

Ευρω-επιτήρηση 2020

[27 Νοεμβρίου 2020](#)

Αυτή η εκτενής έκθεση αξιολόγησης έχει υποβληθεί επίσημα στο συντακτικό συμβούλιο της Eurosurveillance στις 27 Νοεμβρίου 2020 μέσω της πύλης υποβολής τους, που επισυνάπτεται σε αυτήν την έκθεση αξιολόγησης είναι μια [επιστολή αιτήματος ανάκλησης](#), υπογεγραμμένη από όλους τους κύριους & συν-συγγραφείς. Τα πρώτα και τα τελευταία ονόματα είναι ο πρώτος και ο δεύτερος κύριος συγγραφέας. Όλα τα ονόματα στο μεταξύ είναι συν-συγγραφείς.

Η εξωτερική ομότιμη ανασκόπηση της δοκιμής RT-PCR για την ανίχνευση SARS-CoV-2 αποκαλύπτει 10 μεγάλες επιστημονικές ατέλειες σε μοριακό και μεθοδολογικό επίπεδο: συνέπειες για ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

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

AΦΗΡΗΜΕΝΗ

Στη δημοσίευση με τίτλο "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR" (Eurosurveillance 25 (8) 2020) οι συγγραφείς παρουσιάζουν μια διαγνωστική ροή εργασίας και ένα πρωτόκολλο RT-qPCR για την ανίχνευση και τη διάγνωση του 2019-nCoV (τώρα γνωστό ως SARS-CoV-2), το οποίο ισχυρίζονται ότι έχουν επικυρωθεί, καθώς και ως μια ισχυρή διαγνωστική μεθοδολογία για χρήση σε εργαστήρια δημόσιας υγείας.

Υπό το πρίσμα όλων των συνεπειών που προκύπτουν από αυτήν την ίδια δημοσίευση για κοινωνίες σε όλο τον κόσμο, μια ομάδα ανεξάρτητων ερευνητών πραγματοποίησε μια αναλυτική επισκόπηση της προαναφερθείσας δημοσίευσης στην οποία 1) όλα τα στοιχεία του υποβληθέντος σχεδιασμού δοκιμής ελέγχθηκαν σταυρωτά, 2) Το RT-qPCR πρωτόκολλο-συστάσεις αξιολογήθηκε με καλή εργαστηριακή πρακτική και 3) οι παράμετροι εξετάστηκαν σε σχέση με τη σχετική επιστημονική βιβλιογραφία που καλύπτει το πεδίο.

Το δημοσιευμένο πρωτόκολλο RT-qPCR για την ανίχνευση και τη διάγνωση του 2019-nCoV και το χειρόγραφο υποφέρουν από πολλά τεχνικά και επιστημονικά σφάλματα, όπως ανεπαρκές σχεδιασμό εκκινήτη, προβληματικό και ανεπαρκές πρωτόκολλο RT-qPCR και απουσία ακριβούς επικύρωσης δοκιμής.

Ούτε το τεστ που παρουσιάστηκε ούτε το ίδιο το χειρόγραφο πληρούν τις προϋποθέσεις για μια αποδεκτή επιστημονική έκδοση.

Επιπλέον, δεν αναφέρονται σοβαρές συγκρούσεις συμφερόντων των συγγραφέων.

Τέλος, το πολύ σύντομο χρονικό διάστημα μεταξύ της υποβολής και της αποδοχής της δημοσίευσης (24 ώρες) σημαίνει ότι μια συστηματική διαδικασία αξιολόγησης από ομοτίμους είτε δεν πραγματοποιήθηκε εδώ είτε προβληματικής κακής ποιότητας. Παρέχουμε πειστικά αποδεικτικά στοιχεία για αρκετές επιστημονικές ανεπάρκειες, λάθη και ελαττώματα.

Λαμβάνοντας υπόψη τις επιστημονικές και μεθοδολογικές βλάβες που παρουσιάζονται εδώ, είμαστε βέβαιοι ότι το συντακτικό συμβούλιο της Eurosurveillance δεν έχει άλλη επιλογή από το να ανακαλέσει τη δημοσίευση.

ΕΚΘΕΣΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗΣ ΣΥΓΓΕΚΡΙΜΕΝΩΝ

Αυτό το άρθρο θα δείξει πολλά σοβαρά ελαττώματα στο χαρτί Corman-Drosten, η σημασία του οποίου έχει οδηγήσει σε παγκόσμια εσφαλμένη διάγνωση λοιμώξεων που αποδίδονται στο SARS-CoV-2 και σχετίζονται με τη νόσο COVID-19.

Βρισκόμαστε αντιμέτωποι με αυστηρούς αποκλεισμούς που έχουν καταστρέψει τη ζωή και τη ζωή πολλών ανθρώπων, την περιορισμένη πρόσβαση στην εκπαίδευση και αυτοί οι επιβαλλόμενοι περιορισμοί από κυβερνήσεις σε όλο τον κόσμο είναι μια άμεση επίθεση στα βασικά δικαιώματα των ανθρώπων και τις προσωπικές τους ελευθερίες, με αποτέλεσμα την παράπλευρη ζημία για ολόκληρες οικονομίες σε παγκόσμια κλίμακα.

Υπάρχουν δέκα θανατηφόρα προβλήματα με το έγγραφο Corman-Drosten που θα περιγράψουμε και θα εξηγήσουμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια στις ακόλουθες ενότητες.

Το πρώτο και σημαντικό ζήτημα είναι ότι το μυθιστόρημα Coronavirus SARS-CoV-2 (στη δημοσίευση με την ονομασία 2019-nCoV και τον Φεβρουάριο του 2020 με τίτλο SARS-CoV-2 από μια διεθνή κοινοπραξία εμπειρογνομώνων ιών) βασίζεται σε πυριτικές (θεωρητικές) ακολουθίες, που παρέχεται από ένα εργαστήριο στην Κίνα [1], επειδή εκείνη τη στιγμή δεν ήταν διαθέσιμο στους συγγραφείς ούτε υλικό ελέγχου μολυσματικού («ζωντανό») ή αδρανοποιημένου SARS-CoV-2 ούτε απομονωμένο γονιδιωματικό RNA του ιού. Μέχρι σήμερα δεν έχει πραγματοποιηθεί επικύρωση από τον συντάκτη με βάση απομονωμένους ιούς SARS-CoV-2 ή RNA πλήρους μήκους αυτών. Σύμφωνα με τους Corman et al.:

«Στόχος μας ήταν να αναπτύξουμε και να αναπτύξουμε μια ισχυρή διαγνωστική μεθοδολογία για χρήση σε εργαστήρια δημόσιας υγείας χωρίς να διαθέτουμε υλικό ιών». [1]

Η εστίαση εδώ πρέπει να δοθεί στους δύο δηλωμένους στόχους: α) ανάπτυξη και β) ανάπτυξη διαγνωστικού τεστ για χρήση σε εργαστήρια δημόσιας υγείας. Αυτοί οι στόχοι δεν είναι εφικτοί χωρίς να υπάρχει διαθέσιμο πραγματικό υλικό ιού (π.χ. για τον προσδιορισμό του μολυσματικού ιικού φορτίου).

Σε κάθε περίπτωση, μόνο ένα πρωτόκολλο με μέγιστη ακρίβεια μπορεί να είναι ο υποχρεωτικός και πρωταρχικός στόχος σε οποιοδήποτε σενάριο-αποτέλεσμα αυτού του μεγέθους.

Ο κρίσιμος προσδιορισμός του ιικού φορτίου είναι υποχρεωτικές πληροφορίες και είναι ευθύνη της ομάδας του Christian Drosten να πραγματοποιήσει αυτά τα πειράματα και να παράσχει τα κρίσιμα δεδομένα.

Παρ' όλα αυτά, αυτές οι αλληλουχίες πυριτίου χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μεθοδολογίας δοκιμής RT-PCR για τον προσδιορισμό του προαναφερθέντος ιού. Αυτό το μοντέλο βασίστηκε στην υπόθεση ότι ο νέος ιός είναι πολύ παρόμοιος με το SARS-CoV από το 2003 καθώς και οι δύο είναι βήτα-κοροναϊούς.

Η δοκιμή PCR σχεδιάστηκε επομένως χρησιμοποιώντας τη γονιδιωματική αλληλουχία του SARS-CoV ως υλικό ελέγχου για το συστατικό Sarbeco. το γνωρίζουμε αυτό από την προσωπική μας ηλεκτρονική επικοινωνία με [2] έναν από τους συν-συγγραφείς της εφημερίδας Corman-Drosten. Αυτή η μέθοδος για το μοντέλο SARS-CoV-2 περιγράφηκε στο χαρτί Corman-Drosten ως εξής:

« Η καθιέρωση και επικύρωση μιας διαγνωστικής ροής εργασίας για τον έλεγχο 2019-nCoV και συγκεκριμένη επιβεβαίωση, σχεδιασμένη ελλείψει διαθέσιμων απομονωμένων ιών ή πρωτότυπων δειγμάτων ασθενών. Ο σχεδιασμός και η επικύρωση ενεργοποιήθηκαν από τη στενή γενετική σχέση με το SARS-CoV του 2003 και υποβοηθήθηκε από τη χρήση της τεχνολογίας συνθετικών νουκλεϊκών οξέων. »

Το Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) είναι μια σημαντική βιομοριακή τεχνολογία για την ταχεία ανίχνευση σπάνιων RNA θραυσμάτων, τα οποία είναι γνωστά εκ των προτέρων.

Στο πρώτο στάδιο, τα μόρια RNA που υπάρχουν στο δείγμα μεταγράφονται αντίστροφα για απόδοση cDNA. Το cDNA στη συνέχεια ενισχύεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας ένα ειδικό ζεύγος εκκινητών και ένα ένζυμο θερμοσταθερής $\bar{u}$ NA πολυμεράσης.

Η τεχνολογία είναι πολύ ευαίσθητη και το όριο ανίχνευσής της είναι θεωρητικά 1 μόριο cDNA. Η εξειδίκευση του PCR επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από σφάλματα βιομοριακού σχεδιασμού.

