Virusanzucht einhergingen und nur 18,2% wenn der CT zwischen 25 und 29 lag. Im Original: „Virus was isolated from specimens with Ct values ranging from 17.4-29.8; virus

was isolated from all specimens with a Ct value <25 and from 18.5% (5/27) of specimens with a Ct value ≥25. (Seite 9 mittig). Unabhängig von dieser Überprüfung mithilfe der Virusanzucht galten hier jedoch alle Proben, welche in zwei Target-Sequenzen aus dem „N-Gen“ mit einem Ct bis 40 positiv wurden als „echt positiv“

C) In seinem NDR-Podcast vom 16.02.2021 benannte C. Drosten explizit, dass eine Erhöhung des CT von 25-27 über die Grenze von 28 hinweg bedeutet, dass Personen von denen diese Abstriche mit dem höheren CT gewonnen wurden, nicht mehr infektiös sind. *„und auch hier ist wieder eine Ct-Wertverschiebung von 25 auf 27 ungefähr, 27, 28 zu sehen. Und das ist ein Bereich, da ist nach unserer Einschätzung wirklich die Infektiosität zu Ende. Wenn man so eine Patientenprobe sieht und man würde fragen, ist der Patient noch infektiös, da würde ich sagen: **Nein, das ist jetzt langsam nicht mehr ein infektiöser Bereich.** Das kann man korrelieren“* Seite 4 (rechte Spalte oben in: <https://www.ndr.de/nachrichten/info/coronaskript270.pdf>)

Mit diesen CT-Angaben bezieht sich C. Drosten vermutlich hauptsächlich auf eine Studie zur Impfeffektivität in Israel, welche mittels RT-qPCR überprüft wurde.

Auf diese Studie mit dem Titel „Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine (<https://www.nature.com/articles/s41591-021-01316-7>) wird auch in einem Schreiben vom RKI (AZ: ID3176 vom 31.03.2021) an das Bundesministerium für Gesundheit hingewiesen. In dieser Studie wird anhand von PCR-Tests nach einer Impfung (mit BNT162b2) aufgezeigt, dass bei geimpften Probanden, welche ab Tag 12 nach der ersten Impfung in der PCR für SARS-CoV-2 positiv wurden, der CT für die drei getesteten Gene (E, N, RdRp mittels des Seegene Allplex Testkits, welcher laut Instant Ringversuch 340 eine Spezifität von 96-98,4% aufweist) von einem **mittleren CT von 25 auf einen mittleren CT von 27 ansteigt.**

Im Vergleich mit einer ebenfalls SARS-CoV-2 PCR positiven ungeimpften Kohorte **wird in dieser Studie ein Impferfolg anhand einer CT-Abnahme von 1,64-2,33 festgemacht!!!**

Im Original: *„Finally, applied on all infections (post-vaccination and unvaccinated, n=5,794), a multivariate linear regression model accounting for age, sex and vaccination quantify **Ct regression coefficients ranging from 1.64 (N gene) to 2.33 (RdRp) for vaccination after 12 days or longer prior to infection sampling**“, was rechnerisch mit einer 4-fachen Reduzierung der Viruslast in Geimpften versus Ungeimpften gleichgesetzt wird. Im Original: *„As a difference of 1 Ct unit is equivalent to a factor of about 1.94 in viral particles per sample, these Ct differences represent a viral load ratio ranging from 2.96 to 4.68.“**

Bemerkenswert bei den PCR Analysen ist hier ebenfalls, dass auch in dieser Arbeit die CT-Werte bis 40 analysiert und gewertet wurden (Extended Data Figure 4)

D) Auch das CDC geht entsprechend in einer Empfehlung vom 16.04.2021 auf den CT bei der SARS-CoV-2 PCR dahingehend ein, dass dieser einen Wert von maximal 28 haben sollte, um PCR Produkte von „Impfdurchbrüchen“ (also RT-qPCR positiven Personen nach kompletter

Impfung) zur Sequenzierung ins Labor zu senden (<https://www.cdc.gov/vaccines/covid-19/downloads/Information-for-laboratories-COVID-vaccine-breakthrough-case-investigation.pdf>)

E) Eine Studie aus Südkorea erwähnt einen CT von ≤ 25 als Obergrenze der klinisch relevant „positiven“ und zieht diesen Wert zum Vergleich mit der Güte von Antigentests heran. Originalzitat: „ [...] based on a **clinically significant Ct value of ≤ 25** (...)“ (S. 3 in <https://jkms.org/DOIx.php?id=10.3346/jkms.2021.36.e101>)

F) Einhellige wissenschaftliche Meinung (u.a. auch von Dr. Fauci vom US CDC, aber auch einer Reihe von in der New York Times im August 2020 zitierten Wissenschaftlern, <https://www.nytimes.com/2020/08/29/health/coronavirus-testing.html>) ist, **dass alle „positiven“-Resultate, die erst ab einem Zyklus von 35 erkannt werden, keinerlei wissenschaftliche (d.h.: keine evidenzbasierte) Grundlage haben.** Der mit Hilfe der WHO weltweit propagierte RT-qPCR Test zum Nachweis von SARS-CoV-2 hingegen war (und ihm folgend auch alle anderen auf ihm als Blaupause basierenden Tests) auf 45 Zyklen eingestellt, ohne einen CT-Wert für „positiv“ zu definieren.

G) Ebenfalls bereits im Mai 2020 wurde vom National Center for Infectious Diseases in Singapur ein Positionspapier herausgegeben (<https://www.ncid.sg/Documents/Period%20of%20Infectivity%20Position%20Statementv2.pdf>), welches darauf hinweist, dass

1. Es wichtig ist, dass der Nachweis viraler RNA durch die PCR weder einer Infektiosität, noch einem vermehrungsfähigem Virus entspricht („it is important to note that viral RNA detection by PCR does not equate to infectiousness or viable virus“)
2. Der Grenzwert (cycle threshold value CT) der PCR weist als **Surrogatmarker** für den Gehalt an viraler RNA bereits ab einem **CT von 30** zwar noch virale RNA nach, nicht mehr jedoch die Anwesenheit von vermehrungsfähigen Viren und die betroffenen Personen sind nicht infektiös.

Originaltextauszug:

“6. A surrogate marker of ‘viral load’ with PCR is the cycle threshold value (Ct). A low Ct value indicates a high viral RNA amount, and vice versa. As noted above, **detection of viral RNA does not necessarily mean the presence of infectious or viable virus.** In a local study from a multicenter cohort of 73 COVID-19 patients, when the Ct value was 30 or higher (i.e. when viral load is low), no viable virus (based on being able to culture the virus) has been found.”

H) Auch das RKI erklärt auf seiner Homepage bereits zum Stand 11.08.2020

(https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html#doc13490982bodyText4) *“Erste Ergebnisse aus der Diagnostik am RKI zeigen, dass der Verlust der Anzüchtbarkeit in Zellkultur mit einer per real-time PCR (Anmerkung: ist die RT-qPCR) ermittelten RNA Menge von <250 Kopien/5 µL RNA einherging. Diese RNA-Konzentration entsprach im verwendeten Testsystem einem Ct-Wert >30.“*

I) Eine Studie aus Südkorea (<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2027040>) legt die Grenze zur Virusanzüchtbarkeit auf einen CT-Wert von 28,4.

J) Und in einer Studie aus Frankfurt (<https://www.mdpi.com/2077-0383/10/2/328>) zeigte sich, dass von 64 RT-qPCR positiven Patientenproben (ein Gen getestet) nur aus 33 (=52%) eine Virusanzucht in Zellkultur gelang. Diese infektiösen Proben wurden bereits bis zu einem mittleren CT-Wert von 26 positiv (Ergänzende Abbildung 1) wohingegen aus den Proben mit einem höheren CT keine Virusanzucht mehr gelang.

K) Der Grenzwert CT 25 wurde bereits im Dezember 2020 vom englischen „Office of national statistics (ONS)“ eingeführt, hier mit CT über 25 als negativ bewertet. Tabellenblatt 2 (Data) im verlinkten Excel-Datenblatt (link unten). Ergebnisse: *„Die Analyse zeigt: - Personen mit einer höheren Konzentration an viralen Erbmateriale (positive Fälle mit niedrigen Ct-Werten; unter 25) sind eher in einem Haushalt infektiös als solche mit niedrigeren Konzentrationen (positive Fälle mit hohen Ct-Werten; über 25)“.*

Im Original: *„The analysis shows: - People with a higher concentration of viral genetic material (positive cases with low Ct values; below 25) are more likely to be infectious in a household than those with lower concentrations (positive cases with high Ct values; above 25).“*
(<https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/conditionsanddiseases/adhocs/12683coronaviruscovid19infectionsurveycyclethresholdandhouseholdtransmissionanalysis>).

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

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

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

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

N) In der Covid-19 Infektionskontrollstudie aus England (<https://elifesciences.org/articles/64683>) analysierten die Autoren die Ergebnisse von SARS-CoV-2 PCR Testungen (3 Gene, kommerzieller Test von Thermo Fisher) in 3,3 mio Fällen. Insgesamt fanden sich 0.83% Test positive Abstriche mit einem mittleren CT Wert von 29,2, wobei es ausreichte wenn ein Gen der drei getesteten Zielgene, das N-Gen, alleine positiv war und auch ohne definierte CT Grenze. Hier zählten als „geringe Evidenz“ für eine Infektion diejenigen Personen, die keine Symptome aufwiesen und nur 1 Gen mit einem CT von 34 oder höher aufwiesen, wohingegen die „sehr wahrscheinlichen“ Fälle Symptomen und zwei oder drei positiven Zielgenen gewertet wurden.

Interessanterweise korrelierte ein niedriger CT (24,9) mit einer späteren Antikörpernachweisbarkeit im Serum (als Indiz für eine echte Infektion) wohingegen Testergebnisse mit hohem CT-Werten (über 33) meist ohne Antikörperreaktion in den betroffenen Personen einhergingen und damit auf eine fehlende echte Infektion hinweisen.

O) Im Vergleich kommerzieller PCR-Testkits (http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag_tab.), zeigt sich die enorme Bandbreite der CT-Werte selbst bei hochstandardisierten Proben zwischen den verschiedenen Testkits und auch bezüglich der unterschiedlichen Zielgene. Auch die Ergebnisse der verschiedenen Ringversuche von Instand e.V. wären sehr spannend, sind aber weitgehend nicht öffentlich einsehbar und werden auch auf Anfrage nach Informationsfreiheitsgesetz unter Verschluss gehalten (<https://fragdenstaat.de/anfrage/herausgabe-der-auswertung-des-ringversuchs-der-gruppe-340-termin-4-2020/#nachricht-533736>) So schwankt hier bei einem übermittelten PDF der Versuchsreihe von Juni/Juli 2020 z.B. der CT für die gleiche definierte

verdünnten Probe von SARS-CoV-2 (Probennummer 340061) für die WHO-empfohlenen Gene zwischen 15-40 (E-Gen), 20-40,7 (N-Gen) und 19,5-42,8 (RdRp-Gen). Dies zeigt eindrucksvoll einen extremen Mangel an Teststandardisierung innerhalb der beteiligten (und zertifizierten) Labors.

P) Bei der Evaluation zweier standardisierter WHO-Kontrollen für die RT-qPCR durch mehrere Labors und verschiedenen RT-qPCR Ansätzen, (Bentley E, WHO/BS/2020.2402 abrufbar: <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2402>) zweigte sich für die Kontrollprobe 20/138 (eine synthetische Virenprobe mit der Wuhan1-Sequenz, in der Abbildung schwarze Linie) dass eine Genommenge von $10^{6,73}$ (Korrelation zu potentiell infektiöser Viruslast) im Schnitt bei einem CT von 23-24, eine Genommenge von $10^{5,73}$ (unterhalb der potentiell infektiösen Viruslast) bei einem CT von 25,5 - 26,5 als positiv gewertet wurde, so dass mit diesem Ansatz die potentiell infektiöse Viruslast von 10^6 viralen Genomen einem Bereich von CT23-26,5 liegen würde.

Für ein inaktiviertes SARS-CoV-2 (Probe 20/146, rote Linie in der Abbildung) mit definierter Virusmenge von $10^{7,7}$ in der Stocklösung zeigte sich ein positiver RNA Nachweis bereits bei einem CT von unter 20, bei $10^{6,7}$ lag der CT bei 22-23 und bei $10^{5,7}$ lag der CT bei 25,5 - 26, so dass auch bei einer definierten Probe mit den SARS-CoV-2 Viren ein Äquivalent zu einer infektiösen Dosis bereits bei einem CT von 22 bis 26 detektiert wird.

Im Folgenden die maßgebliche Abbildung aus der Publikation Seite 63. Die standardisierten RNA-Ausgangsmengen sind für die Probe 20/138 unter Punkt 3 (Unitage) auf S. 66 mit 6.73 log10 IU/ml angegeben und für die Probe 20/146 auf Seite 64 unter Punkt 3 mit 7,7 log10 IU/ml

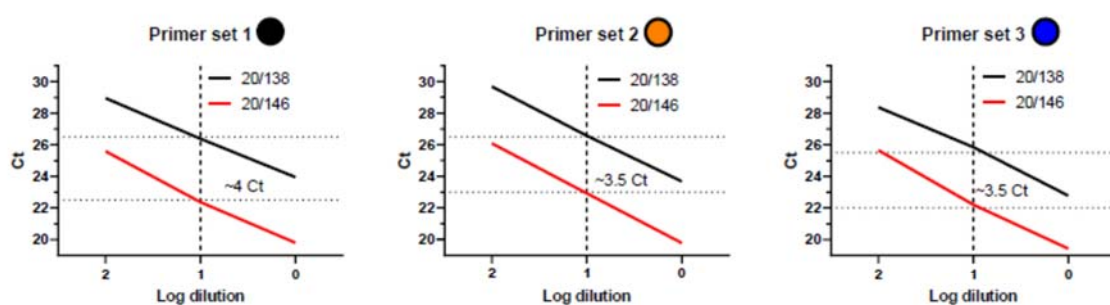


Figure 2. Relative potency of 20/138 compared to 20/146 by Real-time RT-PCR quantification using three primer sets. There is an approximate 0.5 Ct shift between the standard curves using primer set 1 which targets the region of lower coverage, in comparison to primer sets targeting the junction (primer set 2) and region of higher coverage (primer set 3).

3.3.3 Zwischenbewertung:

Vor diesem Hintergrund der o. aufgeführten Punkte A-O ist es befremdlich, wenn die RT-qPCR nach wie vor vom RKI als „Gold-Standard“ angesehen wird, ohne die exakten Validierungen und externen Zertifizierungsbedingungen und Zielwerte des CT zu definieren (und ohne dass diese von den Behörden offensichtlich vollumfänglich überwacht werden).

Generell kann eine RT-qPCR schon aufgrund der methodischen Vorgänge keine intakten, vernehmungsfähigen (infektiösen) Viren nachweisen, nicht einmal das komplette intakte Virusgenom, sondern ausschließlich Nukleinsäure des gesuchten Abschnitts. Es ist generell möglich, bei gut eingestellten und korrekt durchgeführten PCR-Tests **durch Validierung mit einer parallel durchgeführten Virusanzucht in Zellkultur** einen Grenzwert (CT) zu definieren, ab dem ein positives PCR-Signal nicht mehr mit vernehmungsfähigen Viren korreliert. Diese ist in der Überwachung von Blutprodukten seit Jahren gut geübte Routine.

Diese stringente Validierung erlaubt dann - solange das Testsystem NICHT verändert wird - als Surrogatmarker eine Abschätzung der Viruslast und damit der möglichen Infektiosität der getesteten Probe, nie allerdings jedoch den definitiven Nachweis. Sobald eine Komponente am PCR-Testsystem (seien es Chemikalien, Plastikwaren, Enzyme, Protokollabläufe oder Maschinen) in einem der angewendeten Schritte verändert wird, muss zwingend das System wieder neu kalibriert werden.

Aus allen bisher publizierten Informationen (siehe oben) kann geschlossen werden, dass jeder CT-Wert über 35 nicht mehr mit einer Anzüchtbarkeit infektiöser Viren einhergeht und damit der absolute Grenzwert für die Entscheidung „positiv“ ist, auch unabhängig vom verwendeten Testsystem. Der CT-Bereich 25-35 ist testabhängig möglicherweise noch valide als Surrogatmarker für „positiv im Sinne einer potentiell für eine Infektiosität ausreichenden Viruslast“ zu bewerten, wenn er, wie beschrieben, durch adäquate Validierung im durchführenden Labor mit einer Virusanzucht verglichen wurde.

CT ≤ 25	: positiver Genomnachweis hohe mRNA Last in der Probe
CT 26-35	: nur positiv, wenn mit Virusanzucht abgeglichen
CT > 35	: negativ

Die strenge Bewertung des CT-Wertes spielt vor allem eine Rolle, wenn die nur ein Genabschnitt in der PCR getestet wird, gilt aber generell für jedes einzelne Target.

3.4. Adäquate Kontrollen

Um die **Sensitivität** und **Spezifität** einer RT-qPCR korrekt einschätzen zu können, müssen bei jedem Reaktionsdurchlauf adäquate Proben mitgeführt werden. Dies beginnt bei der Teststelle mit „Leerabstrichen“, um Kontaminationen am Probengewinnungsort sicher auszuschließen, geht weiter über Extraktionskontrollen, um die korrekte Isolation vermehrbarer RNA mit allen anschließenden Bearbeitungsschritten sicherzustellen, d.h. eine künstlich hergestellte definierte RNA oder - zu bevorzugen - inaktivierte Virusisolate definierter Konzentration, welche in allen Arbeitsschritten der Probenaufbereitung bis hin zur PCR mitgeführt und bearbeitet wird und für die dann mithilfe passender Primer auch die PCR durchgeführt wird. Hiermit kann ausgeschlossen werden, dass im Rahmen der Probenbearbeitung hemmende Substanzen oder Fehler die Amplifikation von RNA verhindern.

Solche definierten Kontrollen stehen seit Dezember 2020 über die WHO (siehe Punkt 3.3.2P, Quelle: <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2402>) und sogar seit November 2020 über Instant e.V. zur Verfügung. Aus dem Begleitheft zum Versand der definierten

(https://www.instand-ev.de/fileadmin/uploads/user_upload/Dokumente/Virologie/20210118g_Begleitheft_-_quantitative_Bezugsproben_1_und_2_-_SARS-CoV-2.pdf) lassen sich generell folgende

Aspekte erkennen:

- Es wurde als Kontrolle der Stamm BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 als hitzeinaktivierte Probe mit kontrollierter Virenzahl eingesetzt, die 10^6 und 10^7 RNA-Kopien/ml entsprachen, da hier die Schwelle zur Einschätzung der Patienten als „wahrscheinlich kontagiös“ angesetzt wurde (in: 2.2. Verwendungszweck). Dieser Stamm wurde laut Datenbank (<https://www.european-virus-archive.com/virus/human-2019-ncov-isolate>) am 28.01.2020 in München gewonnen und wird über die Charité verkauft.
- Abhängig von den getesteten Genen und dem ausführenden Labor zeigte sich eine große Bandbreite der CT-Werte trotz definierter Probe in Referenzlabors. Dieser CT Wert schwankte z.B. für das E-Gen für die Probe mit 10^6 Kopien/ml zwischen 21,9 (Labor 4) und 28,7 (Labor 1) ; für das RdRp-Gen zwischen 24,8 (Labor 4) und 33,0 (Labor 1). Über alle Tests aus rückmeldenden Labors ergab sich für diese Probe eine Streuung der CT-Werte von 12-38 (Abbildung 2) und für die höher konzentrierte Probe eine Streuung der CT-Werte von 10-36. Allein dieses Beispiel zeigt, dass jedes Labor immer in jeder Testserie die definierten Proben mitführen muß, um den laboreigenen CT-Wert auf die Viruslast umrechnen zu können, die die eigentliche Bezugsprobe zur Beurteilung der getesteten Patientenprobe darstellen sollte.

Die extreme Schwankungsbreite der CT-Werte in den verschiedenen Testsystemen thematisiert C. Drosten in seinem NDR-Podcast 94 vom 22.06.2021

(<https://www.ndr.de/nachrichten/info/coronaskript306.pdf>) wie folgt: „Und zwar die Ct-Werte, die wir hier haben, die sind zwischen den einzelnen Testherstellern nicht so ohne Weiteres vergleichbar.“....“ Aber nur so lange, wie wir uns in demselben Testsystem bewegen, können wir die zahlenmäßig vergleichen. Die Unterschiede sind da zum Teil erheblich. Es gibt Testhersteller, bei denen ist ein Wert von sagen wir mal 25 überhaupt nichts Besorgniserregendes, während derselbe Wert von 25 in dem Test eines anderen Herstellers zeigt, dass das schon ernsthaft eine infektiöse Konzentration ist. **Das liegt einfach daran, dass diese Testhersteller nicht auf den Ct-Wert standardisieren.**“ (Seite 17) Weiter beklagt er, dass diese Standardisierung mit (von ihm) hergestellten Kalibrationen nicht stattfindet (S.18): „Was aber im Moment noch nicht passiert ist, dass flächendeckend auf dieser jetzt geschaffenen technischen Laborbasis auch Empfehlungen von den Landesgesundheitsämtern oder auch vom Robert Koch-Institut für bestimmte Anwendungsbereiche ausgesprochen und angewendet werden.“ Bedeutet: seit Herbst 2020 wären geeignete Kontrollen zur Viruslastbestimmung vorhanden und müssten von den Behörden für die Labors zur Validierung der Testergebnisse eingefordert werden, was aber offensichtlich (laut C. Drosten) nicht geschieht. „Wir können das eben sogar so, dass dieses inhärente Problem der Nichtvergleichbarkeit der Ct-Werte schon gelöst ist. Wohlgemerkt im Herbst. Die Technik und die Labortestung ist hier nicht der Haken, sondern es ist wieder mal die Umsetzung und die Regulation.“

3.4.1. Bereitstellung adäquater Kontrollen:

Ferner muss in jeder korrekten Testserie eine Reihe von externen (d.h. parallel wie Patientenproben mitgeführten) Negativkontrollen sowie eine Positivkontrolle, die im Idealfall aus einem inaktivierten definierten SARS-CoV-2 Virusstamm besteht. Dies wäre eine ureigene Aufgabe des RKI (unter Mithilfe anderer, geeigneter öffentlicher Einrichtungen wie die Bernhard Nocht-Institut oder dem Friedrich-Löffler Institut), in den dort vorhandenen Labormöglichkeiten (der Sicherheitsstufe 4) eine ausreichende Anzahl der SARS-CoV-2 Viren aus Patientenproben zu isolieren, daraus definierte Stämme als Kontrollen zu kultivieren, diese zu inaktivieren und in definierten Viruszahlen über die lokalen Aufsichtsbehörden als Kontrollen an die testenden Labors abzugeben. Nachdem diese wichtige Dienstleistung jedoch selbst nach über einem Jahr der „Pandemie“ nach wie vor nicht angeboten wird, besteht die Positivkontrolle meist aber aus einer synthetischen RNA, welche nur die Zielgene des Testsystems kodiert. Über diese Positivkontrolle kann auch die untere Nachweisgrenze der PCR bestimmt werden. Diese wird von einigen kommerziellen Kits mit 20 oder weniger viralen Genomen je Probe angegeben und weist damit (siehe Punkt 1.3.2.) bereits eine Virusmenge im Abstrich nach, welche um den Faktor 10^5 unter der infektiösen Dosis liegt, bedeutet: keinerlei diagnostischen/prognostischen Wert hat. Eine Übersicht über die aktuell eingesetzten kommerziellen Kits mit ihren Leistungsdaten findet sich unter http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag_tab.