Τι είναι σημαντικό κατά το σχεδιασμό ενός τεστ RT-PCR και του ποσοτικού τεστ RT-qPCR που περιγράφεται στη δημοσίευση Corman-Drosten;

1. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές:

α) η συγκέντρωση εκκινητών και ανιχνευτών πρέπει να είναι του βέλτιστου εύρους (100-200 nM)

β) πρέπει να είναι συγκεκριμένη για το γονίδιο-στόχο που θέλετε να ενισχύσετε

γ) πρέπει να έχει το βέλτιστο ποσοστό περιεκτικότητας GC σε σχέση με τις συνολικές αζωτούχες βάσεις (τουλάχιστον 40%, μέγιστο 60%)

δ) για διαγνωστικά ιών, τουλάχιστον 3 ζεύγη εκκινητών πρέπει να ανιχνεύσουν 3 ιικά γονίδια (κατά προτίμηση όσο το δυνατόν πιο μακριά στο ιικό γονιδίωμα)

2. Η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνουν χώρα όλες οι αντιδράσεις:

α) Θερμοκρασία τήξης DNA ($> 92^{\circ}$)

β) Θερμοκρασία ενίσχυσης DNA (ειδική TaqPol)

γ) T_m ; η θερμοκρασία ανόπτησης (η θερμοκρασία στην οποία οι εκκινητές και οι ανιχνευτές φθάνουν στο στόχο σύνδεσης / αποκόλλησης, να μην υπερβαίνει τους 2°C ανά ζεύγος εκκινητών). Το T_m εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το περιεχόμενο GC των εκκινητών

3. Ο αριθμός των κύκλων ενίσχυσης (μικρότερος από 35 · κατά προτίμηση 25-30 κύκλοι).

Σε περίπτωση ανίχνευσης ιών, > 35 κύκλοι ανιχνεύουν μόνο σήματα που δεν συσχετίζονται με μολυσματικό ιό όπως προσδιορίζεται από την απομόνωση στην κυτταρική καλλιέργεια [αναθεωρείται σε 2]. εάν κάποιος έχει δοκιμαστεί από PCR ως θετικό όταν χρησιμοποιείται ένα κατώφλι 35 κύκλων ή υψηλότερο (όπως συμβαίνει στα περισσότερα εργαστήρια στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ), η πιθανότητα ότι το εν λόγω άτομο είναι πραγματικά μολυσμένο είναι μικρότερη από 3%, η πιθανότητα ότι το εν λόγω αποτέλεσμα είναι ψευδώς θετικό είναι 97% [αναθεωρήθηκε σε 3]

4. Μοριακές βιολογικές επικυρώσεις. Τα ενισχυμένα προϊόντα PCR πρέπει να επικυρωθούν είτε με την εκτέλεση των προϊόντων σε γέλη με χάρακα DNA, είτε με άμεση αλληλούχηση DNA

5. Πρέπει να καθοριστούν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για την επιβεβαίωση / αμφισβήτηση συγκεκριμένης ανίχνευσης ιών

6. Πρέπει να υπάρχει διαθέσιμη μια τυπική επιχειρησιακή διαδικασία (SOP)

Το SOP καθορίζει ξεκάθαρα τις παραπάνω παραμέτρους, έτσι ώστε όλα τα εργαστήρια να είναι σε θέση να ρυθμίσουν τις ίδιες ακριβώς συνθήκες δοκιμής. Η ύπαρξη επικυρωμένου καθολικού SOP είναι απαραίτητη, διότι επιτρέπει τη σύγκριση δεδομένων εντός και μεταξύ χωρών.

ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΜΕ ΤΟ ΧΑΡΤΙ CORMAN-DROSTEN

1. Στον Πίνακα 1 του χαρτιού Corman-Drosten, αναφέρονται διαφορετικές συντομογραφίες - καθορίζεται το "nM", το "nm" δεν είναι. Περαιτέρω όσον αφορά τη σωστή ονοματολογία, το nm σημαίνει "νανόμετρο" επομένως το nm πρέπει να διαβάσει nM εδώ.

2. Είναι γενική συναίνεση να γράφεται γενετικές ακολουθίες πάντα προς την κατεύθυνση 5'-3' , συμπεριλαμβανομένων των αντίστροφων εκκινητών. Είναι εξαιρετικά ασυνήθιστο να κάνουμε ευθυγράμμιση με την αντίστροφη συμπληρωματική γραφή της ακολουθίας εκκινητών, όπως έκαναν οι συγγραφείς στο σχήμα 2 του χαρτιού Corman-Drosten. Εδώ, επιπλέον, μια βάση ταλάντευσης επισημαίνεται ως «y» χωρίς περιγραφή των βάσεων που σημαίνει το Y.

3. Δύο παραπλανητικές παγίδες στο χαρτί Corman-Drosten είναι ότι ο Πίνακας 1 δεν περιλαμβάνει τιμές Tm (τιμές θερμοκρασίας ανόπτησης), ούτε δείχνει τιμές GC (αριθμός G και C στις ακολουθίες ως% -value of συνολικές βάσεις).

ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΧΑΡΤΙ CORMAN-DROSTEN

A) ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Οι συγγραφείς εισάγουν το ιστορικό του επιστημονικού τους έργου ως: «Το συνεχιζόμενο ξέσπασμα του πρόσφατα αναδυόμενου μυθιστορήματος κορονοϊού (2019-nCoV) αποτελεί πρόκληση για τα εργαστήρια δημόσιας υγείας καθώς τα προϊόντα απομόνωσης ιών δεν είναι διαθέσιμα ενώ υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η επιδημία είναι πιο διαδεδομένη από αρχικά σκέφτηκε, και η διεθνής εξάπλωση μέσω ταξιδιωτών έχει ήδη συμβεί ».

Σύμφωνα με το BBC News [4] και το Google Statistics [5], υπήρχαν 6 θάνατοι παγκοσμίως στις 21 Ιανουαρίου 2020 - την ημέρα που υποβλήθηκε το χειρόγραφο. Γιατί οι συγγραφείς ανέλαβαν μια πρόκληση για τα εργαστήρια δημόσιας υγείας, ενώ εκείνη την εποχή δεν υπήρχαν ουσιαστικά στοιχεία που να δείχνουν ότι η επιδημία ήταν πιο διαδεδομένη από ό, τι αρχικά πίστευε;

Στόχος, οι συγγραφείς δήλωσαν να αναπτύξουν και να αναπτύξουν ισχυρή διαγνωστική μεθοδολογία για χρήση σε εργαστήρια δημόσιας υγείας χωρίς να διαθέτουν διαθέσιμο υλικό ιών. Επιπλέον, αναγνωρίζουν ότι «Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει την τεράστια ικανότητα ανταπόκρισης που επιτεύχθηκε μέσω του συντονισμού ακαδημαϊκών και δημόσιων εργαστηρίων σε εθνικά και ευρωπαϊκά ερευνητικά δίκτυα».

B) ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Σχεδίαση Primer & Probe

1α) Εσφαλμένες συγκεντρώσεις εκκινητών

Τα αξιόπιστα και ακριβή πρωτόκολλα δοκιμής PCR συνήθως σχεδιάζονται χρησιμοποιώντας μεταξύ 100 nM και 200 nM ανά αστάρι [7]. Στο χαρτί Corman-Drosten, παρατηρούμε ασυνήθιστα υψηλές και ποικίλες συγκεντρώσεις ασταριού για πολλά αστάρια (πίνακας 1). Για τα ζεύγη εκκινητών RdRp_SARSr-F και RdRp_SARSr-R, περιγράφονται 600 nM και 800 nM, αντίστοιχα. Ομοίως, για το σετ εκκινητών N_Sarbeco_F και N_Sarbeco_R, συμβουλεύουν 600 nM και 800 nM, αντίστοιχα [1].

Θα πρέπει να είναι σαφές ότι αυτές οι συγκεντρώσεις είναι πολύ υψηλές για να είναι βέλτιστες για συγκεκριμένες ενισχύσεις των γονιδίων στόχων. Δεν υπάρχει συγκεκριμένος λόγος για τη χρήση αυτών των εξαιρετικά υψηλών συγκεντρώσεων εκκινητών σε αυτό το πρωτόκολλο. Αντίθετα, αυτές οι συγκεντρώσεις οδηγούν σε αυξημένη μη ειδική σύνδεση και ενίσχυση προϊόντος PCR.

Πίνακας 1: Εκκινητές και ανιχνευτές (προσαρμοσμένοι από χαρτί Corman-Drosten. Επισημαίνονται εσφαλμένες συγκεντρώσεις εκκινητών)

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

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

^b Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µL of a 10 µM primer stock solution per 25 µL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

1β) Απροσδιόριστες ("Wobbly") αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτών

Για να αποκτήσετε αναπαραγώγιμα και συγκρίσιμα αποτελέσματα, είναι απαραίτητο να ορίσετε ξεχωριστά τα ζεύγη εκκινητών. Στο έγγραφο Corman-Drosten παρατηρήσαμε έξι μη καθορισμένες θέσεις, που υποδεικνύονται με τα γράμματα R, W, M και S (Πίνακας 2). Το γράμμα W σημαίνει ότι σε αυτήν τη θέση μπορεί να υπάρχει είτε A ή T · Το R σημαίνει ότι μπορεί να υπάρχει είτε G είτε A. Το M υποδηλώνει ότι η θέση μπορεί να είναι A ή Γ. το γράμμα S δείχνει ότι μπορεί να υπάρχει είτε G είτε C σε αυτήν τη θέση.

Αυτός ο μεγάλος αριθμός παραλλαγών όχι μόνο είναι ασυνήθιστος, αλλά είναι επίσης πολύ συγκεχυμένος για τα εργαστήρια. Αυτές οι έξι απροσδιόριστες θέσεις θα μπορούσαν εύκολα να οδηγήσουν στο σχεδιασμό πολλών διαφορετικών εναλλακτικών αλληλουχιών εκκινητών που δεν σχετίζονται με SARS-CoV-2 (2 διακριτές εκκινητές RdRp_SARsR_F + 8 διακριτές ανιχνευτές RdRp_SARsR_P1 + 4 διακριτές RdRp_SARsR_R). Οι παραλλαγές του σχεδιασμού θα οδηγήσουν αναπόφευκτα σε αποτελέσματα που δεν σχετίζονται ακόμη και με το SARS CoV-2. Επομένως, η συγκεχυμένη μη ειδική περιγραφή στο χαρτί Corman-Drosten δεν είναι κατάλληλη ως τυπικό επιχειρησιακό πρωτόκολλο. Αυτές οι απροσδιόριστες θέσεις θα έπρεπε να είχαν σχεδιαστεί κατηγορηματικά.

Αυτές οι ταλαντευόμενες ακολουθίες έχουν ήδη δημιουργήσει μια πηγή ανησυχίας στον τομέα και οδήγησαν σε μια επιστολή προς τον συντάκτη που συνέταξε ο Pillonel et al. [8] σχετικά με τα κατάφωρα σφάλματα στις περιγραφόμενες ακολουθίες. Αυτά τα σφάλματα είναι αυτονόητα στους Corman et al. συμπλήρωμα επίσης.

Πίνακας 2: Εκκινητές και ανιχνευτές (προσαρμοσμένοι από χαρτί Corman-Drosten · επισημαίνονται μη καθορισμένα ("Wobbly") νουκλεοτίδια στους εκκινητές)

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

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

^b Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µL of a 10 µM primer stock solution per 25 µL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

Το πρωτόκολλο WHO (Σχήμα 1), το οποίο προέρχεται άμεσα από το χαρτί Corman-Drosten, καταλήγει στο συμπέρασμα ότι για να επιβεβαιωθεί η παρουσία του SARS-CoV-2, πρέπει να προσδιοριστούν δύο γονίδια ελέγχου (τα γονίδια E-και RdRp) στην ανάλυση. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι το RdRp-γονίδιο έχει μία αβέβαιη θέση («ταλάντευση») στον εμπρόσθιο εκκινητή ($R = G / A$), δύο αβέβαιες θέσεις στον αντίστροφο εκκινητή ($R = G / A$, $S = G / C$) και έχει τρεις αβέβαιες θέσεις στον RdRp-probe ($W = A / T$, $R = G / A$, $M = A / C$). Έτσι, δύο διαφορετικοί εμπρόσθιοι εκκινητές, τέσσερις διαφορετικοί αντίστροφοι εκκινητές και οκτώ διαφορετικοί ανιχνευτές μπορούν να συντεθούν για το RdRp-γονίδιο. Μαζί, υπάρχουν 64 πιθανοί συνδυασμοί εκκινητών και ανιχνευτών!

Το έγγραφο Corman-Drosten προσδιορίζει περαιτέρω ένα τρίτο γονίδιο το οποίο, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ΠΟΥ, δεν επικυρώθηκε περαιτέρω και θεωρήθηκε περιττό:

"Σημειωτέον, ο προσδιορισμός γονιδίου N είχε επίσης καλή απόδοση, αλλά δεν υποβλήθηκε σε εντατική περαιτέρω επικύρωση επειδή ήταν ελαφρώς λιγότερο ευαίσθητος."

Αυτή ήταν μια ατυχής παράλειψη, καθώς θα ήταν καλύτερο να χρησιμοποιηθούν και οι τρεις PCR γονιδίου ως επιβεβαιωτικοί προσδιορισμοί, και αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα ένα σχεδόν επαρκές πρωτόκολλο διαγνωστικού εργαλείου ανίχνευσης RNA ιού. Τρία επιβεβαιωτικά βήματα ανάλυσης θα ελαχιστοποιούσαν τουλάχιστον τα σφάλματα και τις αβεβαιότητες σε κάθε φάση αναδίπλωσης όσον αφορά τα σημεία «Wobbly». (Παρ' όλα αυτά, το πρωτόκολλο θα εξακολουθούσε να στερείται οποιασδήποτε «καλής εργαστηριακής πρακτικής», όταν συνυπολογίζει όλα τα άλλα λάθη σχεδιασμού)

Ως έχει, ο προσδιορισμός γονιδίου N δεν προτείνεται δυστυχώς ούτε στη σύσταση του ΠΟΥ (Σχήμα 1) ως υποχρεωτικό και κρίσιμο τρίτο επιβεβαιωτικό βήμα, ούτε τονίζεται στο έγγραφο Corman-Drosten ως σημαντική προαιρετική διαβεβαίωση «για μια ροή εργασιών ρουτίνας» (Πίνακας 2).

Κατά συνέπεια, σε όλες σχεδόν τις διαδικασίες δοκιμών σε όλο τον κόσμο, χρησιμοποιήθηκαν μόνο 2 αγώνες εκκινητών αντί για τους τρεις. Αυτή η επίβλεψη καθιστά ολόκληρο το πρωτόκολλο δοκιμών άχρηστο όσον αφορά την παροχή ακριβών αποτελεσμάτων δοκιμών πραγματικής σημασίας σε μια συνεχιζόμενη πανδημία.

Σχήμα 1: Η επιβεβαιωτική δοκιμασία N-Gene δεν τονίζεται ως απαραίτητο τρίτο βήμα στην επίσημη σύσταση του πρωτοκόλλου WHO Drosten-Corman παρακάτω [8] ούτε απαιτείται ως κρίσιμο βήμα για υψηλότερη ακρίβεια δοκιμών στη δημοσίευση Eurosurveillance.

Background

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

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

First line screening assay: E gene assay

Confirmatory assay: RdRp gene assay

1c) Λάθος περιεχόμενο GC (συζητείται στο 2c, μαζί με θερμοκρασία ανόπτησης (T_m))

1δ) Ανίχνευση ιικών γονιδίων

Το RT-PCR δεν συνιστάται για πρωτογενή διάγνωση λοίμωξης. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο το τεστ RT-PCR που χρησιμοποιείται στην κλινική ρουτίνα για την ανίχνευση του COVID-19 δεν ενδείκνυται για διάγνωση COVID-19 σε κανονιστική βάση.

«Οι γιατροί πρέπει να αναγνωρίσουν την βελτιωμένη ακρίβεια και ταχύτητα των μοριακών διαγνωστικών τεχνικών για τη διάγνωση λοιμώξεων, αλλά και να κατανοήσουν τους περιορισμούς τους. Τα εργαστηριακά αποτελέσματα πρέπει πάντα να ερμηνεύονται στο πλαίσιο της κλινικής παρουσίασης του ασθενούς και απαιτείται κατάλληλη τοποθεσία, ποιότητα και χρόνος συλλογής δειγμάτων για αξιόπιστα αποτελέσματα των δοκιμών». [9]

Ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να βοηθήσει τη διαφορική διάγνωση του ιατρού όταν πρέπει να κάνει διάκριση μεταξύ διαφορετικών λοιμώξεων του πνεύμονα (η γρίπη, το Covid-19 και το SARS έχουν πολύ παρόμοια συμπτώματα). Για επιβεβαιωτική διάγνωση ενός συγκεκριμένου ιού, πρέπει να εφαρμόζονται τουλάχιστον 3 συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών για την ανίχνευση 3 ειδικών για τον ιό γονιδίων. Κατά προτίμηση, αυτά τα γονίδια-στόχοι πρέπει να εντοπίζονται με τη μεγαλύτερη δυνατή απόσταση στο ιικό γονιδίωμα (περιλαμβάνονται τα αντίθετα άκρα).

Αν και το έγγραφο Corman-Drosten περιγράφει 3 εκκινητές, αυτοί οι εκκινητές καλύπτουν μόνο το ήμισυ περίπου του γονιδιώματος του ιού. Αυτός είναι ένας άλλος παράγοντας που μειώνει την ειδικότητα για την ανίχνευση ανέπαφου RNA ιού COVID-19 και αυξάνει την αναφορά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων δοκιμών.

Επομένως, ακόμη και αν λάβουμε τρία θετικά σήματα (δηλαδή τα τρία ζεύγη εκκινητών δίνουν 3 διαφορετικά προϊόντα ενίσχυσης) σε ένα δείγμα, αυτό δεν αποδεικνύει την παρουσία ενός ιού. Ένας καλύτερος σχεδιασμός εκκινητή θα είχε τερματικούς εκκινητές και στα δύο άκρα του ιικού γονιδιώματος.

Αυτό συμβαίνει επειδή ολόκληρο το ιικό γονιδίωμα θα καλυφθεί και τρία θετικά σήματα μπορούν καλύτερα να κάνουν διάκριση μεταξύ ενός πλήρους (και επομένως δυνητικά μολυσματικού) ιού και κατακερματισμένων ιογενών γονιδιωμάτων (χωρίς μολυσματική ισχύ).

Προκειμένου να συναχθεί κάτι σημαντικό για τη μολυσματικότητα του ιού, το γονίδιο Orf1, το οποίο κωδικοποιεί το βασικό ένζυμο ρεπλικάσης των ιών SARS-CoV, θα έπρεπε να είχε συμπεριληφθεί ως στόχος (Σχήμα 2). Η τοποθέτηση των στόχων στην περιοχή του ιικού γονιδιώματος που μεταγράφεται περισσότερο και μεταβλητά είναι μια άλλη αδυναμία του πρωτοκόλλου.

Kim et al. επιδεικνύουν μια πολύ μεταβλητή έκφραση 3 'υπογονιδιωματικού RNA στο Sars-CoV-2 [23]. Αυτά τα RNA παρακολουθούνται ενεργά ως υπογραφές για ασυμπτωματικούς και μη μολυσματικούς ασθενείς [10].