3.4.2. Ringversuche: Auffälligkeiten beim ersten Ansatz

Zu den korrekt durchgeführten Kontrollen gehört auch die Teilnahme der Test durchführenden Labors an sogenannten „Ringversuchen“. Bei diesen wird von einem externen Anbieter ein anonymisiertes Panel an Testproben zur Verfügung gestellt. Diese enthalten im Falle des Virusnachweises negative Proben und Proben mit nahe verwandten Viren (inaktiviert) zur Überprüfung der Spezifität (diese Proben dürfen kein positives Signal ergeben) und Positivproben mit verschiedenen Verdünnungen des gesuchten Virus (inaktiviert), um die Sensitivität (ab welcher Virenanzahl wird die PCR positiv, mit welchem CT-Wert) zu ermitteln.

Versuch von Instant e.V.

Im Fall von SARS-CoV-2 erfolgte der erste Ringversuch „Virusgenom-Nachweis - SARS-CoV-2 (340)“ durch den Verein „INSTANT e.V.“ bereit im April 2020. An diesem Ringversuch nahmen laut Bericht 488 Labors teil, von denen 463 Ergebnisse zurückmeldeten. Die Ergebnisse können im publizierten Kommentar (Zeichhardt M: *Kommentar zum Extra Ringversuch Gruppe 340 Virusgenom-Nachweis SARS-CoV-2*“, verfügbar unter: <https://corona-ausschuss.de/wp-content/uploads/2020/07/Instand-Ringversuch-Virusgenom-Nachweis-SARS-CoV-2.pdf>) nachgelesen werden und zeigen zwei Abweichungen von dem üblichen Ringversuchsprozedere, welche bereits hier auf Laborprobleme mit der RT-qPCR zum Nachweise von SARS-CoV-2 hinwiesen: So heißt es auf Seite 4 der Publikation: *„Wichtige Mitteilung zur Auswertung: Nur 4 der 7 Proben, die im diesem Extra-Ringversuch untersucht wurden, werden für die Erlangung eines Zertifikats über die erfolgreiche Teilnahme berücksichtigt“*. In der Fußnote auf Seite 10 des Kommentars heißt es: *„In der Zwischenauswertung vom 17. April 2020 wurden allen Teilnehmern des Extra INSTAND Ringversuchs (340) Virusgenom-Nachweis von SARS-CoV-2 April 2020 die Probeneigenschaften der Proben 340059, 340060 und 340064 vorzeitig mitgeteilt. Die Ergebnisse dieser 3 Proben bleiben für die Erteilung eines Zertifikats unberücksichtigt [...]“* Der Grund für diesen Ausschluss bestimmter Proben wird auf Seite 4 des Kommentars dargelegt: *„Während der Extra-Ringversuch noch lief, erhielt INSTAND e.V. aus dem In- und Ausland dringliche Anfragen, noch vor Ende der verlängerten Abgabefrist, also vor dem 28. April 2020, die Eigenschaften der zu untersuchenden Proben aufzudecken, damit Laboratorien bei etwaigen Fehlmessungen ihre Testmethode kurzfristig verbessern können.“* (Seite 4 oben im Bericht von INSTANT e.V.))

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

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

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

Abgesehen von der erschreckenden Tatsache, dass offensichtlich selbst unter hoch standardisierten Abläufen in einem Ringversuch eine erhebliche Anzahl von Proben vertauscht wurden (was die Frage nach der entsprechenden Quote an Probenvertauschungen und damit falsch zugeordneten Abstrichproben unter Massentestbedingungen aufwirft), fällt auf, dass alle gemeldeten Verwechslungen nur diese beiden Proben betrafen, nicht jedoch die ebenfalls bewertete Proben mit der Endziffer 61 (sehr hoch verdünntes SARS-CoV-2) und 62 (negativ). Die detaillierten Ergebnisse eines zweiten Ringversuchs aus Juni/Juli 2020 (<https://www.instand-ev.de/System/rv-files/Zusammenfassung%20der%20Probeneigenschaften%20und%20Sollwerte%20Virologie%20340%20Juni%20Juli%202020%2020200911a.pdf>) sind nach wie vor nicht öffentlich detailliert einsehbar.

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

3.5.1 Kontamination innerhalb des Labors durch Fehler in der Durchführung

Das beste PCR-Design kann dennoch zu falsch positiven Ergebnissen führen, wenn entweder die zugrundeliegenden Reagenzien / Kits mit positiven Proben kontaminiert sind, oder, sehr viel wahrscheinlicher, **Kontaminationen im Laborablauf** entstehen. Da die PCR eine extrem empfindliche Methode ist (exponentieller Reaktionsverlauf), die wenige Moleküle einer DNA nachweisen kann, ist in der klinischen Diagnostik die Laborkontamination durch PCR Endprodukte ein Hauptproblem (beschrieben z.B. bereits 2004 in Aslanuadeh J et al., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1389111/>: „Eine typische PCR erzeugt bis zu 10^9 Kopien der Zielsequenz, und wenn sie verwirbelt wird, enthält selbst das kleinste Aerosoltröpfchen bis zu 10^6 Amplifikationsprodukte [6]. Unkontrolliert können in relativ kurzer Zeit durch die Bildung von Aerosolen mit Amplifikationsprodukten Laborreagenzien, Geräte und Belüftungssysteme kontaminiert werden [6].)

Im Original: „A typical PCR generates as many as 10^9 copies of target sequence and if aerosolized, even the smallest aerosol will contain as many as 10^6 amplification products [6]. If uncontrolled, within a relatively short time the buildup of aerosolized amplification products will contaminate laboratory reagents, equipment, and ventilation systems [6].)

Diese extreme Kontaminationsgefahr setzt voraus, dass in den diagnostischen Laboren, welche mit der PCR arbeiten, höchste Sorgfalt bei der Testung waltet - sehr fachkundiges Personal, kontaminationssichere Umgebung, permanente unabhängige Kontrolle.

Bereits im oben schon erwähnten Ringversuch 340 im April tauchte ein Problem mit falsch positiven Ergebnissen auf, welches wie folgt kommentiert wurde (Seite 20 unten): „*Zusätzlich weisen in einigen Fällen die Untersuchungen mit den SARS-CoV-2-negativen Kontrollproben 340060, 340062 und 340065 auf Spezifitätsprobleme hin, die unabhängig von Vertauschungen der Proben 340064 und 340065 sind. Es ist abzuklären, ob diese falsch positiven Ergebnisse auf ein Spezifitätsproblem der angewendeten Tests oder auf eine Verschleppung von SARS-CoV-2 bei der Testdurchführung bzw. auf Verwechslungen mit anderen Proben in diesem Ringversuch in den betreffenden Laboren zurückzuführen sind.*“ (Seite 21 unten in <https://www.instand-ev.de/System/rv-files/340%20DE%20SARS-CoV-2%20Genom%20April%202020%2020200502j.pdf>). Zur Verwechslung in diesem Ringversuch siehe Details weiter oben unter „Ringversuche“.

Wenn man vor diesem Hintergrund ferner sieht, wie z.B. nach einem BBC-Bericht in großen Testlaboren in England offen und extrem kontaminationsanfällig mit ungeschultem Personal gearbeitet wird (Film aktuell nicht mehr offen zugänglich <https://www.youtube.com/watch?v=Uk1VK1reNtE>), verwundert es nicht, wenn sich auch in Deutschland (wo es solche Beiträge bisher nicht gefilmt gibt) gelegentlich Meldungen über „falsch positive Fälle“ durch Laborkontaminationen in den Medien finden (Z.B. MVZ Augsburg - Link am Ende des Abschnitts).

Selbst unter kontrollierten Laborbedingungen sind Kontaminationen durch die Arbeitsschritte der PCR bei so einer hochempfindlichen Methode nicht sicher auszuschließen. So wurde auf die Problematik von falsch positiven PCR-Ergebnissen in der SARS-CoV-2 Diagnostik aufgrund von Laborabläufen und **bereits in der ersten Publikation** der RT-qPCR (Corman et al., DOI: [10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045)) hingewiesen: „*In four individual test reactions, weak initial reactivity was seen but they were negative upon retesting with the same assay*“ [.....] „.... **most probably to handling issues....**“

Ebenfalls ein Problem mit Kontaminationen, die zu falsch positiven Ergebnissen im Zusammenhang mit Genomen von SARS-CoV-2 bei einer von der Charité geleiteten Studie (unter anderem mit den Autoren Drosten und Landt aus der oben aufgeführten Arbeit Corman et al, welche die erste PCR für die WHO schon mit Kontaminationen beschreiben hat) geführt haben, zwang die Autoren sogar eine Science-Publikation zurückzuziehen. Begründung u.a. „*Wir fanden eine Mischung aus verschiedenen SARS-CoV-2 Genom Fragmenten die einige der Proben kontaminiert haben....*“ Im Original: „*We found a mixture of different SARS-CoV-2 genomic fragments contaminating some of the samples*“. ANNEX 5

Selbst die “Goldstandard-Labors” der Charité um Herrn Drosten haben also offen eingestanden und publiziert deutliche Probleme mit der Kontamination durch

Genomfragmente von SARS-CoV-2, welche zu falsch positiven Ergebnissen in der diagnostischen PCR als auch der Genom (Varianten-) Analyse führen können.

3.5.2. Kontamination der Materialien/Reagenzien ab Hersteller

Selbst wenn der Handlungsablauf im Labor optimal und extrem überwacht funktioniert, um laborbedingte Kontaminationen stark zu minimieren, kann hier eine unerwartete Quelle für falsch positive Ergebnisse in der **Kontamination der eingesetzten Materialien/Chemikalien ab Hersteller entstehen**. So können bereits die zur Probenentnahme verwendeten Abstrich Materialien ab Werk kontaminiert sein - wie z.B. beim Falle des „Phantoms von Heilbronn“, in welchem die Wattestäbchen zur Abnahme der DNA-Spuren an den Tatorten mit der DNA einer Verpackungskraft des Herstellerwerkes verunreinigt waren und so jahrelang die Forensik mit falschen Spuren behinderte (<https://www.faz.net/aktuell/gesellschaft/kriminalitaet/dna-ermittlungspanne-das-phantom-von-heilbronn-ist-widerlegt-1925411.html>).

Auch im Falle der SARS-CoV-2 Diagnostik wurde bereits im Juni 2020 ein Kontaminationsproblem aufgrund ab Werk mit Positivkontrollen versetzter PCR Primer publiziert (Wernike et al., DOI: [10.1111/tbed.13684](https://doi.org/10.1111/tbed.13684)). Hier war aufgefallen, dass selbst reine Wasserproben mit mehreren unabhängigen Primerchargen einen eindeutig positiven SARS-CoV-2 Nachweis in der RT-qPCR ergaben: *„However, there were also primers/probe sets that displayed very **low-level contaminations**, which were detected only during thorough internal validation.“*

Auch einige in der Tagespresse im Sommer 2020 berichteten falsch-positiven Ergebnisse der SARS-CoV-2 RT-qPCR Testung wurden Materialproblemen zugeordnet (z.B. <http://web.archive.org/web/20210111010037/https://www.br.de/nachrichten/bayern/probleme-in-augsburger-labor-bringen-falsche-testergebnisse,SEh5Qq4>)

3.5.3. Zwischenbewertung:

Selbst bei idealem RT-qPCR-Design und guter Laborpraxis mit adäquater Validierung können Probleme im täglichen Handlungsablauf sowie von außen über bereits ab Werk kontaminierten Proben die Ergebnisqualität der RT-qPCR wesentlich beeinflussen und zu falsch positiven Ergebnissen führen.

3.6. Kommerzielle PCR Testkits

Bereits sehr früh wurden kommerzielle PCR-Testsysteme, die „PCR-Kits“ in den Routinelabors zur Diagnostik eingesetzt, obwohl ein Großteil davon nur für „RUO“ (research use only“) deklariert war.

Besonders herauszustellen ist hierbei der erste, und daher prägnanteste Testhersteller, die Berliner Fa. TIB Molbiol, deren Firmeninhaber (Olfert Landt) bereits auf dem WHO-

Protokollempfehlungen neben Christian Drosten als Autor aufgeführt war. Die Kits, welche entsprechend auf den WHO-Empfehlungen beruhen, werden über die Fa. Roche auf deren Großautomaten „Cobas“ eingesetzt und dürften daher neben weiteren Anbietern (siehe <https://www.vdgh.de/covid-19/sars-cov-2-und-die-industrie/hersteller/artikel16741> Liste der Testhersteller) nach wie vor den Großteil der zur Routinediagnostik eingesetzten Kits in Deutschland ausmachen. Interessanterweise geben viele Testhersteller hier auch das „E-Gen“ als Hauptnachweisziel an und bleiben damit eng an der ursprünglichen WHO Empfehlung.

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

Inzwischen (Stand Juni 2022) gibt es eine große Bandbreite von PCR Nachweissystemen (https://www.theglobalfund.org/media/9629/covid19_diagnosticproducts_list_en.pdf) von denen auch viele für die In vitro Diagnostik (IVD) von SARS-CoV-2. zugelassen sind. In der exemplarischen Beschreibung eines dieser kits (https://www.genesig.com/assets/files/Path_COVID_19_CE_STED_IFU_Issue_500.pdf) liest sich unter 1. „Intended use“ (bestimmungsgemäßer Gebrauch): **“Positive Ergebnisse sind ein Hinweis auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA. Positive Ergebnisse schließen eine Co-Infektion mit anderen Bakterien oder anderen Viren nicht aus. Negative Ergebnisse schließen eine SARS-CoV-2-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen zur Patientenbehandlung verwendet werden. Positive und negative Ergebnisse müssen mit klinischen Beobachtungen, der Patientengeschichte und epidemiologischen Informationen kombiniert werden.”** im Original: **“Positive results are indicative of the presence of SARS-CoV-2 RNA. Positive results do not rule out co-infection with other bacteria or other viruses. Negative results do not preclude SARS-CoV-2 infection and should not be used as the sole basis for patient management decisions. Positive and Negative results must be combined with clinical observations, patient history, and epidemiological information”**

4. Zusammenhang positiver Nukleinsäure-Nachweis in der RT-qPCR mit Erkrankung und Infektiosität

Nur tatsächlich Infizierte mit sich vermehrendem und auch von den Zellen nach außen abgegebenen Viren in ausreichender „infektiöser“ Menge können das Virus weitergeben und bergen das Risiko einer Erkrankung und sind damit für die Bestimmung des Verlaufs einer Infektionsrate und Erkrankungswelle heranzuziehen

*„Der PCR-Nachweis ist die Standarduntersuchung zur Diagnose von Virusinfektionen wie SARS-CoV-2. **Der Test weist einzelne Erregergene, jedoch keine intakten Erreger nach.**“* Und: *„Es besteht die Möglichkeit, dass der Test über die Dauer der Infektion hinaus positiv ausfällt, weil noch „Virusrümpfe“ in Nase oder Rachen vorhanden sind. **Ein sicherer Nachweis der Infektiosität ist nur mit aufwendigen Tests möglich, bei denen im Labor untersucht wird, ob das Material aus den Abstrichen lebende Zellen abtöten kann.**“* Dies schrieb das Dt. Ärzteblatt am 01.02.2021 (<https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/120745>). Auch das CDC weist unter „Disadvantages“ der NAATs (nucleic acid amplification tests = PCR) darauf hin, dass *„Ein positiver NAAT-Diagnostetest sollte nicht innerhalb von 90 Tagen wiederholt werden, da Personen weiterhin nachweisbare RNA haben können, nachdem das Risiko einer Übertragung vorüber ist“* im Original: *„A positive NAAT diagnostic test should not be repeated within 90 days, since people may continue to have detectable RNA after risk of transmission has passed“* (unten in der summary table auf: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#previous>)

„Der PCR-Test detektiert Genabschnitte von SARS-CoV-2; er sagt nichts darüber aus, ob es sich um infektiöse Viren oder um Virusreste nach durchgemachter Infektion handelt. Hierzu wäre eine Erregeranzucht erforderlich.“ War in einer Veröffentlichung des Leiters des Frankfurter Gesundheitsamtes aus dem August 2020 zu lesen ([https://www.laekh.de/fileadmin/user_upload/Heftarchiv/Einzelartikel/2020/10_2020/Die Covid-19-Pandemie in Frankfurt am Main.pdf](https://www.laekh.de/fileadmin/user_upload/Heftarchiv/Einzelartikel/2020/10_2020/Die_Covid-19-Pandemie_in_Frankfurt_am_Main.pdf)). Und in seinem Gutachten vom April 21 für einen Gericht in Heidelberg (Anonymisiert hier einzusehen: <https://www.corodok.de/wp-content/uploads/2021/05/Gutachten-Prof.-Drosten-v.-31.3.2021-anonymisiert.pdf>) bestätigt der Fachgutachter C. Drosten, dass ein RT-PCR Test auch dann positiv werden kann, wenn *„zumindest der nachzuweisende Abschnitt aus dem Erbgut des Virus in der getesteten Probe vorliegt.“* , bedeutet: auch Erbgutfragmente können ohne dass sei aus einem intakten, vernehmungsfähigem Virus stammen, bereits in er PCR positive Ergebnisse liefern, damit auch in nicht infektiösen Proben einen vermeintlichen Virusnachweis erbringen.

In einer CDC-Veröffentlichung vom 13.07.20 unter der Überschrift *„CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel For Emergency Use Only Instructions for Use“*, (<https://www.fda.gov/media/134922/download>) findet sich auf S. 38 unter der (noch auf S. 37 zu findenden) Überschrift *„Limitations“* :

“• Detection of viral RNA may not indicate the presence of infectious virus or that 2019-nCoV is the causative agent for clinical symptoms.”

Die Übersetzung lautet: „Der Nachweis von viraler RNA weist möglicherweise nicht auf das Vorhandensein eines infektiösen Virus hin oder darauf, dass 2019-nCoV der ursächliche Erreger für klinische Symptome ist.“

Dass ein reiner mRNA-Nachweis von SARS-CoV-2 nicht zwingend mit einer Erkrankung korrelieren muss und nicht als alleiniges Kriterium für die Beurteilung der Erkrankung herangezogen werden darf, sondern nur ein Hilfsmittel zur Bestätigung einer klinischen Diagnose darstellt, wird auch eindeutig in der WHO Information „Notice for IVD Users 2020/05, Nucleic acid testing (NAT) technologies that use polymerase chain reaction (PCR) for detection of SARS-CoV-2“ vom 13.01.2021 (veröffentlicht am 20.01.2021 unter <https://www.who.int/news/item/20-01-2021-who-information-notice-for-ivd-users-2020-05>) beschrieben: „Wenn die Testergebnisse **nicht mit dem klinischen Bild** übereinstimmen, sollte eine neue Probe entnommen und mit der gleichen oder einer anderen NAT-Technologie erneut getestet werden.“ - im Original: „Where test results do not correspond with the clinical presentation, a new specimen should be taken and retested using the same or different NAT technology.”