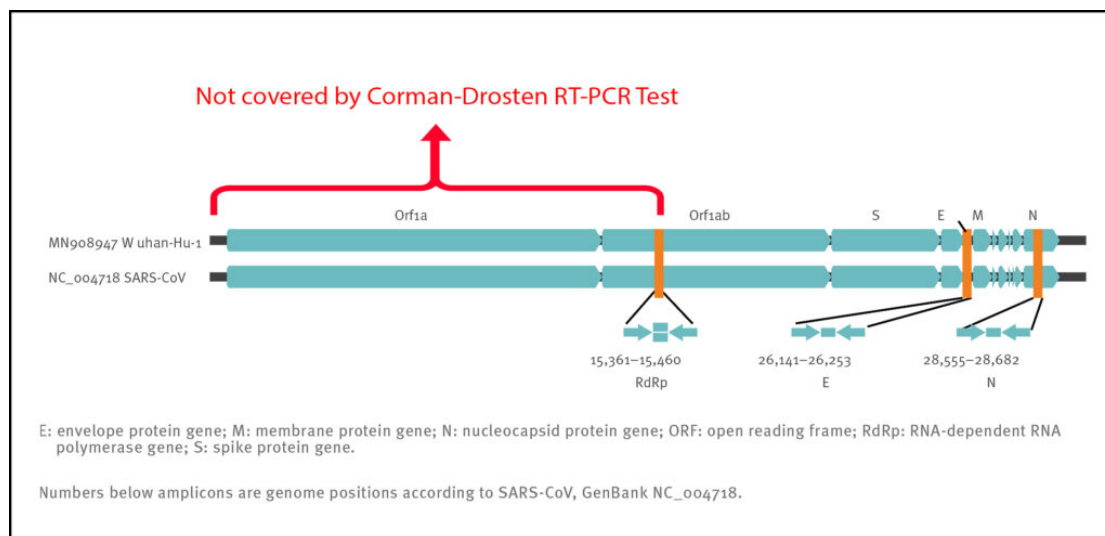
Είναι πολύ αμφισβητήσιμο να ελέγχεται ένας πληθυσμός ασυμπτωματικών ατόμων με εναρκτήρες qPCR που έχουν 6 ζεύγη βάσεων εναρκτήρα-διμερές στο 3 πρωταρχικό άκρο ενός εκκινητή (Σχήμα 3).

Προφανώς ο ΠΟΥ συνιστά αυτά τα αστάρια. Δοκιμάσαμε όλα τα παράγωγα ταλάντευσης από το χαρτί Corman-Drosten με το εργαλείο web dimer της Thermofisher dimer [11]. Το RdRp forward primer έχει 6bp 3prime ομολογία με τον Sarbeco E Reverse. Σε υψηλές συγκεντρώσεις εκκινητών, αυτό αρκεί για να δημιουργήσει ανακρίβειες.

Σημείωση: Υπάρχει ένας τέλειος συνδυασμός ενός από τους N εναρκτήρες με ένα κλινικό παθογόνο (Pantoea), που βρίσκεται σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Το αντίστροφο αστάρι χτυπά επίσης την Pantoea αλλά όχι στην ίδια περιοχή (Σχήμα 3).

Αυτά είναι σοβαρά σφάλματα σχεδιασμού, καθώς η δοκιμή δεν μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ ολόκληρου του ιού και των ιογενών θραυσμάτων. Το τεστ δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό για ιούς SARS.

Σχήμα 2: Σχετικές θέσεις στόχων αμπλικονίου στον SARS coronavirus και το νέο γονιδίωμα coronavirus του 2019. ORF: ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. RdRp: RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Οι αριθμοί κάτω από το αμπλικόνιο είναι θέσεις γονιδιώματος σύμφωνα με το SARS-CoV, NC_004718 [1].



Σχήμα 3: Μια δοκιμή με το εργαλείο διμερούς εναρκτήρα Thermofischer αποκαλύπτει ότι το μπροστινό αστάρι RdRp έχει ομολογία 6bp 3' με το Sarbeco E Reverse (αριστερό πλαίσιο). Μια άλλη δοκιμή αποκαλύπτει ότι υπάρχει ένας τέλειος συνδυασμός για έναν από τους N-εκκινήτες με ένα κλινικό παθογόνο (Pantoea) που βρίσκεται σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (δεξί κουτί).

Cross Primer Dimers:

Corman_RdRp_SARs_F1 with Corman_E_Sarbeco_R

Corman_RdRp_SARs_F1

5-gtgaatggtcatgtgtggcgg->

|||||

<-acacacgcacgacgacgttata-5

Corman_RdRp_SARs_F2 with Corman_E_Sarbeco_R

Corman_RdRp_SARs_F2

5-gtgagatggtcatgtgtggcgg->

|||||

<-acacacgcacgacgacgttata-5

> Corman_N_Sarbeco_F

CACATTGGCACCCGCAATC

Pantoea agglomerans strain ASB05 chromosome, complete genome

Sequence ID: [CP046722.1](#) Length: 4022781 Number of Matches: 2

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

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

Query 1 CACATTGGCACCCGCAATC 19

Sbjct 2326019 CACATTGGCACCCGCAATC 2326037

2. Θερμοκρασίες αντίδρασης
2α) Θερμοκρασία τήξης DNA (> 92 °).

Αντιμετωπίζεται κατάλληλα στο έγγραφο Corman-Drosten.
2β) Θερμοκρασία ενίσχυσης DNA.

Αντιμετωπίζεται κατάλληλα στο έγγραφο Corman-Drosten.
2c) Λάθος περιεχόμενα GC και Tm

Η θερμοκρασία ανόπτησης καθορίζει σε ποια θερμοκρασία προσκολλάται / αποσπάται το αστάρι από την αλληλουχία στόχο. Για αποτελεσματική και ειδική ενίσχυση, το περιεχόμενο GC των εκκινητών πρέπει να πληροί τουλάχιστον 40% και μέγιστο 60% ενίσχυση.

Όπως αναφέρεται στον πίνακα 3, τρία από τα αστάρια που περιγράφονται στο χαρτί Corman-Drostén δεν βρίσκονται εντός του φυσιολογικού εύρους για περιεχόμενο GC.

Δύο εκκινητές (RdRp_SARSr_F και RdRp_SARSr_R) έχουν ασυνήθιστες και πολύ χαμηλές τιμές GC 28%-31% για όλες τις πιθανές παραλλαγές βάσεων ταλάντευσης, ενώ ο εκκινητής E_Sarbeco_F έχει τιμή GC 34,6% (Πίνακας 3 και δεύτερο πίνακα του Πίνακα 3).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το περιεχόμενο GC καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη δέσμευση στον συγκεκριμένο στόχο λόγω των τριών δεσμών υδρογόνου του στο ζεύγος βάσεων. Έτσι, όσο χαμηλότερη είναι η περιεκτικότητα GC του εκκινητή, τόσο χαμηλότερη είναι η ικανότητα δέσμευσής του με την συγκεκριμένη αλληλουχία γονιδίου στόχου (δηλαδή το γονίδιο που θα ανιχνευθεί)

Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να αναγνωριστεί μια αλληλουχία στόχος, πρέπει να επιλέξουμε μια θερμοκρασία που είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά στην πραγματική θερμοκρασία ανόπτησης (βέλτιστη πρακτική-τιμή) για να μην αποσπαστεί ξανά το αστάρι, ενώ ταυτόχρονα επιλέγεται συγκεκριμένα το ακολουθία στόχου.

Εάν η τιμή T_m είναι πολύ χαμηλή, όπως παρατηρήθηκε για όλες τις παραλλαγές ταλαντώσεων των αντίστροφων εκκινητών RdRp, οι εκκινητές μπορούν να δεσμεύονται μη ειδικά σε διάφορους στόχους, μειώνοντας την ειδικότητα και αυξάνοντας πιθανά ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Η θερμοκρασία ανόπτησης (T_m) είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για τον προσδιορισμό της ειδικότητας / ακρίβειας της διαδικασίας qPCR και απαραίτητη για την αξιολόγηση της ακρίβειας των πρωτοκόλλων qPCR. Σύσταση βέλτιστης πρακτικής: Και οι δύο εκκινητές (εμπρός και πίσω) πρέπει να έχουν σχεδόν παρόμοια τιμή, κατά προτίμηση την ίδια τιμή.

Χρησιμοποιήσαμε το ελεύθερα διαθέσιμο λογισμικό σχεδιασμού εκκινητών Primer-BLAST [12, 25] για να αξιολογήσουμε τις τιμές βέλτιστης πρακτικής για όλα τα αστάρια που χρησιμοποιούνται στο χαρτί Corman-Drostén (Πίνακας 3).

Προσπαθήσαμε να βρούμε μια τιμή T_m 60 ° C, ενώ ταυτόχρονα αναζητούσαμε την υψηλότερη δυνατή τιμή GC% για όλους τους εκκινητές. Μια μέγιστη διαφορά T_m 2 ° C εντός ζευγών εκκινητών θεωρήθηκε αποδεκτή.

Δοκιμάζοντας τα ζεύγη εκκινητών που καθορίζονται στο χαρτί Corman-Drostén, παρατηρήσαμε μια διαφορά 10 ° C σε σχέση με τη θερμοκρασία ανόπτησης T_m για το ζεύγος εκκινητών 1 (RdRp_SARSr_F και RdRp_SARSr_R). Αυτό είναι ένα πολύ σοβαρό σφάλμα και καθιστά το πρωτόκολλο άχρηστο ως ειδικό διαγνωστικό εργαλείο.

Πρόσθετες δοκιμές έδειξαν ότι μόνο το ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκε για να ενισχύσει το γονίδιο N (N_Sarbeco_F και N_Sarbeco_R) έφτασε στο κατάλληλο πρότυπο για να λειτουργήσει σε διαγνωστικό τεστ, καθώς έχει επαρκές περιεχόμενο GC και τη διαφορά T_m μεταξύ των εκκινητών (N_Sarbeco_F και N_Sarbeco_R) είναι 1,85 ° C (κάτω από το κρίσιμο μέγιστο της διαφοράς 2 ° C).

Είναι σημαντικό ότι αυτό είναι το γονίδιο που δεν δοκιμάστηκε στα δείγματα ιών (Πίνακας 2) ούτε τονίστηκε ως επιβεβαιωτικό τεστ. Εκτός από τις εξαιρετικά μεταβλητές θερμοκρασίες τήξης και τις εκφυλισμένες αλληλουχίες σε αυτούς τους εκκινητές, υπάρχει ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την ειδικότητα της διαδικασίας: οι dNTPs (0,4uM) είναι 2x υψηλότερες από τις συνιστώμενες για μια ιδιαίτερα ειδική ενίσχυση.

Στην αντίδραση προστίθεται επιπλέον θειικό μαγνήσιο. Αυτή η διαδικασία σε συνδυασμό με χαμηλή θερμοκρασία ανόπτησης μπορεί να δημιουργήσει μη ειδικές ενισχύσεις. Όταν απαιτείται επιπλέον μαγνήσιο για το qPCR, η ειδικότητα της ανάλυσης θα πρέπει να εξεταστεί περαιτέρω.

Τα σφάλματα σχεδιασμού που περιγράφονται εδώ είναι τόσο σοβαρά που είναι πολύ απίθανο να πραγματοποιηθεί συγκεκριμένη ενίσχυση του γενετικού υλικού SARS-CoV-2 χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο του χαρτιού Corman-Drosten.

Πίνακας 3: Περιεχόμενο GC των εκκινήτων και ανιχνευτών (προσαρμοσμένο από χαρτί Corman-Drosten. Επισημαίνονται οι παρεκκλίσεις από βελτιστοποιημένα περιεχόμενα GC. Το δεύτερο πλαίσιο δείχνει μια λίστα με όλες τις τιμές βέλτιστων πρακτικών Primer-BLAST για όλους τους εκκινήτες και ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται σε το έγγραφο Corman-Drosten του καθηγητή Dr. Ulrike Kämmerer και της ομάδας της

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

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence*	Concentration*
RdRp gene	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV.
	RdRp_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Use 100 nM per reaction and mix with P1
			Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs.
E gene	RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	Use 100 nM per reaction and mix with P2
	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 800 nM per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCATCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 400 nm per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGACAGTACGACACACA	Use 200 nm per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATGGCACCCGCAATC	Use 400 nm per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACCTCTCTCAAGGAACACATTGCCA-BBQ	Use 600 nm per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 200 nm per reaction
			Use 800 nm per reaction

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

Primer pairs	Sequence (5'-3')	GC	TM	Search in MN908947 (first full genome from Wuhan, 12.01.2020)						Product length (bp)
				Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	
E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Plus	26	26269	26294	58.29	34.62	8.00	8.00	113
E_Sarbeco_R	ATATTGACAGCAGTACGACACA	Minus	22	26381	26360	60.93	45.45	7.00	1.00	
N-Sarbeco_F	CACATGGCACCCGCAATC	Plus	19	28706	28724	60.15	57.89	4.00	0.00	128
N-Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Minus	20	28833	28814	58.00	55.00	3.00	1.00	
RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGCGG		22			63.74	59.09	4.00	to be added in next version	
RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA		25			53.56	28.00	7.00		
If R= G and S= G	GTGARATGGTCATGTGTGCGG		22			63.74	59.09	4.00	1.00	not found in the Sequence
	CAGATGTTAAAGACACTATTAGCATA		26			55.22	30.77	7.00	5.00	
If R= G and S= C	GTGARATGGTCATGTGTGCGG		22			63.74	59.09	4.00	1.00	
	CAGATGTTAAACACACTATTAGCATA		26			55.68	30.77	7.00	2.00	
If R= A and S= G	GTGAAATGGTCATGTGTGCGG		22			62.58	54.55	4.00	1.00	
	CAATGTTAAAGACACTATTAGCATA		26			54.23	26.92	7.00	5.00	
If R= A and S= C	GTGAAATGGTCATGTGTGCGG		22			62.58	54.55	4.00	1.00	
	CAATGTTAAACACACTATTAGCATA		26			54.69	26.92	7.00	2.00	
Probes:										
RdRp-SARSr-P2	CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC		25			64.89	56.00	6.00	5.00	
RdRp-SARSr-P1	CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC									
E-Sarbeco-P1	ACACTAGCCATCTTACTGCGCTTCG		26			66.78	53.85	4.00	2.00	
N-Sarbeco-P	ACTTCCTCAAGGAACACATTGCCA		25			63.15	44.00	8.00	3.00	

3. Ο αριθμός των κύκλων ενίσχυσης

Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει καμία αναφορά στο χαρτί Corman-Drosten ότι μια δοκιμή είναι θετική ή αρνητική, ή πράγματι αυτό που ορίζει ένα θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα. Αυτοί οι τύποι ιολογικών διαγνωστικών εξετάσεων πρέπει να βασίζονται σε SOP, συμπεριλαμβανομένου ενός επικυρωμένου και σταθερού αριθμού κύκλων PCR (τιμή Ct) μετά τους οποίους ένα δείγμα θεωρείται θετικό ή αρνητικό. Η μέγιστη λογικά αξιόπιστη τιμή Ct είναι 30 κύκλοι. Πάνω από ένα Ct των 35 κύκλων, πρέπει να αναμένεται ταχέως αυξανόμενος αριθμός ψευδών θετικών.

Τα δεδομένα PCR που αξιολογούνται ως θετικά μετά από τιμή Ct 35 κύκλων είναι εντελώς αναξιόπιστα.

Παραθέτοντας τους Jaafar et al. 2020 [3]: "Στο Ct = 35, η τιμή που χρησιμοποιήσαμε για να αναφέρουμε ένα θετικό αποτέλεσμα για PCR, <3% των καλλιέργειών είναι θετικές." Με άλλα λόγια, δεν υπήρξε επιτυχής απομόνωση του ιού του SARS-CoV-2 σε αυτές τις υψηλές τιμές Ct.

Περαιτέρω, επιστημονικές μελέτες δείχνουν ότι μόνο μη μολυσματικοί (νεκροί) ιοί ανιχνεύονται με τιμές Ct 35 [22].

Μεταξύ 30 και 35 υπάρχει μια γκριζα περιοχή, όπου ένα θετικό τεστ δεν μπορεί να αποδειχθεί με βεβαιότητα. Αυτή η περιοχή πρέπει να αποκλειστεί. Φυσικά, μπορεί κανείς να εκτελέσει 45 κύκλους PCR, όπως συνιστάται στο πρωτόκολλο Corman-Drosten WHO (Εικόνα 4), αλλά τότε πρέπει επίσης να ορίσετε μια λογική τιμή Ct (η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 30).

Όμως, ένα αναλυτικό αποτέλεσμα με τιμή Ct 45 είναι επιστημονικά και διαγνωστικά απολύτως χωρίς νόημα (μια λογική τιμή Ct δεν πρέπει να υπερβαίνει το 30).

Όλα αυτά πρέπει να κοινοποιούνται πολύ καθαρά. Είναι σημαντικό λάθος το ότι το χαρτί Corman-Drosten δεν αναφέρει τη μέγιστη τιμή Ct στην οποία ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αναμφίβολα ως θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμής. Αυτό το σημαντικό όριο κύκλου κατωφλίου δεν καθορίζεται επίσης σε καμία υποβολή παρακολούθησης μέχρι σήμερα.

Σχήμα 4: Σύσταση κιτ RT-PCR στο επίσημο πρωτόκολλο Corman-Drosten WHO [8]. Μόνο μια τιμή "Cycler" (κύκλοι) πρέπει να βρεθεί χωρίς αντίστοιχη και επιστημονικά λογική Ct (Cutoff-value). Αυτή ή οποιαδήποτε άλλη τιμή κύκλου δεν υπάρχει πουθενά στο πραγματικό χαρτί Corman-Drosten.

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

4. Βιομοριακές επικυρώσεις

Για να προσδιοριστεί εάν τα ενισχυμένα προϊόντα είναι πράγματι γονίδια SARS-CoV-2, είναι απαραίτητη η βιομοριακή επικύρωση των ενισχυμένων προϊόντων PCR. Για ένα διαγνωστικό τεστ, αυτή η επικύρωση είναι απόλυτη ανάγκη.

Η επικύρωση των προϊόντων PCR πρέπει να εκτελείται είτε με την εκτέλεση του προϊόντος PCR σε 1% γέλη αгарόζης-EtBr μαζί με ένδειξη μεγέθους (χάρακας DNA ή σκάλα DNA) έτσι ώστε να μπορεί να εκτιμηθεί το μέγεθος του προϊόντος. Το μέγεθος πρέπει να αντιστοιχεί στο υπολογισμένο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης.

Αλλά είναι ακόμα καλύτερο να ακολουθήσετε το προϊόν ενίσχυσης. Το τελευταίο θα δώσει 100% βεβαιότητα σχετικά με την ταυτότητα του προϊόντος ενίσχυσης. Χωρίς μοριακή επικύρωση δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για την ταυτότητα των ενισχυμένων προϊόντων PCR. Λαμβάνοντας υπόψη τα σοβαρά σφάλματα σχεδιασμού που περιγράφηκαν νωρίτερα, τα ενισχυμένα προϊόντα PCR μπορεί να είναι οτιδήποτε.

Επίσης δεν αναφέρεται στο χαρτί Corman-Drosten είναι η περίπτωση μικρών θραυσμάτων qPCR (περίπου 100bp): Θα μπορούσε να είναι είτε 1,5% γέλη αγαρόζης είτε ακόμη και γέλη ακρυλαμιδίου.

Το γεγονός ότι αυτά τα προϊόντα PCR δεν έχουν επικυρωθεί σε μοριακό επίπεδο είναι ένα άλλο εντυπωσιακό σφάλμα του πρωτοκόλλου, καθιστώντας κάθε δοκιμή που βασίζεται σε αυτό άχρηστο ως ειδικό διαγνωστικό εργαλείο για τον εντοπισμό του ιού SARS-CoV-2.

5. Θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι για επιβεβαίωση / αμφισβήτηση συγκεκριμένης ανίχνευσης ιών.

Η ανεπιβεβαίωτη υπόθεση που περιγράφεται στο έγγραφο Corman-Drosten είναι ότι ο SARS-CoV-2 είναι ο μόνος ιός από την ομάδα β-κοροναϊού που μοιάζει με SARS και προκαλεί λοιμώξεις σε ανθρώπους.

Οι αλληλουχίες στις οποίες βασίζεται η μέθοδος PCR είναι σε αλληλουχίες πυριτίου, που παρέχονται από εργαστήριο στην Κίνα [23], επειδή κατά τη στιγμή της ανάπτυξης της δοκιμής PCR δεν υπήρχε υλικό ελέγχου μολυσματικού («ζωντανού») ή αδρανοποιημένου SARS-CoV- To 2 ήταν διαθέσιμο στους συγγραφείς.