Ferner: „Die meisten **PCR-Assays sind als Hilfsmittel für die Diagnose** indiziert, daher müssen Gesundheitsdienstleister jedes Ergebnis in Kombination mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme, dem Probenotyp, den Assay-Spezifika, **klinischen Beobachtungen, der Patientenanamnese**, dem bestätigten Status aller Kontakte und epidemiologischen Informationen berücksichtigen.“ Im Original: “Most PCR assays are indicated as an aid for diagnosis, therefore, health care providers must consider any result in combination with timing of sampling, specimen type, assay specifics, clinical observations, patient history, confirmed status of any contacts, and epidemiological information”

Auch in einer Publikation in Lancet ([https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)00425-6/fulltext#%20](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)00425-6/fulltext#%20)) bezeichnen die Autoren den RT-qPCR Test wie folgt: “Unserer Ansicht nach **ist der aktuelle PCR-Test daher nicht der geeignete Goldstandard für die Bewertung eines SARS-CoV-2-Tests für die öffentliche Gesundheit**“ Im Original: „In our view, current PCR testing is therefore not the appropriate gold standard for evaluating a SARS-CoV-2 public health test“, da ihrer Meinung nach die PCR auch dann noch positiv anschlägt, wenn die Getesteten schon nicht mehr positiv sind, da die RNA über Wochen und Monate auch nach erfolgreicher Bekämpfung durch das Immunsystem weiter im Körper persistieren kann, ohne dass die Person noch ansteckend ist. „Sobald die Replikation von SARS-CoV-2 durch das Immunsystem unter Kontrolle gebracht wurde, sinken die mittels PCR in den Atemwegssekreten nachweisbaren RNA-Konzentrationen auf sehr niedrige Werte, bei denen es sehr viel unwahrscheinlicher ist, dass die Betroffenen andere infizieren. **Die verbleibenden RNA-Kopien**

können Wochen, gelegentlich auch Monate, benötigen, bis sie verschwunden sind, während dieser Zeit bleibt die PCR positiv“ im Original: „Once SARS-CoV-2 replication has been controlled by the immune system, RNA levels detectable by PCR on respiratory secretions fall to very low levels when individuals are much less likely to infect others. The remaining RNA copies can take weeks, or occasionally months, to clear, during which time PCR remains positive“

In einer Publikation in Science unter Federführung von C. Drosten vom Mai 2021 (DOI: [10.1126/science.abi5273](https://doi.org/10.1126/science.abi5273)), in welcher die Infektiosität von SARS-CoV-2 untersucht wird, definieren die Autoren gleich im ersten Satz des Abstractes die Parameter für die Quantifizierung und mögliche Weitergabe des Virus als „.... sind die Virale Last und ob die Proben ein vermehrungsfähiges Virus Isolat in Zellkultur enthalten“ Im Original: „...are viral load and whether samples yield a replicating virus isolate in cell culture.“ Sie führen in der Einleitung ferner aus, dass die virale Last über die virale RNA-Konzentration ermittelt wird und die erfolgreiche Virusisolation in Zellkulturansätzen. Ferner weisen sie darauf hin, dass selbst die **„Viruslast und die Zellkulturinfektiosität nicht direkt auf die Infektiosität in vivo übertragen werden können** und der Einfluss des sozialen Kontextes und des Verhaltens auf die Übertragung sehr hoch ist, kann man im Allgemeinen davon ausgehen, dass diese quantifizierbaren Parameter am ehesten mit der Übertragungswahrscheinlichkeit in Verbindung gebracht werden.“ Im Original: „ While viral load and cell culture infectivity cannot be translated directly to in vivo infectiousness, and the impact of social context and behavior on transmission is very high, these quantifiable parameters can generally be expected to be those most closely associated with transmission likelihood“.

In seinem NDR Podcast 94 vom 22.06.2021 (<https://www.ndr.de/nachrichten/info/coronaskript306.pdf>) Seite 16 geht C. Drosten auf den Zusammenhang Ct-Wert und Infektiosität wie folgt ein: „....dass ein Fall, nur weil der Patient in diesem Moment **einen hohen Ct-Wert hat, also weil er vielleicht nicht infektiös ist** jetzt im Moment, also der hat wenig Virus, der hat Virus, aber der hat wenig Virus,....“

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

1. Vor dem Hintergrund der hier dargelegten Probleme und technischen Limitationen ist die RT-qPCR kein geeignetes zuverlässiges (und zugelassenes) Diagnostikmittel zum Nachweis von infektiösen (replikationsfähigen) SARS-CoV-2 Viren.
2. Ferner ist das reine RT-qPCR Testergebnis nur ein Laborwert, der angesichts der dargelegten Aspekte niemals eine valide Aussage über das Vorhandensein infektiöser Viren erlaubt und nur in Zusammenschau mit einer klinischen Symptomdiagnose (erhoben durch Gesundheitsdienstleister, in Deutschland Mediziner) überhaupt zur Abschätzung einer möglichen Virusinfektion eingesetzt werden darf.

Zusammenfassung:

Zur Testung asymptomatischer und selbst symptomatischer Menschen anhand eines Nasen-Rachenabstrichs, wie er massenweise unkritisch und überwiegend von nicht-medizinischen Personal OHNE (hierbei entscheidend: entgegen der WHO-Forderung!) Anamnese- und Symptomerhebung bei den Getesteten erfolgt, ist die eingesetzte RT-qPCR in jeglicher Form nicht tauglich, eine Infektion und vor allem eine Infektiosität mit SARS-CoV-2 zu erkennen.

Bewertung der Begriffe "asymptomatischer Patient" und "positiver Patient" in Bezug auf RT-qPCR-getestete Personen auf SARS-CoV-2

Nach den Definitionen (siehe unten) ist der Begriff asymptomatischer Patient für gesunde Personen, die nur PCR-positiv waren, ohne irgendwelche Symptome zu haben, unsinnig.

Da der Begriff "Patient" per se einen medizinischen Zustand umfasst, der eine professionelle medizinische Betreuung erfordert, kann eine RT-qPCR-positive Person nur dann als Patient definiert werden, wenn sie Symptome hat. Letztere (Symptome) entsprechen dem Begriff "Infektion", da eine Person nur dann als infiziert gelten kann, wenn ihr Körper auf einen eingedrungenen und sich vermehrenden Erreger reagiert.

Definition des CDC für Covid-19 Patienten (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>)

Bei Menschen, die sich mit COVID-19 infiziert haben, wurde ein breites Spektrum von Symptomen berichtet, das von leichten bis zu schweren Erkrankungen reicht. Die Symptome können 2-14 Tage nach dem Kontakt mit dem Virus auftreten. Jeder kann leichte bis schwere Symptome haben. Menschen mit diesen Symptomen können COVID-19 haben:

Symptome

- Fieber oder Schüttelfrost
- Husten
- Kurzatmigkeit oder Atembeschwerden
- Müdigkeit
- Muskel- oder Körperschmerzen
- Kopfschmerzen
- Neuer Verlust von Geschmack oder Geruch
- Halsschmerzen
- Verstopfung oder laufende Nase
- Übelkeit oder Erbrechen
- Diarrhöe

Ein "PCR-positiver Patient" ist also eine Person **mit Symptomen** (hier Symptome einer Atemwegserkrankung/Symptome einer Virusinfektion),

Im Original:

People with COVID-19 have had a wide range of symptoms reported – ranging from mild symptoms to severe illness. Symptoms may appear 2-14 days after exposure to the virus. Anyone can have mild to severe symptoms. People with these symptoms may have COVID-19: Fever or chills

- Cough
- Shortness of breath or difficulty breathing
- Fatigue
- Muscle or body aches
- Headache
- New loss of taste or smell
- Sore throat
- Congestion or runny nose
- Nausea or vomiting
- Diarrhea

Folglich ist eine Person ohne eines der genannten Symptome weder infiziert noch ein Patient, unabhängig von den RT-qPCR-Ergebnissen.

Infektion:

Zusammenfassung aus den nachstehenden Quellen:

Eine Infektion ist definiert als eine Situation, in der mindestens die folgenden drei Aspekte zusammen auftreten:

- Invasion des Körpers durch Mikroorganismen (Keime) wie Bakterien oder Viren
- Diese eingedrungenen Mikroorganismen vermehren sich im Körper
- Und der Körper reagiert auf sie (Symptome)

Per Definition von einer Infektion oder einer infizierten Person zu sprechen, ist nur dann zutreffend, wenn alle drei oben genannten Aspekte gegeben sind.

Das bedeutet: ohne Symptome ("asymptomatisch") - bei der betroffenen Person kann keine Infektion definiert werden

Quellen:

1. <https://www.rxlist.com/infection/definition.htm>:

Das Eindringen und die Vermehrung von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Parasiten, die normalerweise nicht im Körper vorhanden sind.

2. Wikipedia:

Eine Infektion ist das Eindringen von Krankheitserregern in das Körpergewebe eines Organismus, ihre Vermehrung und die Reaktion des Wirtsgewebes auf die Infektionserreger und die von ihnen

produzierten Toxine.[1] Eine Infektionskrankheit, auch übertragbare Krankheit oder übertragbare Krankheit genannt, ist eine Krankheit, die durch eine Infektion verursacht wird.

Infektion

<https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/infection>

Eindringen und Vermehrung von Mikroorganismen in Körpergewebe, wie bei einer Infektionskrankheit. Der Infektionsprozess ähnelt einer kreisförmigen Kette, wobei jedes Glied einen der am Prozess beteiligten Faktoren darstellt. Eine Infektionskrankheit tritt nur auf, wenn jedes Glied vorhanden ist und in der richtigen Reihenfolge.

Diese Verbindungen sind

- (1) der Erreger, der in ausreichender Zahl und Virulenz vorhanden sein muss, um normales Gewebe zu zerstören;
- (2) Reservoir, in denen der Erreger gedeihen und sich vermehren kann, z. B. Körpergewebe und Ausscheidungen von Menschen, Tieren und Insekten sowie kontaminierte Lebensmittel und Wasser;
- (3) eine Pforte, durch die der Erreger den Wirt verlassen kann, wie z. B. die Atemwege oder der Darmtrakt;
- (4) einen Übertragungsweg, z. B. durch die Hände, Luftströmungen, Vektoren, Fomiten oder andere Mittel, durch die die Erreger von einem Ort oder einer Person zu einer anderen übertragen werden können, und
- (5) eine Eintrittspforte, durch die die Erreger in den Körper eines (6) empfänglichen Wirtes gelangen können.

Offene Wunden und der Atem-, Darm- und Fortpflanzungstrakt sind Beispiele für Eintrittspforten. Der Wirt muss für die Krankheit empfänglich sein, d. h. er darf keine Immunität gegen die Krankheit besitzen oder muss über keine ausreichende Widerstandskraft verfügen, um die Invasion der Krankheitserreger zu überwinden. Der Körper reagiert auf das Eindringen der Erreger mit der Bildung von ANTIKÖRPERN und einer Reihe von physiologischen Veränderungen, die als INFLAMMATION bezeichnet werden.

Im Original:

infection

invasion and multiplication of microorganisms in body tissues, as in an infectious disease. The infectious process is similar to a circular chain with each link representing one of the factors involved in the process. **An infectious disease occurs only if each link is present and in proper sequence.**

These links are

- (1) the causative agent, which **must be of sufficient number** and **virulence** to destroy normal tissue;
- (2) reservoirs in which the organism can thrive and reproduce; for example, body tissues and the wastes of humans, animals, and insects, and contaminated food and water;
- (3) a portal through which the pathogen can leave the host, such as the respiratory tract or intestinal tract;
- (4) a mode of transfer, such as the hands, air currents, vectors, fomites, or other means by which the pathogens can be moved from one place or person to another; and
- (5) a portal of entry through which the pathogens can enter the body of (6) a susceptible host.

Open wounds and the respiratory, intestinal, and reproductive tracts are examples of portals of entry. The host must be susceptible to the disease, not having any immunity to it, or lacking adequate resistance to overcome the invasion by the pathogens. The body responds to the invasion of causative organisms by the formation of [ANTIBODIES](#) and by a series of physiologic changes known as [INFLAMMATION](#).

<https://www.cdc.gov/infectioncontrol/spread/index.html>

Wie kommt es zu Infektionen?

Eine Infektion entsteht, wenn Keime in den Körper eindringen, sich vermehren und eine Reaktion des Körpers auslösen.

Drei Dinge sind notwendig, damit eine Infektion entsteht:

- Quelle: Orte, an denen Infektionserreger (Keime) leben (z. B. Waschbecken, Oberflächen, menschliche Haut)
- Anfällige Person mit einer Möglichkeit für Keime, in den Körper einzudringen
- Übertragung: ein Weg, auf dem die Keime zur anfälligen Person gelangen

Im Original:

How Do Infections Occur?

An infection occurs when **germs enter the body, increase in number, and cause a reaction of the body.**

Three things are necessary for an infection to occur:

- **Source:** Places where infectious agents (germs) live (e.g., sinks, surfaces, human skin)
- **Susceptible Person** with a way for germs to enter the body
- **Transmission:** a way germs are moved to the susceptible person

Patient:

Definition als Zusammenfassung aus den untenstehenden Quellen:

Ein Patient ist eine Person, die von professionellen Gesundheitsdienstleistern betreut wird, die Symptome von Krankheiten oder Verletzungen aufweist oder andere Einschränkungen der vollständigen Gesundheit zeigt.

Nach der Definition kann eine gesunde Person („asymptomatisch“) ohne medizinische Probleme nicht als "Patient" bezeichnet werden.

Wikipedia:

Als **Patient** bzw. **Patientin** (aus lateinisch *patiens* ‚leidend, erdulnd‘, Partizip Präsens Aktiv von *pati* ‚leiden, erdulden‘) wird ein Mensch bezeichnet, der ärztliche Dienstleistungen oder Dienstleistungen anderer Personen, die eine Heilbehandlung durchführen, in Anspruch nimmt. Dabei kann es sich um die Vorbeugung, Feststellung oder medizinische Behandlung von Krankheiten oder Folgen eines Unfalls handeln.

Im Englischen Wikipedia noch:

Das Wort Patient bedeutete ursprünglich "jemand, der leidet". Dieses englische Substantiv stammt vom lateinischen Wort *patiens* ab, dem Partizip Präsens des Deponens *patior*, was "ich leide" bedeutet, und ist mit dem griechischen Verb πάσχειν (= *paskhein*, leiden) und dem verwandten Substantiv πάθος (= *pathos*) verwandt.

Im Original:

The word **patient** originally meant 'one who suffers'. This English noun comes from the Latin word *patiens*, the present participle of the deponent verb, *patior*, meaning 'I am suffering,' and akin to the Greek verb πάσχειν (= *paskhein*, to suffer) and its cognate noun πάθος (= *pathos*).

Medicine net:

<https://www.medicinenet.com/patient/definition.htm>

Patient: Eine Person, die medizinisch versorgt wird. Die Person kann auf diese Versorgung warten, sie kann sie erhalten oder sie kann sie bereits erhalten haben. Über die genaue Bedeutung des Begriffs "Patient" herrscht große Uneinigkeit.

- Er wird unterschiedlich definiert, zum Beispiel als:
- Eine Person, die medizinische Versorgung benötigt.
- Eine Person, die medizinisch oder zahnmedizinisch versorgt oder behandelt wird.
- Eine Person, die wegen einer bestimmten Krankheit oder eines bestimmten Zustands von einem Arzt behandelt wird.
- Eine Person, die auf eine medizinische Behandlung oder Pflege wartet oder sich einer solchen unterzieht
- Eine Person, die benötigte professionelle Dienstleistungen erhält, die von einem zugelassenen Heilpraktiker zur Erhaltung, Verbesserung oder zum Schutz der Gesundheit

oder zur Linderung von Krankheit, Behinderung oder Schmerzen erbracht werden. (US Centers for Medicare & Medicaid Services)

- Ein kranker, verletzter oder verwundeter Soldat, der von medizinisch ausgebildetem Personal medizinisch versorgt oder behandelt wird. (US Army Medical Command)

Vom lateinischen Verb "patior", das "leiden" bedeutet, sowohl im Sinne von Schmerz empfinden als auch im Sinne von Nachsicht. Die beiden Verwendungen des Wortes "geduldig" - als Substantiv, das "jemand, der leidet" bezeichnet, und als Adjektiv, das "mit Nachsicht ertragen" bedeutet - gehen also auf denselben Ursprung zurück.

Im Original:

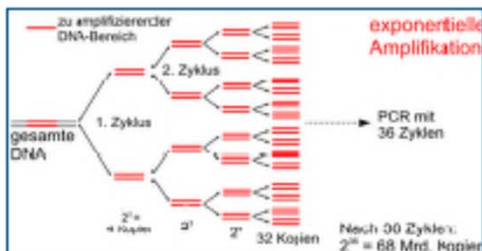
Patient: A person under health care. The person may be waiting for this care or may be receiving it or may have already received it. There is considerable lack of agreement about the precise meaning of the term "patient."

It is diversely defined as, for examples:

- A person who requires medical care.
- A person receiving medical or dental care or treatment.
- A person under a physician's care for a particular disease or condition.
- A person who is waiting for or undergoing medical treatment and care
- An individual who is receiving needed professional services that are directed by a licensed practitioner of the healing arts toward maintenance, improvement or protection of health or lessening of illness, disability or pain. (US Centers for Medicare & Medicaid Services)
- A sick, injured or wounded soldier who receives medical care or treatment from medically trained personnel. (US Army Medical Command)

From the Latin verb "patior" meaning "to suffer" both in the sense of feeling pain and in the sense of forbearance. Thus, the two uses of the word "patient" -- as a noun denoting "someone who suffers" and as an adjective meaning "to bear with forbearance" -- stem from the same origin.

Polymerase-Kettenreaktion

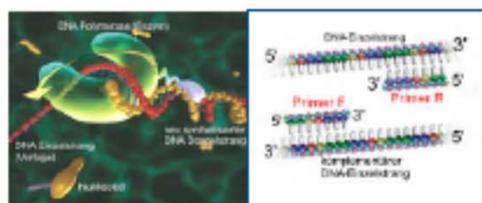


Polymerase-Kettenreaktion (PCR)?

Mit PCR (engl. polymerase chain reaction) wird ein vorbestimmter Abschnitt einer Erreger-DNA vervielfältigt. Als «Kopiermaschine» braucht es ein Enzym namens **Polymerase**, welches in einer Kettenreaktion aus sich wiederholenden Temperatur-Zyklen den gewünschten DNA-Abschnitt immer wieder verdoppelt und so eine messbare DNA-Menge generiert.

Vorteile: In 45 min können in einem Volumen von 20-50 µl bis zu zehn Erreger nachgewiesen werden.

Nachteile: Es können nur Erreger nachgewiesen werden, deren Gen-Sequenz bekannt ist. Ob ein Erreger infektiös (virulent, «lebendig») ist oder nicht bleibt unbekannt.



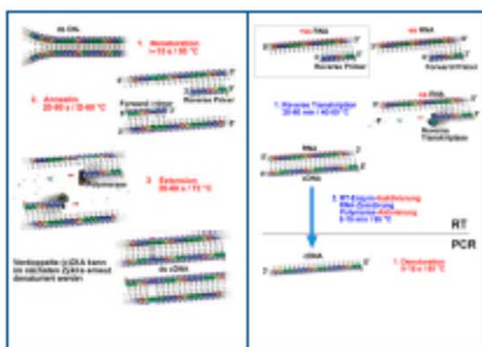
DNA-Polymerase und Oligonukleotide

Für die Vervielfältigung der DNA (**Amplifikation**) wird das Enzym **DNA-Polymerase** benötigt. Als Vorlage dient ein DNA-Einzelstrang des nachzuweisenden Erregers. Die passenden Nukleotide (dNTPs) werden durch die DNA-Polymerase zum Komplementärstrang verbunden.

Die DNA-Polymerase bindet aber nur dort an den DNA-Einzelstrang, wo eine kurze Doppelstrangstruktur als Startpunkt vorliegt. Dieser wird in der PCR mit der Zugabe von **Primer** bestimmt, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt definieren.

Ein Primer ist ein kurzes DNA-Stück bestehend aus 15-30 Nukleotiden, ein so genanntes **Oligonukleotid**. Für beide komplementären DNA-Einzelstränge des Erregers wird je ein Primer (Forward (F) & Reverse (R)) mit Hilfe von Softwares festgelegt.

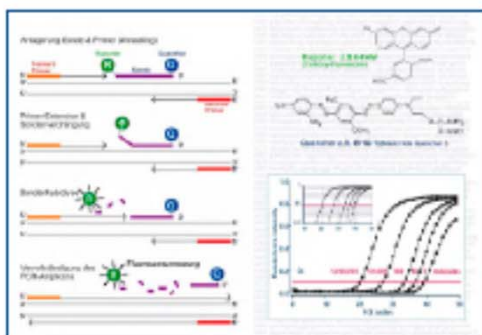
Die dazu benötigte DNA-Sequenz des nachzuweisenden Erregers wird im Internet aus öffentlichen Datenbanken kopiert. Die Oligonukleotide werden über Internet bei spezialisierten Firmen bestellt und synthetisiert.



PCR & RT-PCR – Die Kettenreaktion

Die PCR besteht aus einer Serie (Kettenreaktion) von 30 bis 45 Temperatur-Zyklen und wird in einem Thermocycler durchgeführt. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

- **Denaturierung:** Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA auf 95 °C erhitzt um die Stränge zu trennen. Es stehen zwei Vorlagen (Matrizen).
- **Annealing** (Anlagerung): Die Temperatur wird Primer-abhängig gesenkt damit sich die spez. Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern können.
- **Extension** (Elongation): Die DNA-Polymerase bindet bei 60°C an die kurzen doppelsträngigen Bereiche und repliziert den komplementären Strang. Da die Genome vieler Virenarten aus RNA bestehen, muss diese für die PCR zuerst in DNA umgeschrieben werden. Dieser Vorgang wird **Reverse Transkription (RT)** genannt und kann im selben Ansatz der PCR vorgeschaltet werden.



Quantitative real-time PCR

Bei der real-time PCR findet zusätzlich eine **Quantifizierung** des amplifizierten DNA-Abschnittes statt. Dazu werden nach jedem PCR-Zyklus **Fluoreszenz**-Messungen durchgeführt, wobei die Zunahme der kopierten DNA mit der Zunahme der Fluoreszenz korreliert.

Als Fluoreszenz-Quelle können DNA-Farbstoffe (z.B. **SYBR Green**) verwendet werden, welche nur mit doppelsträngige DNA interkalieren (binden). Nach Anregung kann deren zunehmende Fluoreszenz gemessen werden. Es kann jedoch nicht zwischen spez./unspez. PCR-Produkten unterschieden werden.

Eine spezifischere Methode beruht auf den Zusatz einer zwischen den Primer liegenden Sonde (z.B. **TaqMan**). Diese ist an den Enden mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (R), und einem Fluoreszenz-absorbierenden Quencher (Q) markiert.

Durch Verwendung einer speziellen DNA-Polymerase mit **5'-3'-Exonuklease-Aktivität**, wird die Sonde während der Synthese des Gegenstranges vom 5'-Ende her abgebaut, wodurch Quencher und Fluorophor voneinander entfernt werden. Die steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden.



VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit

It has a detection limit of ≥ 10 RNA copies per reaction for **ORF1ab** and **N genes** (Figures 1 and 2).

Dieser Test hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 RNA Kopien je Reaktion für die ORF 1ab und N Gene (Abbildungen 1 und 2)

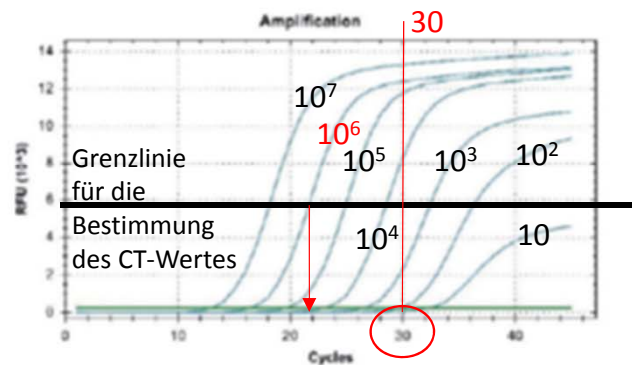


Figure 1.

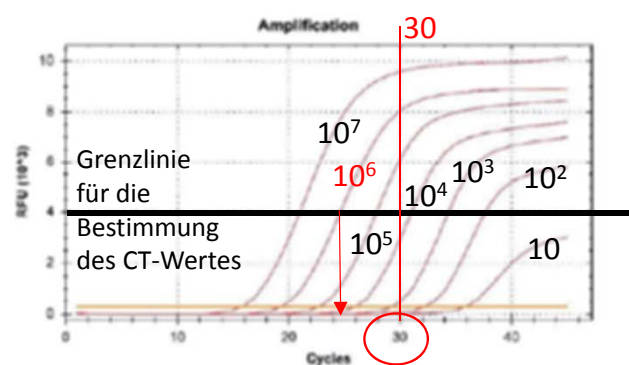


Figure 2.

Figure 1. Dilution series of ORF1ab gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (FAM channel).

Figure 2. Dilution series of N gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (ROX channel).

Für diesen Typ des Viasure-Testkits können bei einer CT von 30 (roter Kreis, Maximum des CT – Wertes gemäß den Angaben im schriftlichen Gutachten) weniger als 10^4 RNA-Kopien mit dem Zielgen ORF1ab (Abbildung 1) und weniger als 10^5 Genomkopien mit dem N-Gen (Abbildung 2) nachgewiesen werden.

Laut RKI entsprechen mindestens 10^6 RNA-Kopien/ml einer plausiblen Korrelation mit einer Infektiosität (Nachweis von infektiösem Virus in Zellkultur).

Diese Kopienanzahl wird hier bei einem CT von weniger als 22 für das ORF1ab-Gen (Abbildung 1, Pfeil) und weniger als 25 für das N-Gen (Abbildung 2, Pfeil) gesehen.

Ein CT von 30 oder höher als Kriterium für "Infektiosität" ist also weit jenseits der realen Grenze UND der Testspezifikationen, dies ist bei allen kommerziellen Testkits vergleichbar

SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics

Olha Puhach¹, Benjamin Meyer² & Isabella Eckerle^{1,3,4}✉

Abstract

SARS-CoV-2 viral load and detection of infectious virus in the respiratory tract are the two key parameters for estimating infectiousness. As shedding of infectious virus is required for onward transmission, understanding shedding characteristics is relevant for public health interventions. Viral shedding is influenced by biological characteristics of the virus, host factors and pre-existing immunity (previous infection or vaccination) of the infected individual. Although the process of human-to-human transmission is multifactorial, viral load substantially contributed to human-to-human transmission, with higher viral load posing a greater risk for onward transmission. Emerging SARS-CoV-2 variants of concern have further complicated the picture of virus shedding. As underlying immunity in the population through previous infection, vaccination or a combination of both has rapidly increased on a global scale after almost 3 years of the pandemic, viral shedding patterns have become more distinct from those of ancestral SARS-CoV-2. Understanding the factors and mechanisms that influence infectious virus shedding and the period during which individuals infected with SARS-CoV-2 are contagious is crucial to guide public health measures and limit transmission. Furthermore, **diagnostic tools to demonstrate the presence of infectious virus from routine diagnostic specimens are needed.**

Sections

Introduction

Measuring SARS-CoV-2 viral load

Viral load and shedding dynamics

SARS-CoV-2 transmission

SARS-CoV-2 diagnostics in public health

Conclusions

¹Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland. ²Centre for Vaccinology, Department of Pathology and Immunology, University of Geneva, Geneva, Switzerland. ³Geneva Centre for Emerging Viral Diseases, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland. ⁴Division of Infectious Diseases, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland. ✉e-mail: Isabella.Eckerle@unige.ch

Introduction

At the end of 2019, a novel coronavirus emerged, later termed severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which is the causative agent of coronavirus disease 2019 (COVID-19). SARS-CoV-2 primarily targets multiciliated cells in the upper respiratory tract (URT), but was also reported to infect cells outside the URT¹. It can spread to the lower respiratory tract (LRT), where it infects alveoli, leading to reduced gas exchange, inflammation and pulmonary pathologies that are typical of COVID-19 (ref.²). Individuals who are infected shed the virus through the URT, with emission of infectious virus leading to secondary transmission and thus further spread of the virus.

Because of their nonspecific clinical presentation, precise diagnostic tools are needed to identify SARS-CoV-2 infections. Specific real-time PCR (RT-PCR) assays were quickly available after the emergence of the virus, later followed by antigen-detecting (rapid) diagnostic tests (Ag-RDTs) and serological assays. **Although detection of viral RNA in respiratory specimens by RT-PCR is highly sensitive and specific, it does not distinguish between replication-competent virus and residual RNA. In the absence of a diagnostic test, infectiousness is often established using one of two proxies: the presence of viral RNA above a defined cycle threshold (Ct) value, or a positive Ag-RDT. RT-PCR is a useful tool for initial diagnosis, whereas Ag-RDTs can serve as an indicator for ending the isolation period. This is because viral RNA (which would be picked up by RT-PCR) remains detectable in the absence of infectious virus,** whereas positivity of Ag-RDTs better correlates with the presence of infectious virus.

Aside from the respiratory tract, SARS-CoV-2 RNA has been detected in peripheral blood, stool, urine and ocular secretions^{3–7}. Virus isolation from non-respiratory specimens was unsuccessful in most studies^{4,8,9}, with very few reported cases of infectious virus presence in non-respiratory specimens^{10–13}. Furthermore, viral loads from respiratory tract samples were found to be much higher than from other materials, the latter often with RNA viral loads that are incompatible with the presence of infectious virus. Such specimens are not considered relevant for transmission and therefore, we concentrate on SARS-CoV-2 virus shedding only through the respiratory tract.

Here, we elucidate the relationship between SARS-CoV-2 viral load and infectious virus presence, the biological and host factors that determine infectious virus shedding, measurement of infectious virus and the role diagnostics can have as a proxy for infectious virus shedding.

Measuring SARS-CoV-2 viral load

The gold standard for laboratory diagnosis of a respiratory tract infection is demonstration of viral RNA with a virus-specific (semi-)quantitative RT-PCR from material collected from the respiratory tract. The most commonly used materials are swab specimens from the nasopharynx or oropharynx, but swabs of the nasal cavity, saliva or gargled liquid solution have also been suggested as alternative materials, with the advantage of being a less uncomfortable procedure for the participant. Viral load as determined by RT-PCR is either expressed as the number of viral RNA copies per millilitre of viral transport medium or per swab, or by the arbitrary test-specific Ct value. By contrast, infectiousness is determined by qualitative or quantitative assessment of infectious virus in a clinical specimen by replication of virus in cell culture. The limitations to measuring viral shedding are described in Box 1. In this Review, we refer to viral particles that can cause infection as infectious virus, and to viral RNA levels (which are widely used as surrogates for infectious virus) as viral load.

Detection of infectious virus

The gold standard for determining the presence of infectious (that is, replication competent) virus in respiratory specimens is the recovery of virus in cell culture, a procedure that is commonly termed virus isolation (Fig. 1).

In the case of SARS-CoV-2, various cell lines and primary cells can be used for virus isolation, including those that express angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2; the receptor required for virus entry) or transmembrane protease 2 (TMPRSS2; which is also important for virus entry)¹⁴. A cell line derived from African green monkey kidney cells, Vero E6, is commonly used for virus isolation, propagation and titration¹⁵. Other human cell lines that have been successfully used for SARS-CoV-2 isolation are a colorectal adenocarcinoma cell line (Caco-2), a lung adenocarcinoma cell line (Calu-3), a lung adenocarcinoma cell line ectopically overexpressing ACE2 (A549) and a human hepatocellular carcinoma cell line (Huh7)^{16,17}.

The presence of infectious virus in the cell culture is qualitatively assessed using light microscopy, which can be used to identify cells undergoing the cytopathic effects (and death) caused by SARS-CoV-2 infection, consisting of syncytium formation, cell rounding, detachment and degeneration¹⁷. Infection is usually confirmed by a second method, either by a specific RT-PCR for viral RNA from the supernatant of infected cells, indicating virus replication by an increase of viral load over time in comparison to the baseline sample, or by immunostaining for viral proteins^{15,18}.

This qualitative measurement of virus presence cannot, however, quantify the infectious virions in the inoculated specimens, although samples with lower viral load commonly show delayed development of a cytopathic effect¹⁹. Instead, methods such as plaque assays, focus-forming assays or 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) can be used to quantify infectious virus in a patient sample.

The above methodologies are reliable tools to detect infectious virus in clinical specimens of individuals who are infected with SARS-CoV-2, although there are limitations. Detection of viable virus particles is highly influenced by the quality of the sample, and infectious viral particles can quickly lose their infectiousness in unsuitable storage conditions. To preserve infectious virus in specimens, swab samples from patients infected with SARS-CoV-2 should be immediately submerged in a viral transport medium suitable for cell culture and stored at –80 °C as early as possible after collection. Prolonged exposure to higher temperatures or repeated freeze–thaw cycles can drastically influence the quality of the sample, leading to potentially complete loss of infectious viral particles. Therefore, many factors can influence the reproducibility of the results between different laboratories. Furthermore, cell lines used for isolation can show a high variability between laboratories even when they are presumably the same. Consumables used during cell culture, such as culture medium or additives such as fetal bovine serum and antibiotics, could potentially also impact virus isolation success. In human primary airway epithelial cells, which mimic the primary site of entry in the human respiratory tract, the probability of isolating infectious virus was reduced compared with that of Vero E6 cells, indicating that infectious virus determined using Vero E6 cells might be overestimated for assessing transmission risks in vivo²⁰.

Importantly, all cell culture work with SARS-CoV-2 is done under biosafety level 3 conditions, so only specially trained personnel in laboratories with advanced infrastructure can perform these experiments. Thus, detection of viable virus through virus isolation is not suitable for diagnostics and is restricted to research only.

Box 1

Limitations to measuring viral load

Specimen selection site

The anatomical site chosen to collect the swab specimen for detection of SARS-CoV-2 might influence viral load detection. Higher RNA viral load was reported from nasopharyngeal than oropharyngeal swabs^{28,124,181}. As a result, nasopharyngeal samples show the highest diagnostic accuracy compared with other upper respiratory tract samples¹⁸². Similarly, higher virus isolation success was reported from nasopharyngeal swabs than from saliva, nasal or sublingual swabs¹²⁴. However, another study found higher RNA viral loads in the throat and sputum than from nasal swabs³⁰. Two studies indicate that virus can be detected earlier in the throat²⁹ or saliva³³, but reaches significantly higher levels and remains detectable for longer in the nose^{29,33}. A meta-analysis, which evaluated different clinical sampling methods using nasopharyngeal swab as a reference, demonstrated that pooled nasal and throat swabs showed the best diagnostic performance¹⁸³. Notably, this analysis revealed higher heterogeneity of results in studies using nasal or saliva specimens than using pooled nasal and throat swabs¹⁸³.

The effect of the swabbing method (self-administered or performed by trained person) on measured viral loads cannot be overlooked: the sensitivity of antigen-detecting (rapid) diagnostic tests achieved by health-care professionals was higher than for self-tests^{57,184}.

Impact of individual infection kinetics

To date, there is a limited number of studies that describe the longitudinal dynamics of SARS-CoV-2 shedding^{29,33}. Most of the studies used only a single time point to collect respiratory swabs from individuals who were infected for measurement of viral load.

As a result, different times from symptom onset can be a confounding factor when comparing viral load between different patients, which might also explain the variation of available data on viral load.

Influence of epidemic period

RNA viral loads across the specimens collected at single time points were found to indicate the trajectory of the epidemic, as a high proportion of individuals who were recently infected with low cycle threshold values correlates with a higher reproduction number, indicative of a growing epidemic¹⁸⁵. Similarly, the rise and fall of RNA viral load correlated with the number of COVID-19 cases and hospital admissions across the population as it was identified using SARS-CoV-2 RNA measurement in wastewater samples¹⁸⁶. Moreover, variation in estimates of the mean incubation period was shorter before the epidemic peak in China than after the peak¹⁸⁷. Therefore, sampling at single time points can be biased by the epidemic period and might reflect more epidemiological dynamics than individual shedding kinetics.

Influence of SARS-CoV-2 variant of concern

Available data on SARS-CoV-2 variants of concern demonstrated that, although the overall pattern of viral load dynamics is conserved between the variants, infection with different SARS-CoV-2 variants of concern led to highly distinct infectious virus amounts and RNA viral loads^{25,86,87,90,92,94} and variations in SARS-CoV-2 incubation period¹¹³. Therefore, extrapolation of our understanding from shedding of current or earlier SARS-CoV-2 variants to newly emerged variants may be of only limited value.

Detection of RNA viral load

Techniques for detecting viral RNA by RT-PCR were quickly established at the beginning of the pandemic^{21,22} (Fig. 1). **The high specificity and sensitivity of RT-PCR make it the gold standard for diagnosing SARS-CoV-2 infections.** Quantitative RT-PCR assays provide a Ct value, which is inversely correlated with the concentration of the target viral RNA in the clinical sample (that is, the higher the value, the lower the target RNA in the sample). By using an external standard with a defined number of RNA copies, Ct values can be transformed into absolute viral RNA copy numbers or international units per millilitre of viral transport medium or per total swab.

Although RT-PCR cannot directly determine infectiousness owing to its inability to differentiate between replication-competent (infectious) virus and residual (non-infectious) viral RNA, a correlation between RNA viral load and the presence of infectious virus has been sought. Several studies have attempted to correlate the quantity of viral RNA with infectiousness by isolating virus across a range of Ct values. Indeed, there was a stepwise decrease in the probability of virus isolation with increasing Ct values in samples collected during the first 8 days post-onset of symptoms (dpos)^{18,23}. **However, other studies have found that the correlation between infectious virus and RNA viral load was low** and that viral load (or Ct values as a proxy) is only

a weak predictor of infectious virus presence in the first 5 dpos^{4,20,24,25}. Furthermore, when taking a certain Ct value or RNA copy number as a threshold, it is not possible to determine whether the RNA viral load is increasing or already decreasing; therefore, a low viral load could be measured at the end of infection or in the early (pre-)symptomatic phase before reaching peak viral load.

In a routine diagnostic context, analytical sensitivity and limits of detection may vary between the tests and laboratories where they are applied. **An analytical performance comparison between different RT-PCR assays showed variation between the measured Ct values and the detection rate²⁶.** Therefore, application of RNA standards and calculation of RNA genome copy number based on a standard curve can improve comparability between laboratories and assays. To facilitate easier calibration and control of nucleic acid amplification techniques, **an international standard with assigned potency in the form of an inactivated SARS-CoV-2 isolate was introduced by the World Health Organization (WHO)²⁷.**

As with the detection of infectious virus, several other parameters can influence whether viral load can be detected. The site of specimen collection can impact the findings on viral load; although some studies report higher RNA viral load in nasal or nasopharyngeal swabs^{28,29}, others show higher RNA viral load in throat samples³⁰. Moreover, the transport

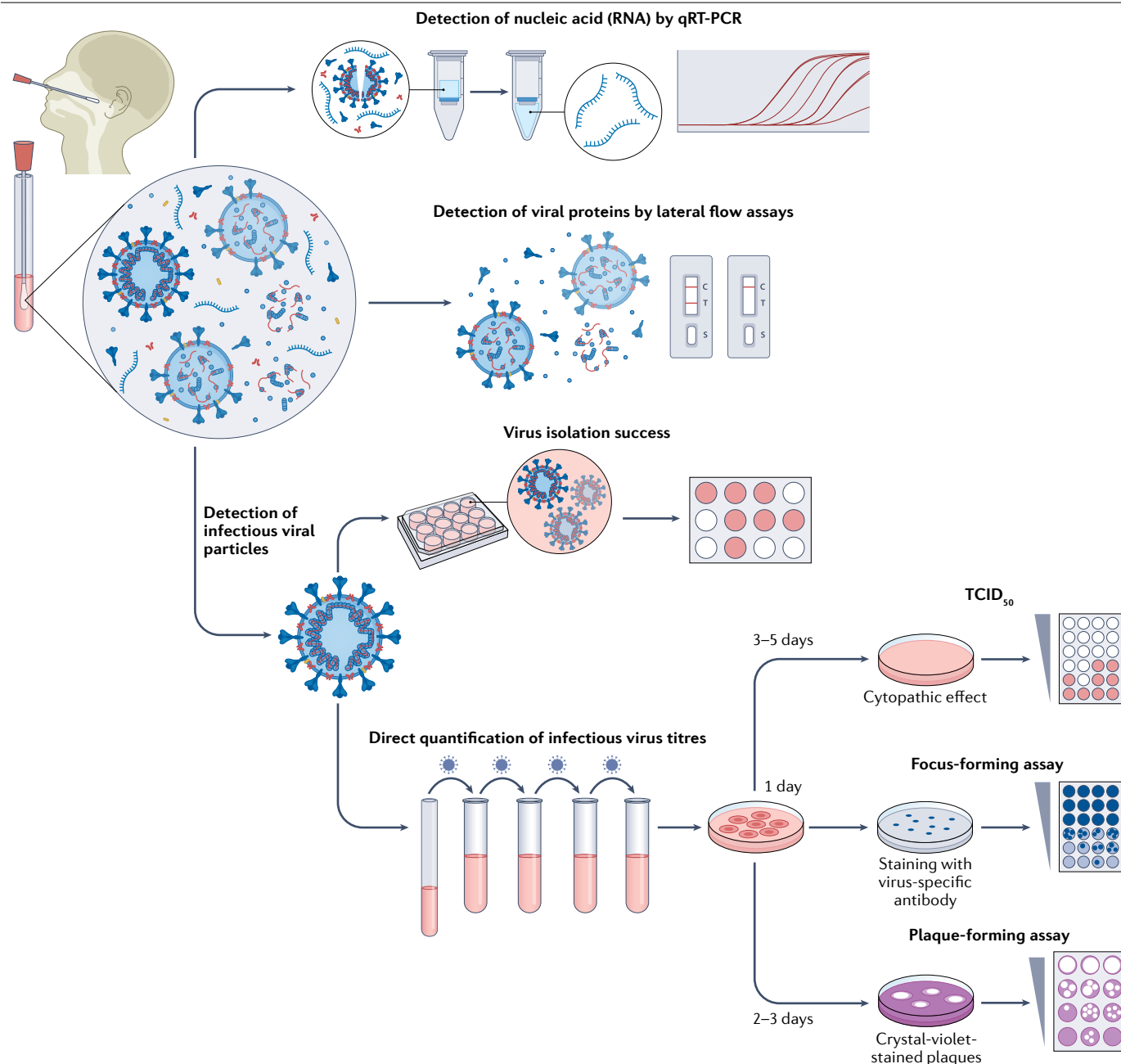


Fig. 1 | Methods to measure infectious virus and RNA viral load. Swab specimens from the nasopharynx or oropharynx are used for detection of SARS-CoV-2 viral loads. Detection of viral nucleic acids (RNA) is performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Viral RNA is extracted from lysed virus, reverse transcribed and amplified by qPCR using primers specific for one or more target regions in the viral genome. The amplification cycle at which samples cross the threshold (cycle threshold) defines the amount of viral RNA. RNA viral load can be expressed as the number of viral RNA copies per millilitre, or by the arbitrary test-specific cycle threshold value. Lateral flow assays detect the presence of specific viral proteins in the lysed viral particles. SARS-CoV-2 nucleocapsid is used in most antigen-detecting (rapid) diagnostic tests. The presence of infectious (replication-competent) virus in respiratory specimens can only be determined by the recovery of virus in cell culture by isolation or by quantification of infectious virus titres using 50% tissue culture infectious

dose (TCID₅₀), focus-forming assays or plaque-forming assays. Virus isolation is performed by applying infectious medium on the monolayer of cells; isolation success is determined by the presence of a cytopathic effect approximately 3–5 days post-infection. White colour indicates the presence of a cytopathic effect in cells. For quantification of infectious virus titres, serial dilutions of respiratory samples are performed and used for inoculation on the monolayer of cells. In TCID₅₀, 3–5 days post-infection, viral-induced cytopathic effect is classically defined using microscopy. In focus-forming assays, cells are fixed 1 day post-infection and immunostaining with virus-specific antibodies is performed to detect groups of infected cells (foci). The foci, indicating the presence of infectious virus, are displayed in blue. In plaque-forming assays, plates are fixed 2–3 days post-infection and stained with crystal violet; wells with individual plaques are used to determine viral titres. The plaques, indicating the presence of infectious virus, are displayed in white.

media used for the sample, storage condition and quality of the sample may further influence the detection of viral RNA and their usefulness and limitations when extrapolating to potential infectiousness.

Although new variants have impacted some gene targets, in most instances, they did not have a major effect on molecular diagnostics, owing to the use of dual-target assays (in which at least two viral genes are detected simultaneously)³¹.