Η δοκιμή PCR λοιπόν σχεδιάστηκε χρησιμοποιώντας την ακολουθία του γνωστού SARS-CoV ως υλικού ελέγχου για το συστατικό Sarbeco (Dr. Meijer, συν-συγγραφέας Corman-Drosten σε ανταλλαγή email με τον Δρ. Peter Borger) [2].

Όλα τα άτομα που εξετάζουν θετικά με τη δοκιμή RT-PCR, όπως περιγράφεται στο χαρτί Corman-Drosten, θεωρούνται θετικά για μολύνσεις SARS-CoV-2. Υπάρχουν τρία σοβαρά ελαττώματα στην υπόθεσή τους.

Πρώτον, μια θετική δοκιμασία για τα μόρια RNA που περιγράφονται στο χαρτί Corman-Drosten δεν μπορεί να εξομοιωθεί με «μόλυνση από ιό». Ένα θετικό τεστ RT-PCR δείχνει απλώς την παρουσία μορίων RNA ιού.

Όπως αποδεικνύεται στο σημείο 1δ (παραπάνω), η δοκιμή Corman-Drosten δεν σχεδιάστηκε για την ανίχνευση του ιού πλήρους μήκους, αλλά μόνο ένα τμήμα του ιού. Καταλήξαμε ήδη στο συμπέρασμα ότι αυτό κατατάσσει το τεστ ως ακατάλληλο ως διαγνωστικό τεστ για μολύνσεις από ιού SARS.

Δεύτερον και έχει μεγάλη σημασία, η λειτουργικότητα του δημοσιευμένου τεστ RT-PCR δεν αποδείχθηκε με τη χρήση ενός θετικού μάρτυρα (απομονωμένο SARS-CoV-2 RNA), το οποίο είναι ένα βασικό επιστημονικό πρότυπο χρυσού.

Τρίτον, το έγγραφο Corman-Drosten αναφέρει:

«Για να δείξουμε ότι οι προσδιορισμοί μπορούν να ανιχνεύσουν άλλους ιούς που σχετίζονται με το SARS που σχετίζονται με το ρόπαλο, χρησιμοποιήσαμε τον προσδιορισμό γονιδίου E για να δοκιμάσουμε έξι δείγματα κοπράνων που προέρχονται από ρόπαλα που διατίθενται από τους Drexler et al. [...] Und Muth et al. [...].

Αυτά τα θετικά στον ιό δείγματα προέρχονταν από ευρωπαϊκά ρινολοφιδικά νυχτερίδες. Η ανίχνευση αυτών των φυλογενετικών ακραίων συνθηκών στο σχετικό με το SARS clade υποδηλώνει ότι όλοι οι ασιατικοί ιοί είναι πιθανό να εντοπιστούν. Αυτό, θεωρητικά, θα εξασφάλιζε ευρεία ευαισθησία ακόμη και σε περίπτωση πολλαπλών ανεξάρτητων αποκλήσεων παραλλαγών ιών από μια δεξαμενή ζώων. "

Αυτή η δήλωση δείχνει ότι το γονίδιο E που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή RT-PCR, όπως περιγράφεται στο χαρτί Corman-Drosten, δεν είναι ειδικό για το SARS-CoV-2.

Οι εκκινητές γονιδίων E ανιχνεύουν επίσης ένα ευρύ φάσμα άλλων ιών SARS.

Το γονιδίωμα του κοροναϊού είναι ο μεγαλύτερος από όλους τους ιούς RNA που μολύνουν τον άνθρωπο και όλοι έχουν πολύ παρόμοια μοριακή δομή. Ωστόσο, το SARS-CoV1 και το SARS-CoV-2 έχουν δύο πολύ συγκεκριμένα γενετικά δακτυλικά αποτυπώματα, τα οποία τα ξεχωρίζουν από τους άλλους κοροναϊούς.

Πρώτον, υπάρχει μια μοναδική ακολουθία δακτυλικών αποτυπωμάτων (KTFPPTEPKKDKKKK) στην N-πρωτεΐνη των SARS-CoV και SARS-CoV-2 [13,14,15]. Δεύτερον, τόσο το SARS-CoV1 όσο και το SARS-CoV2 δεν περιέχουν την πρωτεΐνη HE, ενώ όλοι οι άλλοι κοροναϊοί κατέχουν αυτό το γονίδιο [13, 14].

Έτσι, για να ανιχνευθεί συγκεκριμένα ένα προϊόν PCR SARS-CoV1 και SARS-CoV-2, η παραπάνω περιοχή στο γονίδιο N θα έπρεπε να είχε επιλεγεί ως στόχος ενίσχυσης. Ένα αξιόπιστο διαγνωστικό τεστ θα πρέπει να επικεντρώνεται σε αυτήν τη συγκεκριμένη περιοχή στο γονίδιο N ως επιβεβαιωτικό τεστ. Το PCR για αυτό το γονίδιο N δεν επικυρώθηκε περαιτέρω ούτε συνιστάται ως γονίδιο δοκιμής από το χαρτί Drosten-Corman, επειδή «δεν ήταν τόσο ευαίσθητο» με τον αρχικό ανιχνευτή SARS-CoV [1].

Επιπλέον, η απουσία του γονιδίου HE τόσο στο SARS-CoV1 όσο και στο SARS-CoV-2 καθιστά αυτό το γονίδιο τον ιδανικό αρνητικό έλεγχο για τον αποκλεισμό άλλων κοροναϊών. Το χαρτί Corman-Drosten δεν περιέχει αυτόν τον αρνητικό έλεγχο, ούτε περιέχει άλλα αρνητικά στοιχεία ελέγχου.

Η δοκιμή PCR στο χαρτί Corman-Drosten δεν περιέχει επομένως ούτε ένα μοναδικό θετικό μάρτυρα ούτε αρνητικό έλεγχο για να αποκλείσει την παρουσία άλλων κοροναϊών. Αυτό είναι ένα άλλο μεγάλο ελάττωμα σχεδιασμού που χαρακτηρίζει το τεστ ως ακατάλληλο για διάγνωση.

6. Η τυπική επιχειρησιακή διαδικασία (SOP) δεν είναι διαθέσιμη

Θα πρέπει να υπάρχει διαθέσιμη μια Τυπική Λειτουργική Διαδικασία (SOP), η οποία καθορίζει ξεκάθαρα τις παραπάνω παραμέτρους, έτσι ώστε όλα τα εργαστήρια να είναι σε θέση να δημιουργήσουν τις ίδιες ίδιες συνθήκες δοκιμής. Η ύπαρξη επικυρωμένου καθολικού SOP είναι απαραίτητη, επειδή διευκολύνει τη σύγκριση δεδομένων εντός και μεταξύ των χωρών.

Είναι πολύ σημαντικό να προσδιορίσετε ξεκάθαρα όλες τις παραμέτρους εκκινήτων. Σημειώνουμε ότι αυτό δεν έγινε. Επιπλέον, η τιμή Ct που υποδεικνύει πότε ένα δείγμα πρέπει να θεωρείται θετικό ή αρνητικό δεν καθορίζεται. Δεν προσδιορίζεται επίσης όταν ένα δείγμα θεωρείται μολυσμένο με ιούς SARS-CoV.

Όπως φαίνεται παραπάνω, η δοκιμή δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ θραυσμάτων ιών και ιών, επομένως η τιμή Ct που δείχνει τη θετικότητα είναι ζωτικής σημασίας. Αυτή η τιμή Ct θα έπρεπε να είχε καθοριστεί στην Τυπική Διαδικασία Λειτουργίας (SOP) και να τεθεί σε σύνδεση, έτσι ώστε όλα τα εργαστήρια που διεξάγουν αυτήν τη δοκιμή να έχουν ακριβώς τις ίδιες οριακές συνθήκες.

Δείχνει σε λανθασμένη επιστήμη ότι ένα τέτοιο SOP δεν υπάρχει. Τα εργαστήρια είναι επομένως ελεύθερα να διενεργήσουν τη δοκιμή όπως το κρίνουν κατάλληλο, με αποτέλεσμα μια τεράστια ποσότητα παραλλαγής.

Τα εργαστήρια σε όλη την Ευρώπη μένουν με πολλές ερωτήσεις. Ποια αστάρια να παραγγείλετε; Ποια νουκλεοτίδια να συμπληρώσουν τα απροσδιόριστα μέρη; Ποια τιμή Tm να επιλέξετε; Πόσους κύκλους PCR να εκτελέσετε; Σε ποια τιμή Ct είναι θετικό το δείγμα; Και πότε είναι αρνητικό;

Και πόσα γονίδια θα δοκιμαστούν; Πρέπει να δοκιμαστούν όλα τα γονίδια ή μόνο το γονίδιο E και RpRd όπως φαίνεται στον πίνακα 2 του χαρτιού Corman-Drosten; Πρέπει επίσης να εξεταστεί το γονίδιο N; Και ποιος είναι ο αρνητικός έλεγχός τους; Ποιος είναι ο θετικός έλεγχός τους;

Το πρωτόκολλο όπως περιγράφεται είναι δυστυχώς πολύ ασαφές και λανθασμένο στο σχεδιασμό του ότι μπορεί κανείς να πάει σε δεκάδες διαφορετικές κατευθύνσεις. Δεν φαίνεται να υπάρχει τυποποίηση ούτε SOP, επομένως δεν είναι σαφές πώς μπορεί να εφαρμοστεί αυτή η δοκιμή.

7. Συνέπειες των σφαλμάτων που περιγράφονται στο σημείο 1-5: ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Η δοκιμή RT-PCR που περιγράφεται στο χαρτί Corman-Drosten περιέχει τόσα πολλά μοριακά σφάλματα βιολογικού σχεδιασμού (βλ. 1-5) που δεν είναι δυνατόν να επιτευχθούν σαφή αποτελέσματα. Είναι αναπόφευκτο αυτό το τεστ να δημιουργήσει έναν τεράστιο αριθμό από τα λεγόμενα «ψευδώς θετικά».

Ο ορισμός των ψευδών θετικών είναι ένα αρνητικό δείγμα, το οποίο αρχικά βαθμολογείται θετικό, αλλά το οποίο είναι αρνητικό μετά την επανεξέταση με το ίδιο τεστ. Τα ψευδώς θετικά είναι λανθασμένα θετικά αποτελέσματα δοκιμών, δηλαδή αρνητικά δείγματα που είναι θετικά.