Antigen-detecting rapid diagnostic tests

Most lateral flow tests are designed to detect SARS-CoV-2 nucleocapsid protein, as a proxy for infectious virus, in nasal or nasopharyngeal swabs^{32–36} (Fig. 1). Indeed, most studies on Ag-RDT detection show good concordance with RT-PCR positivity when Ct values are below 25–30, a viral load compatible with the presence of infectious virus, whereas higher Ct values give less reliable results^{34,37–41}.

Early time points during infection often give negative results with Ag-RDT in individuals who have tested positive by PCR^{29,42}. On average, the first positive Ag-RDT results are obtained about 1–2 days later than positive PCR results³⁷, whereas the highest sensitivity in patients was shown during the first 7 dpos in the studies with ancestral SARS-CoV-2 (refs.^{42–44}). Antigen tests show highest sensitivity for specimens containing infectious virus and with Ct values below 25 (refs.^{45–49}), and their positivity highly correlates with the presence of infectious virus^{34,45,47,50}. By contrast, Ag-RDTs are less sensitive to low RNA viral loads (which have higher Ct values)⁵¹. Several studies have demonstrated a strong correlation between Ag-RDT positivity and the period in which infectious virus can be detected, indicating that Ag-RDTs can add an additional safety layer for deciding when to end isolation^{29,39}.

However, some inconsistencies between studies and tests have been noted. For instance, there have been reports (across a range of studies and Ag-RDTs) of failure to detect viral antigens in specimens with a low Ct value and/or containing infectious virus (beyond the early acute phase)^{46,50}. Moreover, there are seldom reports of Ag-RDTs remaining positive after more than 10 dpos^{42,46,50}. As most studies failed to isolate infectious virus after more than 10 dpos, it remains unclear whether Ag-RDT positivity beyond 10 dpos correlates with infectious virus shedding. One study showed that antigen tests predict infectiousness more accurately at 1–5 dpos, than at 6–11 dpos⁵². Notably, there was a good correlation between Ag-RDT positivity and infectious virus isolation within the first 11 dpos⁵².

Conflicting results were found for sensitivity and specificity of Ag-RDTs for detection of SARS-CoV-2 variants, with large variations between manufacturers, the type of setting in which the Ag-RDTs were used (self-tests versus tests collected by a health-care professional) and the type of sample used for detection (nasal versus oral)^{53–57}. With increasing hybrid immunity and the presence of mucosal antibodies, Ag-RDTs may further lose sensitivity⁵⁸.

Viral load and shedding dynamics

Viral loads are used as a proxy to characterize infectious viral shedding. The exact time for which individuals remain infectious is laborious to estimate and is likely to vary between patients. Viral factors, such as viral variant, and host factors, such as patient age and sex and immune status, influence shedding dynamics.

Viral load as a key determinant of viral shedding

After the emergence of SARS-CoV-2 in late 2019, the first details on viral load and infectious virus shedding were measured in a cluster of infections that occurred in January 2020 in Germany, assessing

nine immunocompetent individuals with a mild course of disease⁴. Peak RNA viral loads were reached in the early symptomatic period at 5 dpos, a finding that was confirmed by other studies reporting peak viral loads at the time of symptom onset or even shortly before^{4,7,28,59}. RNA viral loads gradually declined over the course of the disease in the nasopharyngeal and throat swabs, reaching low or undetectable levels 2 weeks after symptom onset^{4,23,59,60} (Fig. 2). Declining RNA viral load is associated with resolution of clinical symptoms and gradual increase in antibody titres, for both binding and neutralizing antibodies^{18,23}. However, ongoing detection of viral RNA has been described for prolonged periods up to 28 dpos in otherwise healthy individuals⁶¹, and some studies have reported low-level detection of RNA by RT-PCR even for months⁶². Participants who continue to shed viral RNA for more than 4 weeks after initial detection by RT-PCR represent a minority of non-severe cases, estimated to be around 3%⁶³, 14%⁶⁴ or less than 20%⁶⁵.

Infectious virus shedding of the ancestral SARS-CoV-2 strain, as determined by virus isolation in cell culture, was reported to correlate with high RNA viral load in the early acute phase after symptom onset²³. Importantly, daily longitudinal sampling of respiratory specimens from individuals with mild disease or asymptomatic infection revealed that infectious virus can already be detected before the onset of symptoms³³. Successful infectious virus isolation was reported within the first 8–10 dpos, but culture probability after this time period rapidly declined^{4,7,23,29,66,67}. Studies that assessed infectious virus quantitatively found that infectious virus titres declined over the first 10 dpos^{25,29}. In addition, a reduced chance of virus isolation coincided with the time of seroconversion in hospitalized patients and, as a result, infectious virus could no longer be isolated from seroconverted patients with detectable antibody titres^{18,68,69}. Although similar seroconversion studies performed on mildly symptomatic patients are missing, the number of immunologically naive individuals is declining and this broadly existing underlying immunity makes such an assessment more complex.

Most studies on infectious virus shedding in the acute symptomatic period were on immunocompetent patients that had mild-to-moderate disease, representing the majority of COVID-19 cases in the community. Therefore, the assessment of the presence of infectious virus in the URT from those studies was used to define the duration of the period of infectiousness and contributed to best public health practices for isolation and quarantine^{62,70}. Although the pattern of infection is broadly similar in patients with mild and severe disease, key differences do exist. The first week of illness is comparable in terms of RNA viral load between patients with mild and severe disease. However, patients with severe disease have elevated RNA viral loads in the second week of illness, and RNA was detected for prolonged periods⁷¹. Moreover, infectious virus was recovered from hospitalized patients for prolonged periods of up to 32 dpos^{18,72,73}; however, the median time from symptom onset to viral clearance in culture was similar to that of patients with mild or moderate disease^{18,73}. Severe COVID-19 is also characterized by high and persistent RNA viral load in the LRT, whereas non-severe cases have similar viral loads in the URT and LRT⁷⁴.

Prolonged detection of viral RNA was also reported in immunocompromised patients; for example, 224 days after the beginning of the infection, virus was still detected in a man infected with HIV, including the detection of subgenomic RNA (sgRNA) indicating active viral replication⁷⁵. Also, infectious virus was recovered up to 61 dpos in nasopharyngeal swabs collected from immunocompromised patients⁷⁶, and low RNA viral loads were still detected at 60 dpos in another study⁷⁷. Infectious virus was isolated from bronchoalveolar fluids from patients receiving chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy

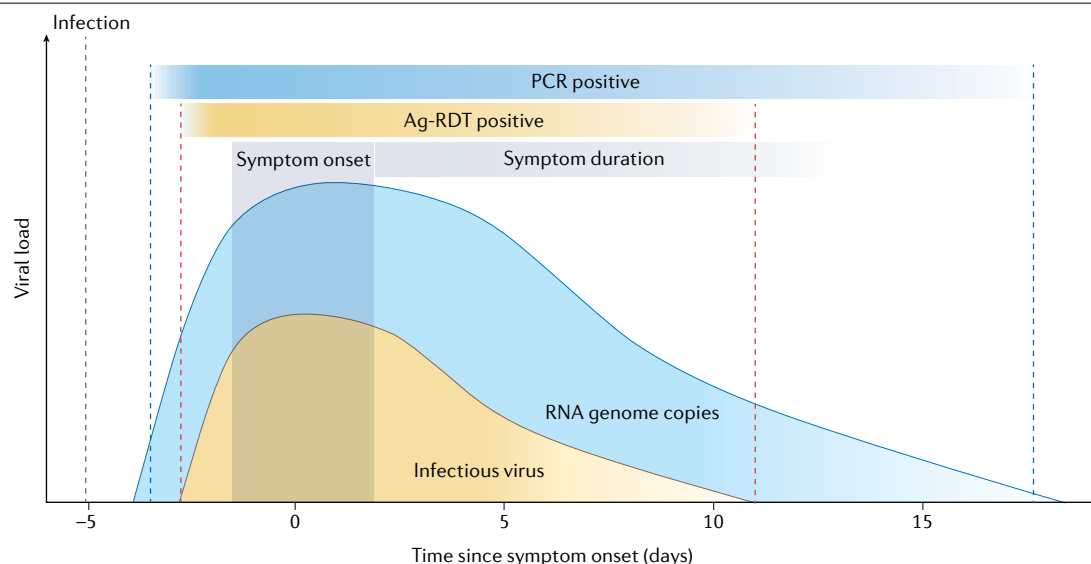


Fig. 2 | Kinetics of RNA viral loads and infectious virus for ancestral SARS-CoV-2 in patients with mild-to-moderate disease. According to different studies, the incubation period for ancestral SARS-CoV-2 was estimated to lie between 4.6 and 6.4 days. On average, symptoms continue to persist for 10 days. RNA can already be detected before the onset of symptoms; RNA levels peak around the onset of symptoms and then gradually decline. Median clearance for RNA viral load is 16 days post-onset of symptoms. Infectious virus titres are highest around symptom onset, and infectious virus can be isolated up to 8 or 10 days post-onset of symptoms. RNA can be detected for prolonged periods

by real-time PCR, when infectious virus is no longer detectable, whereas virus detection by antigen-detecting (rapid) diagnostic tests (Ag-RDTs) was shown to be a better correlate for infectiousness. Gradients reflect variability between individuals (lighter shade towards the end of infection shows that viral loads continue to be detected in some but not all individuals). The grey dashed line marks the initial infection, the blue dashed lines mark the PCR-positivity period and the red dashed lines mark Ag-RDT positivity. Details of the underlying studies used to generate Fig. 2 can be found in Supplementary Table 1.

up to 28 days after admission to an intensive care unit⁷⁸. A case report on an immunocompromised patient showed isolation of infectious virus up to 78 dpos⁷⁹. The reports of infectious virus isolation from severely ill or immunocompromised patients are limited (owing to the low number of patients), so it is difficult to define the proportion of cases with prolonged shedding.

The characteristics of viral shedding of other respiratory viruses are outlined in Box 2.

Viral shedding of SARS-CoV-2 variants

Viral evolution of SARS-CoV-2 over time has led to the emergence of numerous variants. Combined with increasing population immunity due to vaccination or natural infection, this has led to a need to reassess our knowledge of viral shedding patterns.

The WHO designated variants as variants of concern (VOCs) if they were associated with one or more of the following: elevated transmissibility or a detrimental change in COVID-19 epidemiology; increased virulence or a change in clinical disease presentation; or decreased effectiveness of public health measures or available diagnostics, vaccines or therapeutics⁸⁰. To date, five VOCs are recognized: Alpha, Beta, Gamma, Delta and Omicron. In contrast to ancestral SARS-CoV-2, VOCs display some differences in evasion from immunity, viral loads, shedding period or even incubation period, resulting in drastically different levels of transmission^{81–85} (Fig. 3).

All VOCs have shown changes in viral load compared with ancestral SARS-CoV-2. One study reported that infection with Alpha leads to approximately tenfold higher RNA viral load and an increased probability of cell culture isolation compared with the ancestral virus⁸⁶.

However, another study did not find a substantial difference in the infectious virus titre between Alpha and ancestral SARS-CoV-2 (ref.³³). Delta reportedly led to an even higher increase in RNA viral load: one study reported a 1,000× increase relative to the ancestral virus⁸⁷, and other studies reported 1.7× (ref.⁸⁸) or 6.2× higher⁸⁹ viral load than Alpha. Furthermore, Delta demonstrated elevated probability of cell culture isolation⁹⁰ and higher infectious virus titres than Alpha⁹¹. Although Omicron was shown to be highly transmissible, lower RNA viral loads⁹², lower cell culture isolation probability⁹³ and lower infectious virus titres²⁵ were observed in patients infected with Omicron BA.1 than in those infected with Delta. Even within the Omicron clade, there are differences between sub-lineages, with infection with Omicron BA.2 leading to higher levels of RNA viral loads and longer time to viral clearance than with Omicron BA.1 (refs.^{94–96}).

Similarly, VOCs have shown differences in the duration of viral shedding. Analysis of Ct values in respiratory specimens found that Delta showed longer persistence of viral RNA than ancestral SARS-CoV-2 (ref.⁹⁷). Another study demonstrated that there was not significant difference in the mean duration of viral RNA presence in Delta and Omicron BA.1 infections⁹². The duration of infectious virus shedding appears to be similar to that observed with ancestral SARS-CoV-2, with culturable virus obtained at 5 dpos⁸⁵ and no replication-competent virus isolated beyond 10 dpos in patients infected with Delta and Omicron BA.1 (refs.^{84,98}). It is important to note that pre-existing immunity to SARS-CoV-2, either from infection or vaccination, might influence the duration of infectious virus shedding (alongside immune status and disease severity, as discussed above), which may have driven some of these differences during the course of the pandemic.

Influence of age and sex on viral shedding

There is some evidence that age-associated and sex-associated differences in innate and adaptive immunity, as well as higher ACE2 expression in adults than in children, result in an increased risk for severe disease in older male patients^{99–101}. Moreover, a few studies have found that age and sex influence viral loads and shedding dynamics. In cases of infection with ancestral SARS-CoV-2, resolution of RNA shedding was faster in participants <18 years of age and slower in participants >50 years of age⁶¹. According to one study, viral RNA can be detected for longer times in male patients infected with ancestral SARS-CoV-2 (ref.¹⁰²), and RNA viral loads were elevated in male patients infected with either Alpha or Delta variants compared with female patients⁸⁸. However, a possible association of viral load dynamics with age or sex is highly debated, as other studies demonstrated that they have no influence on infectious virus²⁵ or RNA viral loads⁵⁹.

Early studies in ancestral SARS-CoV-2 did not find a difference in virus isolation success¹⁰³ or RNA viral loads between children and adults^{104–106}, but sample sizes were small. Slightly lower RNA viral loads and a more rapid clearance of viral RNA was observed in children than in adults when analysing much larger cohorts, whereas the patterns of shedding curves over time were similar between children and adults¹⁰⁷. Furthermore, large-scale analysis of viral loads across different age groups showed no differences of distribution of RNA viral load between children and adults¹⁰⁸ or only slightly lower viral loads ($<0.5 \log_{10}$ units) in children <5 years of age⁸⁶.

Symptoms as a correlate for shedding

One of the key epidemiological parameters for SARS-CoV-2 transmission is the incubation period, defined as the time from exposure or infection to the onset of symptoms. Studies on ancestral SARS-CoV-2

Box 2

Shedding of respiratory viruses

The dynamics of viral shedding differs between respiratory viruses, which influences their transmission and has an effect on diagnostics and measures applied to contain the outbreaks.

SARS-CoV

The epidemic of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) started in November 2002 in the Guangdong province of China and rapidly spread outside China. The virus was airborne and could also be spread via droplets of saliva, but is only moderately transmissible among humans¹⁸⁸. Only low viral loads were detected in the early symptomatic period, generally peaking in the upper respiratory tract (URT) around 10–14 days post-onset of symptoms (dpos)^{189,190}, and then dropping to low levels at 3–4 weeks post-infection¹⁹¹. In patients infected with SARS-CoV, viral RNA was detectable for a maximum of 8 weeks in samples collected from the URT¹⁹¹ and for 52 days in sputum samples¹⁹², whereas infectious virus was isolated up to 28 dpos from stool and respiratory specimens and up to 36 dpos from urine samples^{191,193}. SARS-CoV replicated less efficiently at low temperatures; thus, virus replication was more efficient in the lower respiratory tract (LRT) than in the URT¹⁹⁴. Notably, asymptomatic or pre-symptomatic viral shedding and transmission were not recorded for SARS-CoV^{190,195}; the peaks of transmission occurred around 2 and 10 dpos¹⁹⁵. As a result, outbreaks were successfully contained through isolation of symptomatic patients infected with SARS-CoV, which reduced onward transmission¹⁹⁶.

MERS-CoV

Middle East respiratory coronavirus (MERS-CoV) was isolated from a patient with pneumonia in Saudi Arabia in 2012 and was shown to be the causative agent of a cluster of severe respiratory tract infections in the Middle East¹⁹⁷. The disease caused by MERS-CoV is characterized by a wide range of clinical severities and by predominantly respiratory symptoms, such as acute viral pneumonia, with a high case fatality ratio¹⁹⁸. The virus is capable of

airborne transmission and has low transmissibility among humans, with a maximum estimated reproduction number below 1 (ref.¹⁹⁸). Higher RNA viral loads were detected in the LRT than in the URT. Estimated mean shedding duration is 15.3 days in the URT and 16.3 days in the LRT⁶². Prolonged PCR positivity and higher RNA viral loads in the URT and LRT were associated with increased disease severity^{62,199}. Viral RNA was also detected in the urine, stool and serum²⁰⁰. One study reported detection of viral RNA in the blood for 34 days and showed that presence of viral RNA in the blood is associated with higher mortality²⁰¹; however, another study failed to isolate virus from PCR-positive serum samples²⁰⁰.

Influenza virus

In symptomatic patients, RNA viral loads start to be detectable by real-time PCR 2 days before the onset of symptoms and peak at 1 dpos²⁰². Human challenge trials with influenza A viruses show that viral loads already sharply increase at 1 day post-inoculation, reach a peak at 2 days post-inoculation and become undetectable at 8 days post-inoculation. The mean duration of viral shedding for influenza viruses is 4.8 days, and the maximum duration is between 6 and 7 days^{203,204}. Kinetics of infectious viral titres were similar to the viral load trends detected by real-time PCR for different strains of influenza²⁰⁵. Lower RNA viral loads and shorter infectious viral shedding were noted in asymptomatic patients²⁰².

Human respiratory syncytial virus

This virus is the most frequent causative agent of LRT infections, leading to morbidity and mortality particularly in young children and older adults²⁰⁶. The virus is transmitted by contact with nasal secretions or large aerosols. Viral loads and symptoms increased simultaneously, reaching a peak at 5.4 days²⁰⁷. In human challenge trials, respiratory syncytial virus titres were detectable for an average of 4.6 days. Viral RNA could be still detected up to 9 dpos, whereas infectious virus titres could be detected from 1 to 8 dpos in adults²⁰⁸ and up to 9 dpos in children²⁰⁹.

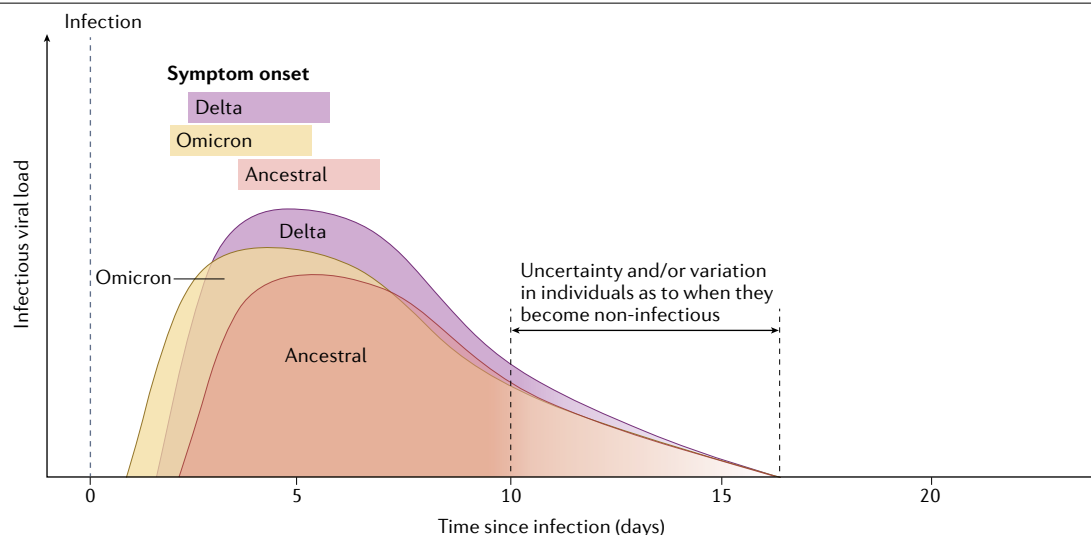


Fig. 3 | Infectious viral load and symptom onset in SARS-CoV-2 Delta and Omicron BA.1 variants of concern. Overall patterns of shedding dynamics are conserved between SARS-CoV-2 variants. In comparison to ancestral SARS-CoV-2, Delta and Omicron BA.1 have shorter incubation periods, estimated as approximately 3.7–4 days for Delta and approximately 3–3.4 days for Omicron BA.1. Higher infectious viral loads were detected in patients infected with Delta than in patients infected with Omicron BA.1 or ancestral SARS-CoV-2. Only

a limited number of studies have determined when virus shedding for Delta and Omicron BA.1 ends, so this time point is not well defined. Owing to the low number of studies comparing the end of the infectious period between different SARS-CoV-2 variants of concern, the end point of infectivity is not well defined (shown as a colour gradient). Details of the underlying studies used to generate Fig. 3 can be found in Supplementary Table 2.

have estimated that the incubation period on average is between 4.6 and 6.4 days^{59,109–111} (Fig. 2). A human challenge trial with ancestral SARS-CoV-2 demonstrated that symptoms start to appear 2–4 days after inoculation, and RNA viral loads reach their peak 4–5 days after inoculation²⁹. Thus, artificial inoculation of the virus confirmed the timing of peak viral loads observed in naturally infected individuals, whereas onset of symptoms was faster in the human challenge cases. In contrast to natural infection, in artificial inoculation, virus-containing drops with high viral load are directly applied in the nose and therefore reach the nasal epithelium more quickly, which might lead to the more rapid appearance of symptoms. For Delta, the estimated incubation period was between 3.7 and 4 days^{81–83,97}, whereas infection with Omicron BA.1 was characterized by an even shorter incubation period of 3–3.4 days^{83,112,113} (Fig. 3). However, as the time point of infection is rarely known outside of human challenge trials, dpos is most commonly used when analysing viral load and infectious virus.