Και αυτό είναι πράγματι αυτό που υπάρχει στο έγγραφο Corman-Drosten. Στη σελίδα 6 του χειρόγραφου PDF οι συγγραφείς αποδεικνύουν ότι ακόμη και υπό καλά ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, δημιουργείται ένα σημαντικό ποσοστό ψευδών θετικών με αυτήν τη δοκιμή:

«Σε τέσσερις μεμονωμένες δοκιμαστικές αντιδράσεις, παρατηρήθηκε ασθενής αρχική αντιδραστικότητα, ωστόσο ήταν αρνητικές κατά την επανεξέταση με τον ίδιο προσδιορισμό. Αυτά τα σήματα δεν συσχετίστηκαν με κανένα συγκεκριμένο ιό και για κάθε ιό με τον οποίο εμφανίστηκε η αρχική θετική αντιδραστικότητα, υπήρχαν άλλα δείγματα που περιείχαν τον ίδιο ιό σε υψηλότερη συγκέντρωση αλλά δεν είχαν θετικό τεστ.

Δεδομένων των αποτελεσμάτων από τον εκτενή τεχνικό προσόντα που περιγράφεται παραπάνω, συνήχθη το συμπέρασμα ότι αυτή η αρχική αντιδραστικότητα δεν οφειλόταν στη χημική αστάθεια των ανιχνευτών PCR σε πραγματικό χρόνο και πιθανότατα στον χειρισμό ζητημάτων που προκλήθηκαν από την ταχεία εισαγωγή νέων διαγνωστικών δοκιμών και ελέγχων κατά τη διάρκεια αυτής της αξιολόγησης μελέτη." [1]

Η πρώτη πρόταση αυτού του αποσπάσματος είναι σαφείς ενδείξεις ότι το τεστ PCR που περιγράφεται στο χαρτί Corman-Drosten δημιουργεί ψευδώς θετικά. Ακόμα και υπό τις καλά ελεγχόμενες συνθήκες του υπερσύγχρονου εργαστηρίου Charité, 4 από τα 310 πρωτοβάθμια τεστ είναι ψευδώς θετικά ανά ορισμό.

Τέσσερα αρνητικά δείγματα αρχικά δοκιμάστηκαν θετικά και μετά ήταν αρνητικά κατά την επανεξέταση. Αυτό είναι το κλασικό παράδειγμα ενός ψευδώς θετικού. Σε αυτήν την περίπτωση οι συγγραφείς δεν τα αναγνωρίζουν ως ψευδώς θετικά, κάτι που είναι πνευματικά ανέντιμο.

Μια άλλη παρατήρηση στο παραπάνω απόσπασμα είναι ότι οι συγγραφείς εξηγούν τα ψευδώς θετικά ως «χειρισμός ζητημάτων που προκαλούνται από την ταχεία εισαγωγή νέων διαγνωστικών εξετάσεων». Φανταστείτε τα εργαστήρια που πρέπει να εισαγάγουν το τεστ χωρίς όλες τις απαραίτητες πληροφορίες που συνήθως περιγράφονται σε ένα SOP.

8. Το έγγραφο Corman-Drosten δεν αξιολογήθηκε από ομοτίμους

Πριν από την επίσημη δημοσίευση σε ένα επιστημονικό περιοδικό, επιστημονικά και ιατρικά άρθρα είναι παραδοσιακά πιστοποιημένα από "peer review". Σε αυτήν τη διαδικασία, οι συντάκτες του περιοδικού λαμβάνουν συμβουλές από διάφορους εμπειρογνώμονες («διαιτητές») που έχουν αξιολογήσει το έγγραφο και ενδέχεται να εντοπίσουν αδυναμίες στις υποθέσεις, τις μεθόδους και τα συμπεράσματά του.

Συνήθως ένα περιοδικό θα δημοσιεύσει ένα άρθρο μόνο όταν οι συντάκτες είναι ικανοποιημένοι ότι οι συγγραφείς έχουν εξετάσει τις ανησυχίες των διαιτητών και ότι τα δεδομένα που παρουσιάζονται υποστηρίζουν τα συμπεράσματα που συντάσσονται στο έγγραφο. " Αυτή η διαδικασία περιγράφεται επίσης καλά για την Ευρω-επιτήρηση [16].

Το έγγραφο Corman-Drosten υποβλήθηκε στην Eurosurveillance στις 21 Ιανουαρίου 2020 και έγινε δεκτό για δημοσίευση στις 22 Ιανουαρίου 2020. Στις 23 Ιανουαρίου 2020 το έγγραφο ήταν online. Στις 13 Ιανουαρίου 2020, η έκδοση 1-0 του πρωτοκόλλου δημοσιεύθηκε στον επίσημο ιστότοπο του ΠΟΥ [17], ενημερώθηκε στις 17 Ιανουαρίου 2020 ως έκδοση εγγράφου 2-1 [18], ακόμη και πριν από την έκδοση του εγγράφου Corman-Drosten στις 23 Ιανουαρίου στις Eurosurveillance.

Κανονικά, η αξιολόγηση από ομοτίμους είναι χρονοβόρα διαδικασία, καθώς τουλάχιστον δύο εμπειρογνώμονες από τον τομέα πρέπει να διαβάσουν και να σχολιάσουν κριτικά την υποβληθείσα εργασία. Κατά τη γνώμη μας, αυτό το έγγραφο δεν αξιολογήθηκε από ομοτίμους.

Είκοσι τέσσερις ώρες απλά δεν αρκούν για να πραγματοποιήσουν μια εμπεριστατωμένη αξιολόγηση από ομοτίμους. Το συμπέρασμά μας υποστηρίζεται από το γεγονός ότι διαπιστώθηκε τεράστιος αριθμός πολύ

σοβαρών ελαττωμάτων σχεδιασμού από εμάς, οι οποίες κάνουν τη δοκιμή PCR εντελώς ακατάλληλη ως διαγνωστικό εργαλείο για τον εντοπισμό του ιού SARS-CoV-2.

Οποιοσδήποτε μοριακός βιολόγος εξοικειωμένος με το σχεδιασμό RT-PCR θα είχε παρατηρήσει εύκολα τα σοβαρά σφάλματα που υπάρχουν στο έγγραφο Corman-Drosten πριν από την πραγματική διαδικασία αναθεώρησης. Ζητήσαμε από την Eurosurveillance στις 26 Οκτωβρίου 2020 να μας στείλει ένα αντίγραφο της έκθεσης αξιολόγησης από ομοτίμους.

Μέχρι σήμερα, δεν έχουμε λάβει αυτήν την έκθεση και σε επιστολή της 18ης Νοεμβρίου 2020, το ECDC ως οικοδεσπότης της Eurosurveillance αρνήθηκε να παράσχει πρόσβαση χωρίς να παρέχει σημαντικούς επιστημονικούς λόγους για την απόφασή τους. Αντιθέτως, γράφουν ότι «η αποκάλυψη θα υπονόμευε τον σκοπό των επιστημονικών ερευνών». [24].

9. Συγγραφείς ως συντάκτες

Ένα τελευταίο σημείο είναι ένα από τα κύρια προβλήματα. Αποδεικνύεται ότι δύο συγγραφείς της εφημερίδας Corman-Drosten, Christian Drosten και Chantal Reusken, είναι επίσης μέλη του συντακτικού συμβουλίου αυτού του περιοδικού [19]. Ως εκ τούτου, υπάρχει μια σοβαρή σύγκρουση συμφερόντων που ενισχύει τις υποψίες ότι το έγγραφο δεν αξιολογήθηκε από ομοτίμους.

Έχει την εμφάνιση ότι η ταχεία δημοσίευση ήταν δυνατή απλώς και μόνο επειδή οι συγγραφείς ήταν επίσης μέρος του συντακτικού συμβουλίου της Eurosurveillance. Αυτή η πρακτική χαρακτηρίζεται ως συμβιβαστική επιστημονική ακεραιότητα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΦΑΛΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΒΡΗΘΗΚΑΝ ΣΤΟ ΧΑΡΤΙ CORMAN-DROSTEN

Το χαρτί Corman-Drosten περιέχει τα ακόλουθα συγκεκριμένα σφάλματα:

1. Δεν υπάρχει συγκεκριμένος λόγος για τη χρήση αυτών των εξαιρετικά υψηλών συγκεντρώσεων εκκινητών σε αυτό το πρωτόκολλο. Οι περιγραφόμενες συγκεντρώσεις οδηγούν σε αυξημένες μη ειδικές συνδέσεις και ενισχύσεις προϊόντων PCR, καθιστώντας το τεστ ακατάλληλο ως ειδικό διαγνωστικό εργαλείο για την ταυτοποίηση του ιού SARS-CoV-2.

2. Έξι μη καθορισμένες θέσεις ταλάντευσης θα παρουσιάσουν μια τεράστια μεταβλητότητα στις πραγματικές εργαστηριακές υλοποιήσεις αυτού του τεστ. η συγκεχυμένη μη ειδική περιγραφή στο χαρτί Corman-Drosten δεν είναι κατάλληλη ως Πρότυπο Πρωτόκολλο Λειτουργίας, καθιστώντας το τεστ ακατάλληλο ως ειδικό διαγνωστικό εργαλείο για τον εντοπισμό του ιού SARS-CoV-2.

3. Το τεστ δεν μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ ολόκληρου του ιού και των ιικών θραυσμάτων. Επομένως, το τεστ δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό για άθικτους (μολυσματικούς) ιούς, καθιστώντας το τεστ ακατάλληλο ως ειδικό διαγνωστικό εργαλείο για τον εντοπισμό του ιού SARS-CoV-2 και να κάνει συμπεράσματα σχετικά με την παρουσία μιας λοίμωξης.

4. Διαφορά 10 ° C σε σχέση με τη θερμοκρασία ανόπτησης T_m για ζεύγος εκκινητών 1 (RdRp_SARSr_F και RdRp_SARSr_R) καθιστά επίσης τη δοκιμή ακατάλληλη ως ειδικό διαγνωστικό εργαλείο για την αναγνώριση του ιού SARS-CoV-2.