Considering that high viral loads can be detected in the URT of infected individuals regardless of their clinical manifestations, the presence of symptoms is an unreliable indicator of infectiousness. Notably, individuals infected with SARS-CoV-2 can be infectious before the onset of symptoms⁵⁹, and it was estimated that about half of secondary transmissions take place in the pre-symptomatic phase^{59,114}. Moreover, according to population surveys, asymptomatic cases represent around 40% of all SARS-CoV-2 infections with ancestral SARS-CoV-2 (refs. ^{115–117}), and tracing of close contacts of confirmed cases of SARS-CoV-2 found that up to 23% of infections were asymptomatic¹¹⁸.

There are conflicting findings regarding viral shedding differences in symptomatic and asymptomatic patients. Comparison of viral loads between symptomatic and asymptomatic patients remains challenging, as the time of exposure cannot be clearly identified in asymptomatic individuals, and dpos cannot be used when comparing

viral loads with symptomatic individuals. Furthermore, individuals who do not show clinical symptoms at the time of testing can represent either true asymptomatic individuals or pre-symptomatic individuals who will develop symptoms later. Thus, only well-controlled studies with a follow-up of assessed individuals can make a clear distinction between pre-symptomatic and asymptomatic individuals. A study on ancestral SARS-CoV-2, which followed COVID-19 confirmed cases hospitalized for isolation and recorded symptoms daily, found similar initial Ct values between asymptomatic and symptomatic individuals¹¹⁹. Similarly, no significant difference in RNA viral loads between symptomatic and asymptomatic patients was found in other studies in which patients were followed longitudinally and the presence of symptoms was either monitored by health-care professionals¹²⁰ or was self-reported¹¹⁵. By contrast, other studies, in which symptoms were also recorded by clinicians, reported lower RNA viral loads in asymptomatic participants^{121,122}. In addition, one study found a faster clearance of viral RNA in asymptomatic than in symptomatic individuals¹²³, and another recorded a longer median duration of viral RNA shedding among asymptomatic patients¹¹⁹.

There are limited data regarding the presence of infectious virus in asymptomatic patients. One study showed lower virus isolation success from asymptomatic patients¹²⁴, but only a small number of patients were included. Therefore, more studies evaluating infectious virus in asymptomatic patients would help to elucidate the differences in their infectivity compared with symptomatic patients.

SARS-CoV-2 transmission

Viral loads have a key role in the SARS-CoV-2 transmission. As previously discussed, host (role of vaccination or previous infection) and viral factors (SARS-CoV-2 variants) greatly influence viral load dynamics and therefore further influence viral transmission.

Influence of viral load on transmission

SARS-CoV-2 can be transmitted via larger droplets and aerosols produced when breathing, speaking, sneezing or coughing and to a lesser extent also by contaminated surfaces. As an infection can only be induced by infectious viral particles and not by remnant RNA or protein alone, the presence of infectious SARS-CoV-2 is required for secondary transmission. Although transmission is a multifactorial process that is also influenced, for example, by environmental and behavioural factors (such as humidity, air quality, exposure time or closeness of contact), the viral load of SARS-CoV-2 in the URT is considered to be a proxy for transmission risk.

An epidemiological study that included viral load analysis found that viral load of an index case strongly correlates with onward transmission, with higher viral loads for ancestral SARS-CoV-2 presenting a greater secondary attack rate risk¹²⁵. In this study, viral load was identified as the main driver of transmission, with a more pronounced effect in household settings than in non-household settings (hospitals and nursing homes, among others). Transmission probability peaks around symptom onset, when infectious virus titres are estimated to be the highest during the course of infection. As viral load decreases with time, the probability of transmission also gradually declines in cases of infection with ancestral SARS-CoV-2 (ref.¹²⁶). On this note, a study of health-care workers infected with ancestral virus documented no transmission from index cases later than 6 dpos, which is in line with findings showing reduced virus isolation success towards the end of week 1 of symptomatic disease¹²⁷.

However, there are limitations when using viral load of an index case as a proxy for transmission. To date, the infectious dose of SARS-CoV-2 required to lead to a secondary transmission is not yet known, and the association between presence of infectious virus in the respiratory tract and infectiousness of the same individuals is poorly understood. In the only available human challenge trial that was conducted with ancestral SARS-CoV-2, an initial infectious dose of 10 TCID₅₀ did not lead to an infection in 16 of 36 participants²⁹. Other factors, such as symptoms, type of contact, protective measures, vaccination status and other host factors may have an additionally strong effect on transmission^{128–133}.

Viral load can markedly vary between individuals (as a result of individual susceptibility and of immunity from previous infections or vaccination), which leads to differences in their propensity to transmit the virus. Indeed, differences have been observed in the duration of infectious virus detection and in nasal and oral viral loads for both ancestral SARS-CoV-2 and Alpha³³. Inter-individual variability was suggested to have a role in the observed heterogeneity of viral load dynamics, as some early immune signatures were significantly associated with higher oropharyngeal RNA viral loads in patients¹³⁴. Therefore, observed heterogeneity between individuals has an important role in ongoing viral transmission³³.

Such differences can lead to heterogeneity in virus transmission. Modelling with ancestral SARS-CoV-2 and Alpha estimated that individuals who are highly infectious, known as superspreaders, shed 57-fold more virus over the course of infection than those with lowest infectiousness³³. By contrast, most patients with COVID-19 do not infect other individuals as they expel few to no viral particles from their airways¹³⁵. Indeed, only a minority (about 8%) of patients positive for SARS-CoV-2 infected with ancestral SARS-CoV-2 or Alpha have significantly higher infectious virus titres than the rest of the population (as shown in a study measuring virus isolation probability in a large cohort of patients)⁸⁶. Moreover, only 15%¹¹⁴ to 19%¹³⁶ of individuals that

were infected led to 80% of secondary transmissions of ancestral SARS-CoV-2. Similar trends were confirmed for Omicron BA.1 and BA.2, for which only 9%¹³⁷ to 20%¹³⁸ of the infectious contacts were responsible for 80% of all transmissions.

Superspreading events are therefore characterized by infectious individuals having close contact with a high number of susceptible individuals and by a higher probability of transmission per contact. Aside from biological factors influencing these events, sociobehavioural and environmental factors contribute to the likelihood of superspreading (for example, large indoor gatherings with poor ventilation and no other infection prevention measures). Moreover, particular locations can represent a higher risk of transmission (for example, many superspreading events take place in crowded indoor settings, such as cruise ships, family gatherings, parties, elderly care centres and hospitals)¹³⁹.

The role of pre-existing immunity on viral shedding and transmission

All currently licensed SARS-CoV-2 vaccines are administered intramuscularly, leading to a rise in serum antibodies and protection from severe disease and death due to COVID-19, but not to long-term protection from infection^{140–142}. The levels of circulating antibodies generated following vaccination decline over time, but can be elevated by a booster dose^{143,144}. Furthermore, currently available vaccines were developed against the ancestral SARS-CoV-2 strain using the spike protein of the first sequenced virus, and the degree of protection from severe disease against other genetic variants was shown to vary¹⁴⁵. Moreover, vaccination leads to limited induction of neutralizing antibodies on mucosal surfaces, which may have a role in mitigating virus replication and prevention of more pronounced disease^{146,147}. For instance, secretory component antibodies, which are specific to mucosal surfaces, were detected in the saliva in 58% of participants 2 weeks post-vaccination with mRNA vaccines in one study, but the levels were significantly lower than in convalescent participants, and their neutralizing capacity significantly decayed 6 months post-vaccination¹⁴⁸. A study on a small group of individuals uninfected or infected with Delta demonstrated that mucosal antibody responses induced by vaccination were low or undetectable, but breakthrough infections led to substantial increases of antibody titres in saliva¹⁴⁹. However, the role of pre-existing mucosal immunity on infectious virus shedding and the possible correlation between the mucosal antibodies and viral loads in humans has not been elucidated.

As a result of waning antibodies and the emergence of VOCs with immune-evading properties, breakthrough infections have been increasingly reported among vaccinated individuals, mainly since the emergence of the Delta and Omicron VOCs. It has been debated whether vaccination with current SARS-CoV-2 vaccines impacts viral load (and therefore shedding) in breakthrough infections. The effect of vaccination on viral load and shedding is therefore of interest as it would mean that vaccination not only protects the vaccinee but can also help to mitigate virus spread by reducing infectious virus titres or shortening infectious shedding periods, thus having an impact beyond protection of the individual.

Overall, vaccination has been found to lead to reduced viral load (Fig. 4), although this decreases with time. Vaccination with ChAdOx1 vaccine (the Oxford–AstraZeneca vaccine) or BNT162b2 (the Pfizer/BioNTech vaccine) leads to lower RNA viral loads in individuals infected with Alpha, but the effect was weaker for breakthrough infections with Delta^{150,151}. Immunization with BNT162b2 led to reduced RNA viral loads in Delta breakthrough infections, although this effect declined

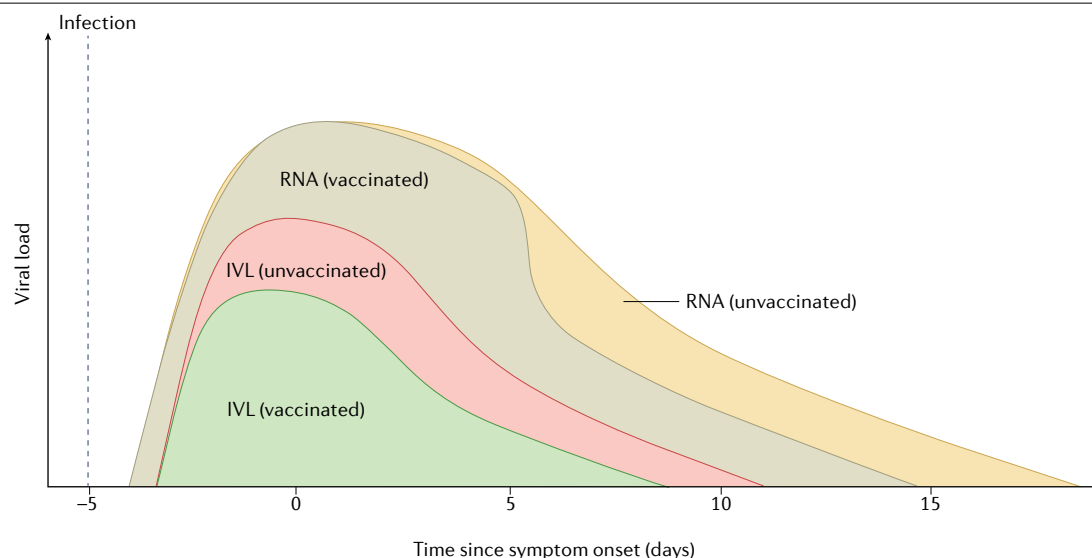


Fig. 4 | Influence of vaccination on viral load. Similar RNA viral loads were detected in vaccinated and unvaccinated patients infected with the Delta variant of concern during the first 5 days post-onset of symptoms. However, faster clearance of viral RNA was shown in vaccinated patients. Infectious viral loads (IVLs) were significantly lower in vaccinated individuals and declined

faster than in unvaccinated individuals infected with Delta. Dynamics of viral loads in vaccinated individuals may vary widely in case of infection with another variant. Details of the underlying studies used to generate Fig. 4 can be found in Supplementary Table 3.

2 months after vaccination and ultimately faded 6 months after vaccination¹⁵². Immunization with ChAdOx1 vaccine also led to a reduction of RNA viral load in breakthrough infections with Alpha VOC¹⁵³. Faster clearance of RNA viral loads was detected in the group of vaccinated patients who mostly received mRNA vaccines^{154,155}, and lower probability of isolation of infectious virus from patients vaccinated with mRNA or adenoviral vector vaccines was observed^{156,157}. Even though not all studies could demonstrate a reduction of RNA viral loads in Delta breakthrough infections^{150,154}, infectious virus titres were reported to be lower in individuals vaccinated with mRNA or adenoviral vector vaccines despite similar levels of viral RNA^{25,93,157}. Vaccination was also found to influence infectious virus isolation. Viable virus in cell culture was detected for significantly longer median time periods in unvaccinated patients infected with Delta than in vaccinated patients infected with Delta^{155,158}. However, no significant differences in RNA viral loads were found between unvaccinated, fully vaccinated or boosted patients infected with Omicron BA.1 or BA.2 (refs. ^{93,159}), whereas infectious virus titres, measured quantitatively at 5 dpos, were lower in Omicron BA.1 breakthrough infections only after a booster dose²⁵. Other studies showed that vaccination status did not influence infectious virus isolation success⁹³ or the time from initial positive PCR assay to culture conversion in patients infected with Omicron BA.1 (ref. ⁸⁵). These studies indicate that triple vaccination reduces infectious viral load but not the time period during which infectious virus can be isolated from Omicron breakthrough infections.

There are limited data on the effect of previous infection on viral shedding. A study performed on ancestral SARS-CoV-2 demonstrated lower RNA viral loads among seropositive individuals than among seronegative individuals¹⁶⁰. Although higher levels of reinfection with Omicron BA.1 were demonstrated among unvaccinated patients previously infected with other SARS-CoV-2 variants¹⁶¹, there are no relevant data on the effect of previous infections on viral load dynamics.

Together, these findings suggest that vaccinated individuals are less infectious than unvaccinated individuals, although the duration of this effect has not been studied systematically. Nevertheless, there are some conflicting data on the effect of vaccination on onward transmission. An epidemiological study performed in the UK found that, despite RNA viral load declining faster among fully vaccinated than unvaccinated patients infected with Delta, the peak RNA viral loads were similar, and the secondary attack rate among household contacts exposed to fully vaccinated or unvaccinated index cases did not differ¹⁵¹. By contrast, data from Israel showed that less Delta transmission took place in households with vaccinated participants than with unvaccinated participants¹³⁰. Another study from the UK showed that both BNT162b2 and ChAdOx1 vaccines led to the reduction of onward transmission from vaccinated index patients, although a stronger reduction was detected for Alpha than for Delta¹²⁹, probably owing to the higher viral loads in the case of infection with Delta, as shown previously^{88,89,129}. Finally, another study found that vaccination was associated with reduced onward transmission of Delta breakthrough infection due to shorter duration of viable virus shedding¹⁵⁸.

Overall, even though the currently used vaccines are still based on the ancestral virus spike protein and elicit mainly a systemic rather than a mucosal immune response, some effect on viral load, infectious virus shedding and transmission has been observed^{129,130,162}. Furthermore, with increasing rates of breakthrough infections in the Omicron waves since the end of 2021, many individuals display hybrid immunity consisting of vaccination combined with one or more natural infections before or after vaccination^{163,164}. It is thought that such hybrid immunity may provide better control of virus replication in the mucosa^{149,163,165}.

With the constant emergence of novel variants that can evade existing immunity, our understanding of the effect of vaccination on viral shedding should be constantly updated¹⁶⁶. Better understanding of the role of mucosal immunity, and potentially vaccines that elicit

Glossary

Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy

A way to treat cancer by using T cells expressing genetically engineered receptors to target cancer cells.

Cycle threshold (Ct) value

The number of amplifications required for a target gene to cross the threshold determined by real-time PCR. Arbitrary test-specific Ct values inversely correlate with viral load.

Focus-forming assays

Assays that count the number of 'foci', defined as a cluster of adjacent cells expressing viral antigen stained by a specific antibody.

Immunostaining

A method for the detection of specific proteins in individual cells or tissues using antibodies. In the case of SARS-CoV-2, anti-nucleocapsid antibodies are used to detect virus in infected cells.

Index case

The infected individual who is triggering an outbreak or a cluster by transmitting an infectious agent to others. There might be multiple index cases in an outbreak or epidemiological study.

local rather than systemic immune responses, are needed to aim for viral load reduction as a means to control SARS-CoV-2 circulation^{167–169}.

Influence of SARS-CoV-2 VOCs on transmission

There are several possible underlying causes of increased transmissibility of newly emerging variants, which allow VOCs to quickly outcompete previously circulating strains, including increased viral loads, a lower infectious dose required to establish infection and prolonged period of infectiousness¹⁷⁰. Furthermore, the immune-evading properties of new variants lead to higher susceptibility of infection for vaccinated and previously infected individuals and result in higher transmissibility, as was observed with Omicron^{166,171}.

The rapid emergence of SARS-CoV-2 variants with altered biological properties has shown that knowledge on viral loads, viral kinetics and infectious virus shedding is variant specific, and each emerging variant requires a reassessment. Although understanding of mutational profiles and associated phenotypes of SARS-CoV-2 variants has improved, reasons for enhanced transmissibility are manifold and not all understood yet. To date, shedding characteristics and transmission properties cannot be easily predicted based on sequences. Unlike immune-evasion mechanisms, shedding dynamics, such as kinetics of infectious virus titres or incubation periods of the SARS-CoV-2

Plaque assays

Assays that quantify the number of infectious virions by counting plaques in a cell monolayer that correspond to single infectious particles.

Secondary attack rate

The probability that an infection spreads from an index case to susceptible people in a specific setting (usually, a household or close contacts). The term is used to evaluate the risk of onward transmission of pathogen within a population.

Seroconversion

The development of specific antibodies in the serum as a consequence of immunization by natural infection or vaccination.

sgRNA

Subgenomic RNA fragments that occur during viral replication.

TCID₅₀

A measurement of the presence of cytopathic effects in cells upon infection with serial dilutions of virus specimens, which indicates the dose needed to induce a cytopathic effect in 50% of the inoculated wells.

variants, cannot be predicted from specific mutation patterns. With a still highly dynamic situation in terms of viral evolution of SARS-CoV-2, understanding viral kinetics and their effect on transmission remains of high public health interest.

SARS-CoV-2 diagnostics in public health

Our ability to define the presence of infectious virus is key to guiding public health measures, as it will enable the isolation of infectious individuals to limit secondary transmission. Unfortunately, no point-of-care diagnostic test currently exists to determine infectious SARS-CoV-2 in a patient sample¹⁷², and virus culture as described above is not suited for diagnostic purposes. Thus, a range of approaches have been suggested to find a proxy for infectiousness to guide isolation periods.

One example is the detection of sgRNA transcripts, which are generated during virus replication, and specifically the synthesis of negative-strand RNA. Although sgRNAs are transcribed in infected cells, they are not packaged in the virions and can therefore serve as an indicator of active replication and thus of infectious virus. Specific RT-PCR assays were developed to detect sgRNAs in addition to the diagnostic detection of genomic SARS-CoV-2 RNA, but such assays have not made their way into routine diagnostic use owing to their lower sensitivity than conventional RT-PCR assays. Some studies found that detection of sgRNA correlates with detection of infectious virus^{4,173,174}, and that sgRNA was rarely detectable 8 dpos⁶⁷. However, sgRNA was detected in diagnostic samples up to 17 days after initial detection of infection¹⁷⁵ or in culture-negative samples¹⁷⁶, probably owing to the stability and nuclease resistance of double-membrane vesicles containing sgRNAs. Thus, although the absence of sgRNA would indicate absence of viral replication, the presence of sgRNA does not necessarily indicate infectiousness¹⁹.

Ct values have also been used as a proxy for infectiousness, as described above. However, as already discussed, low-quality specimens resulting from technical mistakes during the collection process can falsely indicate an absence of infectious virus. Furthermore, owing to the quick increase of RNA viral load at the beginning of the infection, a low viral load, especially in the absence of symptoms or in the early symptomatic period, does not preclude that an individual will not soon enter the infectious period with the highest transmission risk. At such a period, viral loads reach their peak levels, causing the majority of transmission events^{59,126}.

Even though Ag-RDTs are less sensitive than RT-PCR, they are less expensive, can be performed outside of laboratory settings and give faster results, and so are useful tools to guide isolation and limit transmission¹⁷⁷. RT-PCR tests have a limit of detection of 10²–10³ genome copies per millilitre, whereas Ag-RDTs have a limit of detection corresponding to 10⁴–10⁶ genome copies per millilitre^{177–180}. Infectious individuals typically have RNA viral loads of >10⁶ genome copies per millilitre, which corresponds largely with a Ct of 25 in most RT-PCR assays⁴, indicating that Ag-RDT is a good proxy for infectiousness¹⁷⁷. However, the obvious limitations of Ag-RDT, such as lower sensitivity of infectious virus detection towards the end of infection^{47,52}, should not be neglected. Ag-RDTs have also shown variation in their sensitivity and specificity for detection of SARS-CoV-2 VOCs^{53,54}, which is a challenge as new variants emerge.

Overall, all of the currently available diagnostic methods have certain limitations for detection of infectious virus. However, even if these tests serve only as imperfect tools when used as proxies for infectiousness, their implementation as part of a public health strategy is not intended to prevent every single infection, but rather to reduce the

number of infectious people in the community and thus to decrease the number of secondary transmissions.

Conclusions

Entering the third year of the pandemic, much knowledge on SARS-CoV-2 viral loads, infectious virus shedding and windows of infectiousness has been gained, although emerging SARS-CoV-2 variants and an increasing population immunity add more complexity to the situation.

Although much progress has been made during the pandemic in the field of diagnostics, **to date, no diagnostic tests exist that reliably determine the presence of infectious virus**. Continuing evaluation of viral-shedding characteristics under these changing circumstances and understanding the biological properties of novel SARS-CoV-2 variants when it comes to viral shedding remain of importance to guide public health practices.

Published online: 02 December 2022

References

- Puelles, V. G. et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* **383**, 590–592 (2020).
- Lamers, M. M. & Haagmans, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **20**, 270–284 (2022).
- Peng, L. et al. SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. *J. Med. Virol.* **92**, 1676–1680 (2020).
- Wölfel, R. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* **581**, 465–469 (2020).
- Zhang, W. et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 386–389 (2020).
- Pérez-Bartolomé, F. & Sánchez-Quiros, J. Ocular manifestations of SARS-CoV-2: literature review. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* **96**, 32–40 (2021).
- Vetter, P. et al. Daily viral kinetics and innate and adaptive immune response assessment in COVID-19: a case series. *mSphere* <https://doi.org/10.1128/mSphere.00827-20> (2020).
- Jeong, H. W. et al. Viable SARS-CoV-2 in various specimens from COVID-19 patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **26**, 1520–1524 (2020).
- Cerrada-Romero, C. et al. Excretion and viability of SARS-CoV-2 in feces and its association with the clinical outcome of COVID-19. *Sci. Rep.* **12**, 7397 (2022).
- Dergham, J. & Delerue, J. Isolation of viable SARS-CoV-2 virus from feces of an immunocompromised patient suggesting a possible fecal mode of transmission. *J. Clin. Med.* <https://doi.org/10.3390/jcm10122696> (2021).
- Xiao, F. et al. Infectious SARS-CoV-2 in feces of patient with severe COVID-19. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 1920–1922 (2020).
- Sun, J. et al. Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 991–993 (2020).
- Colavita, F. et al. SARS-CoV-2 isolation from ocular secretions of a patient with COVID-19 in Italy with prolonged viral RNA detection. *Ann. Intern. Med.* **173**, 242–243 (2020).
- Matsuyama, S. et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **117**, 7001–7003 (2020).
- Case, J. B., Bailey, A. L., Kim, A. S., Chen, R. E. & Diamond, M. S. Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2. *Virology* **548**, 39–48 (2020).
- Baggen, J., Vanstreels, E., Jansen, S. & Daelemans, D. Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. *Nat. Microbiol.* **6**, 1219–1232 (2021).
- Chu, H. et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe* **1**, e14–e23 (2020).
- van Kampen, J. J. A. et al. Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat. Commun.* **12**, 267 (2021).
- Bruce, E. A. et al. Predicting infectivity: comparing four PCR-based assays to detect culturable SARS-CoV-2 in clinical samples. *EMBO Mol. Med.* **14**, e15290 (2022).
- Essaïdi-Laziosi, M. & Perez Rodriguez, F. J. Estimating clinical SARS-CoV-2 infectiousness in Vero E6 and primary airway epithelial cells. *Lancet Microbe* **2**, e571 (2021).
- Liu, R. et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin. Chim. Acta* **505**, 172–175 (2020).
- Corman, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eur. Surveill.* <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045> (2020).
- Bullard, J. et al. Predicting infectious severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from diagnostic samples. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 2663–2666 (2020).
- Jefferson, T., Spencer, E. A., Brassey, J. & Heneghan, C. Viral cultures for coronavirus disease 2019 infectivity assessment: a systematic review. *Clin. Infect. Dis.* **73**, e3884–e3899 (2021).
- Puhach, O. et al. Infectious viral load in unvaccinated and vaccinated individuals infected with ancestral, Delta or Omicron SARS-CoV-2. *Nat. Med.* **28**, 1491–1500 (2022).
- van Kasteren, P. B. et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J. Clin. Virol.* **128**, 104412 (2020).
- Bentley, E. et al. Collaborative study for the establishment of a WHO international standard for SARS-CoV-2 RNA (WHO, 2020).
- Zou, L. et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1177–1179 (2020).
- Killingley, B. et al. Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge in young adults. *Nat. Med.* **28**, 1031–1041 (2022).
- Yu, F. et al. Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 793–798 (2020).
- European Centre for Disease Prevention and Control & World Health Organization Regional Office for Europe. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants: second update, August 2022 (WHO, 2022).
- Ke, R. et al. Longitudinal analysis of SARS-CoV-2 vaccine breakthrough infections reveals limited infectious virus shedding and restricted tissue distribution. *Open Forum Infect. Dis.* **9**, ofac192 (2022).
- Ke, R. et al. Daily longitudinal sampling of SARS-CoV-2 infection reveals substantial heterogeneity in infectiousness. *Nat. Microbiol.* **7**, 640–652 (2022).
- Pekosz, A. et al. Antigen-based testing but not real-time polymerase chain reaction correlates with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral culture. *Clin. Infect. Dis.* **73**, e2861–e2866 (2021).
- Monel, B. et al. Release of infectious virus and cytokines in nasopharyngeal swabs from individuals infected with non-Alpha or Alpha SARS-CoV-2 variants: an observational retrospective study. *EBioMedicine* **73**, 103637 (2021).
- Kirby, J. E. et al. SARS-CoV-2 antigen tests predict infectivity based on viral culture: comparison of antigen, PCR viral load, and viral culture testing on a large sample cohort. *Clin. Microbiol. Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.07.010> (2022).
- Pickering, S. et al. Comparative performance of SARS-CoV-2 lateral flow antigen tests and association with detection of infectious virus in clinical specimens: a single-centre laboratory evaluation study. *Lancet Microbe* **2**, e461–e471 (2021).
- Tariq, M. et al. Viable severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolates exhibit higher correlation with rapid antigen assays than subgenomic RNA or genomic RNA. *Front. Microbiol.* **12**, 718497 (2021).
- Chu, V. T. et al. Comparison of home antigen testing with RT-PCR and viral culture during the course of SARS-CoV-2 infection. *JAMA Intern. Med.* **182**, 701–709 (2022).
- Albert, E. et al. Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag rapid test device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 472.e7–472.e10 (2021).
- Ford, L. et al. Epidemiologic characteristics associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) antigen-based test results, real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) cycle threshold values, subgenomic RNA, and viral culture results from university testing. *Clin. Infect. Dis.* **73**, e1348–e1355 (2021).
- Berger, A. et al. Diagnostic accuracy of two commercial SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid tests at the point of care in community-based testing centers. *PLoS ONE* **16**, e0248921 (2021).
- Brümmer, L. E. et al. Accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: a living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* **18**, e1003735 (2021).
- Ngo Nsoga, M. T. et al. Diagnostic accuracy of Panbio rapid antigen tests on oropharyngeal swabs for detection of SARS-CoV-2. *PLoS ONE* **16**, e0253321 (2021).
- Korenkov, M. et al. Evaluation of a rapid antigen test to detect SARS-CoV-2 infection and identify potentially infectious individuals. *J. Clin. Microbiol.* **59**, e0089621 (2021).
- Yamayoshi, S. et al. Comparison of rapid antigen tests for COVID-19. *Viruses* **12**, 1420 (2020).
- McKay, S. L. et al. Performance evaluation of serial SARS-CoV-2 rapid antigen testing during a nursing home outbreak. *Ann. Intern. Med.* **174**, 945–951 (2021).
- Nordgren, J. et al. SARS-CoV-2 rapid antigen test: high sensitivity to detect infectious virus. *J. Clin. Virol.* **140**, 104846 (2021).
- Fernandez-Montero, A. & Argemi, J. Validation of a rapid antigen test as a screening tool for SARS-CoV-2 infection in asymptomatic populations. Sensitivity, specificity and predictive values. *EClinicalMedicine* **37**, 100954 (2021).
- Currie, D. W. et al. Relationship of SARS-CoV-2 antigen and reverse transcription PCR positivity for viral cultures. *Emerg. Infect. Dis.* **28**, 717–720 (2022).
- Corman, V. M. et al. Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid point-of-care antigen tests: a single-centre laboratory evaluation study. *Lancet Microbe* **2**, e311–e319 (2021).
- Lopera, T. J. & Alzate-Ángel, J. C. The usefulness of antigen testing in predicting contagiousness in COVID-19. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0196221 (2022).
- Osterman, A. et al. Impaired detection of Omicron by SARS-CoV-2 rapid antigen tests. *Med. Microbiol. Immunol.* **211**, 105–117 (2022).
- Galliez, R. M. et al. Evaluation of the Panbio COVID-19 antigen rapid diagnostic test in subjects infected with Omicron using different specimens. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0125022 (2022).
- Raich-Regué, D. et al. Performance of SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic tests for Omicron and other variants of concern. *Front. Microbiol.* **13**, 810576 (2022).
- van Ogtrop, M. L., van de Laar, T. J. W., Eggink, D., Vanhommerig, J. W. & van der Reijden, W. A. Comparison of the performance of the Panbio COVID-19 antigen test in SARS-CoV-2 B.1.1.7 (Alpha) variants versus non-B.1.1.7 variants. *Microbiol. Spectr.* **9**, e0088421 (2021).

57. Lindner, A. K. et al. Head-to-head comparison of SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid test with self-collected nasal swab versus professional-collected nasopharyngeal swab. *Eur. Respir. J.* **57**, 2003961 (2021).
58. Meiners, L. & Horn, J. SARS-CoV-2 rapid antigen test sensitivity and viral load in freshly symptomatic hospital employees, December 2020 to February 2022. Preprint at <https://doi.org/10.2139/ssrn.4099425> (2022).
59. He, X. et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 672–675 (2020).
60. Néant, N. et al. Modeling SARS-CoV-2 viral kinetics and association with mortality in hospitalized patients from the French COVID cohort. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **118**, e2017962118 (2021).
61. Owusu, D. et al. Persistent SARS-CoV-2 RNA shedding without evidence of infectiousness: a cohort study of individuals with COVID-19. *J. Infect. Dis.* **224**, 1362–1371 (2021).
62. Cevik, M. et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe* **2**, e13–e22 (2021).
63. Chen, X. et al. Associations of clinical characteristics and treatment regimens with the duration of viral RNA shedding in patients with COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.* **98**, 252–260 (2020).
64. Kim, S. M. & Hwang, Y. J. Prolonged SARS-CoV-2 detection and reversed RT-PCR results in mild or asymptomatic patients. *Infect. Dis.* **53**, 31–37 (2021).
65. Talmy, T. & Tsur, A. Duration of SARS-CoV-2 detection in Israel Defense Forces soldiers with mild COVID-19. *J. Med. Virol.* **93**, 608–610 (2021).
66. Singanayagam, A. et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill.* <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483> (2020).
67. Perera, R. et al. SARS-CoV-2 virus culture and subgenomic RNA for respiratory specimens from patients with mild coronavirus disease. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 2701–2704 (2020).
68. Killerby, M. E. et al. Shedding of culturable virus, seroconversion, and 6-month follow-up antibody responses in the first 14 confirmed cases of coronavirus disease 2019 in the United States. *J. Infect. Dis.* **224**, 771–776 (2021).
69. Glans, H. et al. Shedding of infectious SARS-CoV-2 by hospitalized COVID-19 patients in relation to serum antibody responses. *BMC Infect. Dis.* **21**, 494 (2021).
70. Badu, K. et al. SARS-CoV-2 viral shedding and transmission dynamics: implications of WHO COVID-19 discharge guidelines. *Front. Med.* **8**, 648660 (2021).
71. Munker, D. et al. Dynamics of SARS-CoV-2 shedding in the respiratory tract depends on the severity of disease in COVID-19 patients. *Eur. Respir. J.* **58**, 2002724 (2021).
72. Folgosa, M. D. & Luczkowiak, J. Prolonged SARS-CoV-2 cell culture replication in respiratory samples from patients with severe COVID-19. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 886–891 (2021).
73. Kim, M. C. et al. Duration of culturable SARS-CoV-2 in hospitalized patients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **384**, 671–673 (2021).
74. Chen, P. Z. et al. SARS-CoV-2 shedding dynamics across the respiratory tract, sex, and disease severity for adult and pediatric COVID-19. *eLife* <https://doi.org/10.7554/eLife> (2021).
75. Cunha, M. D. P. et al. Atypical prolonged viral shedding with intra-host SARS-CoV-2 evolution in a mildly affected symptomatic patient. *Front. Med.* **8**, 760170 (2021).
76. Aydllo, T. et al. Shedding of viable SARS-CoV-2 after immunosuppressive therapy for cancer. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2586–2588 (2020).
77. Caillard, S., Benotmane, I., Gautier Vargas, G., Perrin, P. & Fafi-Kremer, S. SARS-CoV-2 viral dynamics in immunocompromised patients. *Am. J. Transpl.* **21**, 1667–1669 (2021).
78. Roedel, K. et al. Viral dynamics of SARS-CoV-2 in critically ill allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immunocompetent patients with COVID-19. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **203**, 242–245 (2021).
79. Leung, W. F. et al. COVID-19 in an immunocompromised host: persistent shedding of viable SARS-CoV-2 and emergence of multiple mutations: a case report. *Int. J. Infect. Dis.* **114**, 178–182 (2022).
80. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: assessing SARS-CoV-2 circulation, variants of concern, non-pharmaceutical interventions and vaccine rollout in the EU/EEA, 15th update (European Centre for Disease Prevention and Control, 2021).
81. Grant, R. et al. Impact of SARS-CoV-2 Delta variant on incubation, transmission settings and vaccine effectiveness: results from a nationwide case–control study in France. *Lancet Reg. Health Eur.* **13**, 100278 (2022).
82. Ogata, T. & Tanaka, H. Shorter incubation period among unvaccinated Delta variant coronavirus disease 2019 patients in Japan. *Int. J. Environ. Res. Public Health* <https://doi.org/10.3390/ijerph19031127> (2022).
83. Backer, J. A. et al. Shorter serial intervals in SARS-CoV-2 cases with Omicron BA.1 variant compared with Delta variant, the Netherlands, 13 to 26 December 2021. *Eur. Surveill.* <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.6.2200042> (2022).
84. Takahashi, K. et al. Duration of infectious virus shedding by SARS-CoV-2 Omicron variant-infected vaccinees. *Emerg. Infect. Dis.* **28**, 998–1001 (2022).
85. Boucau, J. et al. Duration of shedding of culturable virus in SARS-CoV-2 Omicron (BA.1) infection. *N. Engl. J. Med.* **387**, 275–277 (2022).
86. Jones, T. C. et al. Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. *Science* <https://doi.org/10.1126/science.abi5273> (2021).
87. Li, B. et al. Viral infection and transmission in a large, well-traced outbreak caused by the SARS-CoV-2 Delta variant. *Nat. Commun.* **13**, 460 (2022).
88. Bolze, A. et al. SARS-CoV-2 variant Delta rapidly displaced variant Alpha in the United States and led to higher viral loads. *Cell Rep. Med.* **3**, 100564 (2022).
89. Earnest, R. et al. Comparative transmissibility of SARS-CoV-2 variants Delta and Alpha in New England, USA. *Cell Rep. Med.* **3**, 100583 (2022).
90. Luo, C. H. et al. Infection with the SARS-CoV-2 Delta variant is associated with higher recovery of infectious virus compared to the Alpha variant in both unvaccinated and vaccinated individuals. *Clin. Infect. Dis.* **75**, e715–e725 (2021).
91. Despres, H. W. et al. Measuring infectious SARS-CoV-2 in clinical samples reveals a higher viral titer: RNA ratio for Delta and Epsilon vs. Alpha variants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* <https://doi.org/10.1073/pnas.2116518119> (2022).
92. Hay, J. A. et al. Quantifying the impact of immune history and variant on SARS-CoV-2 viral kinetics and infection rebound: a retrospective cohort study. *eLife* **11**, e81849 (2022).
93. Fall, A. et al. The displacement of the SARS-CoV-2 variant Delta with Omicron: an investigation of hospital admissions and upper respiratory viral loads. *EbioMedicine* <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104008> (2022).
94. Lentini, A. & Pereira, A. Monitoring of the SARS-CoV-2 Omicron BA.1/BA.2 lineage transition in the Swedish population reveals increased viral RNA levels in BA.2 cases. *Med* **3**, 636–664 (2022).
95. Qassim, S. H. et al. Effects of BA.1/BA.2 subvariant, vaccination, and prior infection on infectiousness of SARS-CoV-2 Omicron infections. *J. Travel Med.* **29**, taac068 (2022).
96. Marking, U. et al. Correlates of protection, viral load trajectories and symptoms in BA.1, BA.1.1 and BA.2 breakthrough infections in triple vaccinated healthcare workers. Preprint at [medRxiv https://doi.org/10.1101/2022.04.02.22273333](https://doi.org/10.1101/2022.04.02.22273333) (2022).
97. Wang, Y. et al. Transmission, viral kinetics and clinical characteristics of the emergent SARS-CoV-2 Delta VOC in Guangzhou, China. *EClinicalMedicine* **40**, 101129 (2021).
98. Siedner, M. J. et al. Duration of viral shedding and culture positivity with postvaccination SARS-CoV-2 Delta variant infections. *JCI Insight* <https://doi.org/10.1172/jci.insight.155483> (2022).
99. Pierce, C. A. et al. Immune responses to SARS-CoV-2 infection in hospitalized pediatric and adult patients. *Sci. Transl. Med.* **12**, eabd5487 (2020).
100. Takahashi, T. et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature* **588**, 315–320 (2020).
101. Bunyavanich, S., Do, A. & Vicencio, A. Nasal gene expression of angiotensin-converting enzyme 2 in children and adults. *JAMA* **323**, 2427–2429 (2020).
102. Zheng, S. et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January–March 2020: retrospective cohort study. *BMJ* **369**, m1443 (2020).
103. L'Huillier, A. G. & Torriani, G. Culture-competent SARS-CoV-2 in nasopharynx of symptomatic neonates, children, and adolescents. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 2494–2497 (2020).
104. Baggio, S. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral load in the upper respiratory tract of children and adults with early acute coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* **73**, 148–150 (2021).
105. Chung, E. et al. Comparison of symptoms and RNA levels in children and adults with SARS-CoV-2 infection in the community setting. *JAMA Pediatr.* **175**, e212025 (2021).
106. Han, M. S. et al. Clinical characteristics and viral RNA detection in children with coronavirus disease 2019 in the Republic of Korea. *JAMA Pediatr.* **175**, 73–80 (2021).
107. Bellon, M. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral load kinetics in symptomatic children, adolescents, and adults. *Clin. Infect. Dis.* **73**, e1384–e1386 (2021).
108. Madera, S. et al. Nasopharyngeal SARS-CoV-2 viral loads in young children do not differ significantly from those in older children and adults. *Sci. Rep.* **11**, 3044 (2021).
109. Lauer, S. A. et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann. Intern. Med.* **172**, 577–582 (2020).
110. Elias, C., Sekki, A., Leblanc, P., Cucherat, M. & Vanhems, P. The incubation period of COVID-19: a meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* **104**, 708–710 (2021).
111. Dhoubi, W. et al. The incubation period during the pandemic of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.* **10**, 101 (2021).
112. Brandal, L. T. et al. Outbreak caused by the SARS-CoV-2 Omicron variant in Norway, November to December 2021. *Eur. Surveill.* **26**, 2101147 (2021).
113. Wu, Y. et al. Incubation period of COVID-19 caused by unique SARS-CoV-2 strains: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw. Open* **5**, e2228008 (2022).
114. Sun, K. et al. Transmission heterogeneities, kinetics, and controllability of SARS-CoV-2. *Science* **371**, eabe2424 (2021).
115. Lavezzo, E. et al. Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo'. *Nature* **584**, 425–429 (2020).
116. Gudbjartsson, D. F. et al. Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic population. *N. Engl. J. Med.* **382**, 2302–2315 (2020).
117. Gilet, M. et al. Asymptomatic COVID-19 adult outpatients identified as significant viable SARS-CoV-2 shedders. *Sci. Rep.* **11**, 20615 (2021).
118. Wang, Y. et al. Characterization of an asymptomatic cohort of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infected individuals outside of Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 2132–2138 (2020).
119. Long, Q. X. et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat. Med.* **26**, 1200–1204 (2020).
120. Lee, S. et al. Clinical course and molecular viral shedding among asymptomatic and symptomatic patients with SARS-CoV-2 infection in a community treatment center in the Republic of Korea. *JAMA Intern. Med.* **180**, 1447–1452 (2020).

121. Zhou, R. et al. Viral dynamics in asymptomatic patients with COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.* **96**, 288–290 (2020).
122. Hall, S. M. et al. Comparison of anterior nares CT values in asymptomatic and symptomatic individuals diagnosed with SARS-CoV-2 in a university screening program. *PLoS ONE* **17**, e0270694 (2022).
123. Kissler, S. M. et al. Viral dynamics of acute SARS-CoV-2 infection and applications to diagnostic and public health strategies. *PLoS Biol.* **19**, e3001333 (2021).
124. Tallmadge, R. L. et al. Viral RNA load and infectivity of SARS-CoV-2 in paired respiratory and oral specimens from symptomatic, asymptomatic, or postsymptomatic individuals. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0226421 (2022).
125. Marks, M. et al. Transmission of COVID-19 in 282 clusters in Catalonia, Spain: a cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **21**, 629–636 (2021).
126. Marc, A. et al. Quantifying the relationship between SARS-CoV-2 viral load and infectiousness. *eLife* <https://doi.org/10.7554/eLife.69302> (2021).
127. Cheng, H. Y. et al. Contact tracing assessment of COVID-19 transmission dynamics in Taiwan and risk at different exposure periods before and after symptom onset. *JAMA Intern. Med.* **180**, 1156–1163 (2020).
128. Muggleston, M. A. et al. Presymptomatic, asymptomatic and post-symptomatic transmission of SARS-CoV-2: joint British Infection Association (BIA), Healthcare Infection Society (HIS), Infection Prevention Society (IPS) and Royal College of Pathologists (RCPath) guidance. *BMC Infect. Dis.* **22**, 453 (2022).
129. Eyre, D. W. et al. Effect of Covid-19 vaccination on transmission of Alpha and Delta variants. *N. Engl. J. Med.* **386**, 744–756 (2022).
130. Prunas, O. et al. Vaccination with BNT162b2 reduces transmission of SARS-CoV-2 to household contacts in Israel. *Science* **375**, 1151–1154 (2022).
131. Lyngse, F. P. et al. Household transmission of SARS-CoV-2 Omicron variant of concern subvariants BA.1 and BA.2 in Denmark. *Nat. Commun.* **13**, 5760 (2022).
132. Leung, N. H. L. Transmissibility and transmission of respiratory viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 528–545 (2021).
133. Alihsan, B. et al. The efficacy of facemasks in the prevention of COVID-19: a systematic review. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2022.07.28.22278153> (2022).
134. Hu, Z. et al. Early immune markers of clinical, virological, and immunological outcomes in patients with COVID-19: a multi-omics study. *Elife* **11**, e77943 (2022).
135. Chen, P. Z. et al. Heterogeneity in transmissibility and shedding SARS-CoV-2 via droplets and aerosols. *eLife* <https://doi.org/10.7554/eLife.65774> (2021).
136. Adam, D. C. et al. Clustering and superspreading potential of SARS-CoV-2 infections in Hong Kong. *Nat. Med.* **26**, 1714–1719 (2020).
137. Guo, Z. et al. Superspreading potential of infection seeded by the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant in South Korea. *J. Infect.* **85**, e77–e79 (2022).
138. Guo, Z. et al. Superspreading potential of COVID-19 outbreak seeded by Omicron variants of SARS-CoV-2 in Hong Kong. *J. Travel Med.* **29**, taac049 (2022).
139. Althouse, B. M. et al. Superspreading events in the transmission dynamics of SARS-CoV-2: opportunities for interventions and control. *PLoS Biol.* **18**, e3000897 (2020).
140. Baden, L. R. et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **384**, 403–416 (2021).
141. Lopez Bernal, J. et al. Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B.1.617.2 (Delta) variant. *N. Engl. J. Med.* **385**, 585–594 (2021).
142. Feikin, D. R. et al. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression. *Lancet* **399**, 924–944 (2022).
143. Belik, M. et al. Comparative analysis of COVID-19 vaccine responses and third booster dose-induced neutralizing antibodies against Delta and Omicron variants. *Nat. Commun.* **13**, 2476 (2022).
144. Pegu, A. et al. Durability of mRNA-1273 vaccine-induced antibodies against SARS-CoV-2 variants. *Science* **373**, 1372–1377 (2021).
145. Lipsitch, M., Krammer, F., Regev-Yochay, G., Lustig, Y. & Balicer, R. D. SARS-CoV-2 breakthrough infections in vaccinated individuals: measurement, causes and impact. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 57–65 (2022).
146. Mostaghimi, D., Valdez, C. N., Larson, H. T., Kalinich, C. C. & Iwasaki, A. Prevention of host-to-host transmission by SARS-CoV-2 vaccines. *Lancet Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00472-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00472-2) (2021).
147. Russell, M. W., Moldoveanu, Z., Ogra, P. L. & Mestecky, J. Mucosal immunity in COVID-19: a neglected but critical aspect of SARS-CoV-2 infection. *Front. Immunol.* **11**, 611337 (2020).
148. Sheikh-Mohamed, S. et al. Systemic and mucosal IgA responses are variably induced in response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination and are associated with protection against subsequent infection. *Mucosal Immunol.* **15**, 799–808 (2022).
149. Collier, A. Y. et al. Characterization of immune responses in fully vaccinated individuals after breakthrough infection with the SARS-CoV-2 Delta variant. *Sci. Transl. Med.* **14**, eabn6150 (2022).
150. Pouwels, K. B. et al. Effect of Delta variant on viral burden and vaccine effectiveness against new SARS-CoV-2 infections in the UK. *Nat. Med.* **27**, 2127–2135 (2021).
151. Singanayagam, A. et al. Community transmission and viral load kinetics of the SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) variant in vaccinated and unvaccinated individuals in the UK: a prospective, longitudinal, cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **22**, 183–195 (2021).
152. Levine-Tiefenbrun, M. et al. Viral loads of Delta-variant SARS-CoV-2 breakthrough infections after vaccination and booster with BNT162b2. *Nat. Med.* **27**, 2108–2110 (2021).
153. Emary, K. R. W. et al. Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* **397**, 1351–1362 (2021).
154. Chia, P. Y. et al. Virological and serological kinetics of SARS-CoV-2 Delta variant vaccine breakthrough infections: a multicentre cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* **28**, 612.e1–612.e7 (2021).
155. Garcia-Knight, M. et al. Infectious viral shedding of SARS-CoV-2 Delta following vaccination: a longitudinal cohort study. *PLoS Pathog.* **18**, e1010802 (2022).
156. Peña-Hernández, M. A. et al. Comparison of infectious SARS-CoV-2 from the nasopharynx of vaccinated and unvaccinated individuals. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.12.28.21268460> (2022).
157. Shamier, M. C. et al. Virological characteristics of SARS-CoV-2 vaccine breakthrough infections in health care workers. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.08.20.21262158> (2021).
158. Jung, J. et al. Transmission and infectious SARS-CoV-2 shedding kinetics in vaccinated and unvaccinated individuals. *JAMA Netw. Open* **5**, e2213606 (2022).
159. Hirotsu, Y. et al. Similar viral loads in Omicron infections regardless of vaccination status. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2022.04.19.22274005> (2022).
160. Letizia, A. G. et al. SARS-CoV-2 seropositivity and subsequent infection risk in healthy young adults: a prospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* **9**, 712–720 (2021).
161. Pulliam, J. R. C. et al. Increased risk of SARS-CoV-2 reinfection associated with emergence of Omicron in South Africa. *Science* **376**, eabn4947 (2022).
162. Harris, R. J. et al. Effect of vaccination on household transmission of SARS-CoV-2 in England. *N. Engl. J. Med.* **385**, 759–760 (2021).
163. Bates, T. A. et al. Vaccination before or after SARS-CoV-2 infection leads to robust humoral response and antibodies that effectively neutralize variants. *Sci. Immunol.* **7**, eabn8014 (2022).
164. Wratisl, P. R. et al. Three exposures to the spike protein of SARS-CoV-2 by either infection or vaccination elicit superior neutralizing immunity to all variants of concern. *Nat. Med.* **28**, 496–503 (2022).
165. Malato, J. et al. Risk of BA.5 infection among persons exposed to previous SARS-CoV-2 variants. *N. Engl. J. Med.* **387**, 953–954 (2022).
166. Cao, Y. et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nature* **608**, 593–602 (2022).
167. Hassan, A. O. et al. A single-dose intranasal ChAd vaccine protects upper and lower respiratory tracts against SARS-CoV-2. *Cell* **183**, 169–184 (2020).
168. Lapuente, D. et al. Protective mucosal immunity against SARS-CoV-2 after heterologous systemic prime-mucosal boost immunization. *Nat. Commun.* **12**, 6871 (2021).
169. Afkhami, S. et al. Respiratory mucosal delivery of next-generation COVID-19 vaccine provides robust protection against both ancestral and variant strains of SARS-CoV-2. *Cell* **185**, 896–915 (2022).
170. Grubaugh, N. D. & Hodcroft, E. B. Public health actions to control new SARS-CoV-2 variants. *Cell* **184**, 1127–1132 (2021).
171. Carreño, J. M. et al. Activity of convalescent and vaccine serum against SARS-CoV-2 Omicron. *Nature* **602**, 682–688 (2022).
172. Ashcroft, P., Lehtinen, S. & Bonhoeffer, S. Test-trace-isolate-quarantine (TTIQ) intervention strategies after symptomatic COVID-19 case identification. *PLoS ONE* **17**, e0263597 (2022).
173. Santos Bravo, M. et al. Viral culture confirmed SARS-CoV-2 subgenomic RNA value as a good surrogate marker of infectivity. *J. Clin. Microbiol.* **60**, e0160921 (2022).
174. Kim, J. Y. et al. Diagnostic usefulness of subgenomic RNA detection of viable SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Clin. Microbiol. Infect.* **28**, 101–106 (2022).
175. Alexandersen, S. & Chamings, A. SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nat. Commun.* **11**, 6059 (2020).
176. Bonenfant, G. et al. Surveillance and correlation of SARS-CoV-2 viral RNA, antigen, virus isolation, and self-reported symptoms in a longitudinal study with daily sampling. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciac282> (2022).
177. Peeling, R. W., Heymann, D. L., Teo, Y. Y. & Garcia, P. J. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. *Lancet* **399**, 757–768 (2022).
178. Pilarowski, G. et al. Performance characteristics of a rapid severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antigen detection assay at a public plaza testing site in San Francisco. *J. Infect. Dis.* **223**, 1139–1144 (2021).
179. Leber, W. et al. Comparing the diagnostic accuracy of point-of-care lateral flow antigen testing for SARS-CoV-2 with RT-PCR in primary care (REAP-2). *EClinicalMedicine* **38**, 101011 (2021).
180. Kohmer, N. et al. The comparative clinical performance of four SARS-CoV-2 rapid antigen tests and their correlation to infectivity in vitro. *J. Clin. Med.* <https://doi.org/10.3390/jcm10020328> (2021).
181. Wang, W. et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA* **323**, 1843–1844 (2020).
182. Lee, R. A., Herigon, J. C., Benedetti, A., Pollock, N. R. & Denking, C. M. Performance of saliva, oropharyngeal swabs, and nasal swabs for SARS-CoV-2 molecular detection: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* **59**, e02881-20 (2021).
183. Tsang, N. N. Y. et al. Diagnostic performance of different sampling approaches for SARS-CoV-2 RT-PCR testing: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **21**, 1233–1245 (2021).
184. Peto, T. COVID-19: rapid antigen detection for SARS-CoV-2 by lateral flow assay: a national systematic evaluation of sensitivity and specificity for mass-testing. *EClinicalMedicine* **36**, 100924 (2021).
185. Hay, J. A. et al. Estimating epidemiologic dynamics from cross-sectional viral load distributions. *Science* **373**, eabn0635 (2021).

186. Peccia, J. et al. Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1164–1167 (2020).
187. Xin, H. et al. The incubation period distribution of coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **73**, 2344–2352 (2021).
188. Yu, I. T. et al. Evidence of airborne transmission of the severe acute respiratory syndrome virus. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1731–1739 (2004).
189. Cheng, P. K. et al. Viral shedding patterns of coronavirus in patients with probable severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **363**, 1699–1700 (2004).
190. Peiris, J. S. et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* **361**, 1767–1772 (2003).
191. Chan, P. K. S. et al. Laboratory diagnosis of SARS. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 825–831 (2004).
192. Liu, W. et al. Long-term SARS coronavirus excretion from patient cohort, China. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1841–1843 (2004).
193. Xu, D. et al. Persistent shedding of viable SARS-CoV in urine and stool of SARS patients during the convalescent phase. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**, 165–171 (2005).
194. V'kovski, P. et al. Disparate temperature-dependent virus–host dynamics for SARS-CoV-2 and SARS-CoV in the human respiratory epithelium. *PLoS Biol.* **19**, e3001158 (2021).
195. Pitzer, V. E., Leung, G. M. & Lipsitch, M. Estimating variability in the transmission of severe acute respiratory syndrome to household contacts in Hong Kong, China. *Am. J. Epidemiol.* **166**, 355–363 (2007).
196. Riley, S. et al. Transmission dynamics of the etiological agent of SARS in Hong Kong: impact of public health interventions. *Science* **300**, 1961–1966 (2003).
197. Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. & Fouchier, R. A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1814–1820 (2012).
198. Breban, R., Riou, J. & Fontanet, A. Interhuman transmissibility of Middle East respiratory syndrome coronavirus: estimation of pandemic risk. *Lancet* **382**, 694–699 (2013).
199. Oh, M. D. et al. Viral load kinetics of MERS coronavirus infection. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1303–1305 (2016).
200. Corman, V. M. et al. Viral shedding and antibody response in 37 patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 477–483 (2016).
201. Min, C.-K. et al. Comparative and kinetic analysis of viral shedding and immunological responses in MERS patients representing a broad spectrum of disease severity. *Sci. Rep.* **6**, 25359 (2016).
202. Ip, D. K. et al. Viral shedding and transmission potential of asymptomatic and paucisymptomatic influenza virus infections in the community. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 736–742 (2017).
203. Carrat, F. et al. Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies. *Am. J. Epidemiol.* **167**, 775–785 (2008).
204. Pawelek, K. A. et al. Modeling within-host dynamics of influenza virus infection including immune responses. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002588 (2012).
205. Ip, D. K. M. et al. The dynamic relationship between clinical symptomatology and viral shedding in naturally acquired seasonal and pandemic influenza virus infections. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 431–437 (2016).
206. Nair, H. et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **375**, 1545–1555 (2010).
207. Bagga, B. et al. Comparing influenza and RSV viral and disease dynamics in experimentally infected adults predicts clinical effectiveness of RSV antivirals. *Antivir. Ther.* **18**, 785–791 (2013).
208. DeVincenzo, J. P. et al. Viral load drives disease in humans experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 1305–1314 (2010).
209. Kutter, J. S. et al. Small quantities of respiratory syncytial virus RNA only in large droplets around infants hospitalized with acute respiratory infections. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **10**, 100 (2021).

Acknowledgements

The authors thank E. Boehm for help with literature search and proofreading. The work was funded by the COVID-19 National Research Program (grant number 198412) of the Swiss National Science Foundation.

Author contributions

O.P. and I.E. wrote the manuscript. B.M. created the figures. All authors contributed to the discussion of the content, and reviewed and edited the manuscript before submission.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>.

Correspondence should be addressed to Isabella Eckerle.

Peer review information *Nature Reviews Microbiology* thanks Nancy Leung, Quanyi Wang and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

© Springer Nature Limited 2022

LETTERS

Edited by Jennifer Sills

Editorial Expressions of Concern

In 2001, *Science* published the Report “Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation” by E. Stein *et al.* (1). In 2015, the authors made us aware of issues with Western blot images in Figures 1 and 3, which were caused by tiling with overlap of adjacent columns and combining blot images to standardize panel sizes. The authors provided corrected images, but due to an error on our part, *Science* never posted an Erratum. We regret this error and apologize to the scientific community. Both we and the authors are aware that additional concerns have been raised since 2015. We are therefore not proceeding with a correction at this point but are alerting readers to the concerns while the authors and the authors’ institution investigate further.

H. Holden Thorp
Editor-in-Chief

REFERENCES AND NOTES

1. E. Stein, Y. Zou, M.-M. Poo, M. Tessier-Lavigne, *Science* **291**, 1976 (2001).

Published online 15 December 2022
10.1126/science.adg2852

In 2001, *Science* published the Research Article “Hierarchical organization of guidance receptors: Silencing of netrin attraction by Slit through a Robo/DCC receptor complex” by E. Stein and M. Tessier-Lavigne (1). In 2015, the authors made us aware of issues with Western blot images in Figures 4, 5, and 6, which were caused by tiling with overlap of adjacent columns and combining blot images to standardize panel sizes. The authors provided corrected images for those Western blots. In addition, images were duplicated in Figure 2D (micrographs) and in Figure 4B (blank Western blots), and an incorrect blank panel was used in Figure 5E (top right). The original data for these figures could not be accessed, so not all specific conclusions related to these panels are supported by these figures. *Science* agreed to the publication of an Erratum; however, due to an error on our part, it was not posted. We regret this error and apologize to the scientific community. In light of the delay, we are not proceeding with a correction at this point but are

alerting readers to the concerns while the authors and the authors’ institution investigate further.

H. Holden Thorp
Editor-in-Chief

REFERENCES AND NOTES

1. E. Stein, M. Tessier-Lavigne, *Science* **291**, 1928 (2001).

Published online 15 December 2022
10.1126/science.adg2860

Retraction

In the Research Article “Gradual emergence followed by exponential spread of the SARS-CoV-2 Omicron variant in Africa” (1), we reported data from retrospective characterization of viral genomes of putative ancestors of the SARS-CoV-2 Omicron variant from western Africa months before the first detection of Omicron. After several social media posts suggested that these putative early Omicron ancestor sequences may have been **false positives**, we reanalyzed our data and the residual samples. **We found a mixture of different SARS-CoV-2 genomic fragments contaminating some of the samples** and sequence data on which we based our analysis. The residual samples are now exhausted, and the reconstruction of evolutionary intermediates cannot be replicated. Therefore, we are retracting our Research Article. The epidemiological data are not called into question and will be made available.

Carlo Fischer¹, Tongai Gibson Maponga², Anges Yadouleton³, Nuro Abilio⁴, Emmanuel Aboce⁵, Praise Adewumi³, Pedro Afonso⁶, Jewelina Akorli⁷, Soa Fy Andriamandimby⁸, Latifa Anga⁹, Yvonne Ashong⁷, Mohamed Amine Beloufa¹⁰, Aicha Bensalem¹⁰, Richard Birtles^{11,12}, Anicet Luc Magloire Bumba^{13,14}, Freddie Bwanga^{15,16}, Mike Chaponda¹⁶, Paradzai Chibukira¹⁷, R. Matthew Chico¹⁸, Justin Chileshe¹⁶, Gershom Chongwe¹⁶, Assana Cissé¹⁹, Umberto D’Alessandro²⁰, Xavier Nicolas de Lamballerie²¹, Joana F. M. de Morais⁶, Fawzi Derrar¹⁰, Ndongo Dia²², Youssouf Diarra²³, Lassina Doumbia²³, **Christian Drosten^{1,24}**, Philippe Dussart⁸, Richard Echodu¹¹, Yannik Eggers^{25,26}, Abdelmajid Eloualid⁹, Ousmane Faye²², Torsten Feldt^{25,26}, Anna Frühauf⁷, Afiwa Halatoko²⁷, Pauliana Vanessa Ilouga²⁸, Nalia Ismael⁴, Ronan Jambou²⁹, Sheikh Jarju²⁰, Antje Kamprad¹, Ben Katowa^{30,31}, John Kayiwa³², Leonard King’wara³³, Ousmane Koita²³, Vincent Lacoste⁸, Adamou Lagare²⁹, **Olfert Landt³⁴**, Sonia Etenna Lekana-Douki³⁵, Jean-Bernard Lekana-Douki³⁵, Etuhole lipumbu³⁶, Hugues Loemba^{37,14}, Julius Lutwama³², Santou Mamadou²⁹, Issaka Maman²⁷, Brendon Manyisa¹⁷, Pedro A. Martinez⁵, Japhet Matoba^{30,31}, Lusua Mhuulu³⁶, Andres Moreira-Soto¹, Judy Mwangi^{11,12}, Nadine N’dilimabaka³⁵, Charity Angella Nassuna³², Mamadou Ousmane Ndiath²⁰, Emmanuel Nepolo³⁶, Richard Njoum²⁸, Jalal Nouril⁹, Steven Ger

Nyanjom³⁸, Eddy Okoth Odari³⁸, Alfred Okeng⁵, Jean Bienvenue Ouoba¹⁹, Michael Owusu³⁹, Irene Owusu Donkor⁷, Karabo Kristen Phadu², Richard Odame Phillips³⁹, Wolfgang Preiser^{2,40}, Vurayai Ruhanya¹⁷, Fortune Salah²⁷, Sourakatou Salifou⁴¹, Amadou Alpha Sall²², Augustina Angelina Sylverken^{39,42}, Paul Alain Tagnoukam-Ngoupo²⁸, Zekiba Tarnagda¹⁹, Francis Olivier Tchikaya¹⁴, **Tafese Beyene Tufa^{25,26}**, **Jan Felix Drexler^{1,24*}**

¹Charité—Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt Universität zu Berlin, Institute of Virology, Berlin, Germany. ²Division of Medical Virology, Stellenbosch University Faculty of Medicine and Health Sciences, Cape Town, South Africa. ³Laboratoire des fièvres hémorragiques virales de Cotonou, Akpakpa, Benin. ⁴Instituto Nacional de Saúde, Maputo, Mozambique. ⁵MBN Clinical Laboratories, Kampala, Uganda. ⁶Instituto Nacional de Investigação em Saúde (INIS), Luanda, Angola. ⁷Noguchi Memorial Institute for Medical Research, University of Ghana, Legon, Ghana. ⁸Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar. ⁹Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco. ¹⁰Institut Pasteur of Algeria, National Influenza Centre, Sidi-Fredj, Algeria. ¹¹Gulu University Multifunctional Research Laboratories, Gulu, Uganda. ¹²School of Science, Engineering and Environment, University of Salford, Salford, UK. ¹³Faculty of Health Sciences, Marien Ngouabi University, Pointe-Noire, Congo. ¹⁴Molecular Diagnostic Laboratory HDL, Pointe-Noire, Congo. ¹⁵Makerere University College of Health Sciences, Kampala, Uganda. ¹⁶Tropical Diseases Research Centre, Ndola Teaching Hospital, Ndola, Zambia. ¹⁷National Virology Laboratory, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Zimbabwe, Avondale, Zimbabwe. ¹⁸London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. ¹⁹Laboratoire National de Référence-Gripes, Ouagadougou, Burkina Faso. ²⁰Medical Research Council Unit at London School of Hygiene and Tropical Medicine, Banjul, Gambia. ²¹Unité des Virus Émergents, Aix Marseille Université, Marseille, France. ²²Institut Pasteur de Dakar (IPD), Dakar, Senegal. ²³Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), Bamako, Mali. ²⁴German Centre for Infection Research (DZIF), associated Partner Charité—Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ²⁵Hirsch Institute of Tropical Medicine, Asella, Ethiopia. ²⁶Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, University Hospital Düsseldorf, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany. ²⁷Institut National d’Hygiène, Lomé, Togo. ²⁸Centre Pasteur du Cameroun, Yaounde, Cameroon. ²⁹Centre de Recherche Médicale et Sanitaire (CERMES), Niamey, Niger. ³⁰Macha Research Trust, Choma, Zambia. ³¹School of Veterinary Medicine, University of Zambia, Lusaka, Zambia. ³²Uganda Virus Research Institute, Entebbe, Uganda. ³³National Public Health Reference Laboratory, Ministry of Health, Nairobi, Kenya. ³⁴TiB-Molbiol GmbH, Berlin, Germany. ³⁵Centre Interdisciplinaire de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Franceville, Gabon. ³⁶School of Medicine, University of Namibia, Windhoek, Namibia. ³⁷Faculty of Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada. ³⁸School of Biomedical Sciences, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, Nairobi, Kenya. ³⁹Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR), Kwame Nkrumah University of Science and Technology (KNUST), Kumasi, Ghana. ⁴⁰National Health Laboratory Service Tygerberg Business Unit, Cape Town, South Africa. ⁴¹Ministère de la Santé, Akpakpa, Benin. ⁴²Department of Theoretical and Applied Biology, KNUST, Kumasi, Ghana.

*Corresponding author.
Email: felix.drexler@charite.de