5. Ένα σοβαρό σφάλμα είναι η παράλειψη μιας τιμής C_t στην οποία ένα δείγμα θεωρείται θετικό και αρνητικό. Αυτή η τιμή C_t δεν βρίσκεται επίσης σε υποβολές παρακολούθησης που καθιστούν τη δοκιμή ακατάλληλη ως ειδικό διαγνωστικό εργαλείο για την αναγνώριση του ιού SARS-CoV-2.

6. Τα προϊόντα PCR δεν έχουν επικυρωθεί σε μοριακό επίπεδο. Αυτό το γεγονός καθιστά το πρωτόκολλο άχρηστο ως ειδικό διαγνωστικό εργαλείο για τον εντοπισμό του ιού SARS-CoV-2.

7. Η δοκιμή PCR δεν περιέχει ούτε ένα μοναδικό θετικό μάρτυρα για την αξιολόγηση της ειδικότητάς του για το SARS-CoV-2 ούτε έναν αρνητικό έλεγχο για τον αποκλεισμό της παρουσίας άλλων κοροναϊών, καθιστώντας το τεστ ακατάλληλο ως ειδικό διαγνωστικό εργαλείο για τον προσδιορισμό του SARS-CoV-2 ιός.

8. Ο σχεδιασμός του τεστ στο χαρτί Corman-Drosten είναι τόσο ασαφής και ελαττωματικός που μπορεί κανείς να πάει σε δεκάδες διαφορετικές κατευθύνσεις, τίποτα δεν είναι τυποποιημένο και δεν υπάρχει SOP. Αυτό αμφισβητεί ιδιαίτερα την επιστημονική εγκυρότητα του τεστ και το καθιστά ακατάλληλο ως ειδικό διαγνωστικό εργαλείο για τον εντοπισμό του ιού SARS-CoV-2.

9. Πιθανότατα, το χαρτί Corman-Drosten δεν αξιολογήθηκε από ομοτίμους, καθιστώντας το τεστ ακατάλληλο ως ειδικό διαγνωστικό εργαλείο για τον εντοπισμό του ιού SARS-CoV-2.

10. Βρίσκουμε σοβαρές συγκρούσεις συμφερόντων για τουλάχιστον τέσσερις συγγραφείς, εκτός από το γεγονός ότι δύο από τους συγγραφείς της εφημερίδας Corman-Drosten (Christian Drosten και Chantal Reusken) είναι μέλη του συντακτικού συμβουλίου της Eurosurveillance.

Προστέθηκε σύγκρουση συμφερόντων στις 29 Ιουλίου 2020 (ο Olfert Landt είναι διευθύνων σύμβουλος της TIB-Molbiol · ο Marco Kaiser είναι ανώτερος ερευνητής στο GenExpress και υπηρετεί ως επιστημονικός σύμβουλος για την TIB-Molbiol), που δεν δηλώθηκε στην αρχική έκδοση (και εξακολουθεί να είναι λείπει στην έκδοση PubMed) ·

Η TIB-Molbiol είναι η εταιρεία που ήταν «η πρώτη» που παρήγαγε κιτ PCR (Light Mix) με βάση το πρωτόκολλο που δημοσιεύθηκε στο χειρόγραφο Corman-Drosten και σύμφωνα με τις δικές τους λέξεις, διανέμουν αυτά τα κιτ δοκιμής PCR πριν από τη δημοσίευση υποβλήθηκε ακόμη και [20] περαιτέρω, Victor Corman & O Christian Drosten δεν μπόρεσε να αναφέρει τη δεύτερη σχέση τους: το εμπορικό εργαστήριο δοκιμών «Labor Berlin».

Και οι δύο είναι υπεύθυνοι για τη διάγνωση ιών εκεί [21] και η εταιρεία δραστηριοποιείται στον τομέα των δοκιμών PCR σε πραγματικό χρόνο.

Υπό το φως της επανεξέτασης του πρωτοκόλλου δοκιμών για τον προσδιορισμό του SARS-CoV-2 που περιγράφεται στο χαρτί Corman-Drosten, έχουμε εντοπίσει σχετικά με σφάλματα και εγγενείς παραπλανητικές ενδείξεις που καθιστούν το τεστ SARS-CoV-2 PCR άχρηστο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η απόφαση σχετικά με το ποια πρωτόκολλα δοκιμής δημοσιεύονται και διατίθενται ευρέως βρίσκεται ακριβώς στα χέρια της Eurosurveillance. Μια απόφαση για την αναγνώριση των σφαλμάτων που φαίνονται στο χαρτί Corman-Drosten έχει το πλεονέκτημα να ελαχιστοποιήσει σημαντικά το ανθρώπινο κόστος και τα βάσανα.

Δεν είναι προς το συμφέρον της Eurosurveillance να αποσύρει αυτό το έγγραφο; Το συμπέρασμά μας είναι σαφές. Ενόψει όλων των τεράστιων ατελειών και σφαλμάτων σχεδιασμού πρωτοκόλλου PCR που περιγράφονται εδώ, καταλήγουμε στο συμπέρασμα: Δεν υπάρχει μεγάλη επιλογή στο πλαίσιο της επιστημονικής ακεραιότητας και ευθύνης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

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

[2] Επικοινωνία μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου μεταξύ του Dr. Peter Borger και του Dr. Adam Meijer: [Συμπληρωματικό υλικό](#)

[3] Jafaar et al., Συσχέτιση μεταξύ 3790 Ποσοτικής Αντίδρασης Αλυσίδας Πολυμεράσης - Θετικά Δείγματα και Θετικές Καλλιέργειες Κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων 1941 Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο Coronavirus 2 Απομόνωση. <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa1491/5912603>

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

[5] Google Analytics - COVID19-θάνατοι παγκοσμίως: <https://bit.ly/3fndemJ>
Αρχείο: <https://archive.is/PpqEE>

[6] Εργαστηριακές δοκιμές για το COVID-19 Emergency Response Technical Center, NIVD under China CDC 15 Μαρτίου 2020:
<http://www.chinacdc.cn/en/COVID19/202003/P020200323390321297894.pdf>

[7] Real-Time PCR Handbook Life Technologies:
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>

Nolan T, Huggett J, Sanchez E. Καλός οδηγός πρακτικής για την εφαρμογή της ποσοτικής PCR (qPCR)
Πρώτη έκδοση 2013

[8] Trestan Pillonel et al, Επιστολή στον συντάκτη: Ανίχνευση SARS-CoV-2 με πραγματικό χρόνο RT-PCR: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7268274/>

[9] Kurkela, Satu, και David WG Brown. "Μοριακές-διαγνωστικές τεχνικές." Ιατρική 38.10 (2009): 535-540.

[10] Wolfel et al., Ιολογική αξιολόγηση νοσοκομειακών ασθενών με COVID-2019
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x>

[11] Thermofischer Primer Dimer Web Tool: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>

[Συμπληρωματικό υλικό](#)

[12] Primer-BLAST, NCBI - Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογίας Πληροφορίες:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

[13] Marra MA, Steven MJ, Caroline RA, Robert AH, Angela BW et al. (2003) Επιστήμη. Η ακολουθία του γονιδιώματος του κοροναϊού που σχετίζεται με το SARS. Science 300 (5624): 1399-1404.

[14] Σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο coronavirus 2 απομόνωση Wuhan-Hu-1, πλήρες γονιδίωμα: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947>

[15] Borger P. Αναμενόταν ένα Coronavirus σαν SARS, αλλά δεν έγινε τίποτα για να προετοιμαστεί. Am J Biomed Sci Res 2020. <https://biomedgrid.com/pdf/AJBSR.MS.ID.001312.pdf>
https://www.researchgate.net/publication/341120750_A_SARS-like_Coronavirus_was_Expected_but_nothing_was_done_to_be_Prepared ;
Αρχείο: <https://archive.is/i76Hu>

[16] Διαδικασία αξιολόγησης / αξιολόγησης εγγράφου Eurosurveillance:
<https://www.eurosurveillance.org/evaluation>

[17] Επίσημη σύσταση για το πρωτόκολλο και το χειρόγραφο Corman-Drosten από τον ΠΟΥ, που δημοσιεύθηκε στις 13 Ιανουαρίου 2020 ως έκδοση 1.0 του εγγράφου:
<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf> ; αρχείο: <https://bit.ly/3m3jXVH>

[18] Επίσημη σύσταση του ΠΟΥ για το πρωτόκολλο Corman / Drosten RT-qPCR, το οποίο προέρχεται άμεσα από τη δημοσίευση Eurosurveillance, έγγραφο-έκδοση 2-1, που δημοσιεύθηκε στις 17 Ιανουαρίου 2020: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2

[19] Συντακτική επιτροπή Eurosurveillance, 2020: <https://www.eurosurveillance.org/upload/site-asset/imgs/2020-09-Έκδοση%20Board%20PDF.pdf> ;
Αρχείο: <https://bit.ly/2TqXBjX>

[20] Οδηγίες χρήσης LightMix SarbecoV E-gene plus EAV Control, TIB-Molbiol & Roche Molecular Solutions, 11 Ιανουαρίου 2020: [https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_40-0776_96_Sarbeco-E-gene_V200204_09164154001\(1\).pdf](https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_40-0776_96_Sarbeco-E-gene_V200204_09164154001(1).pdf) , χρονική σήμανση - 11 Ιανουαρίου 2020: <https://archive.is/Vulo5> ;
Αρχείο: <https://bit.ly/3fm9bXH>

[21] Christian Drosten & Victor Corman, υπεύθυνος για τη διάγνωση ιών στο Labor Berlin:
<https://www.laborberlin.com/fachbereiche/virologie/>
Αρχείο: <https://archive.is/CDEUG>

[22] Τομ Τζέφερσον, Ελίζαμπεθ Σπένσερ, Τζον Μπράσεϊ, Καρλ Χενέγκαν Ιογενείς καλλιέργειες για την αξιολόγηση μολυσματικότητας COVID- 19. Συστηματική αξιολόγηση. Συστηματική αναθεώρηση doi:
<https://doi.org/10.1101/2020.08.04.20167932>
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.08.04.20167932v4>

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

[24] Απάντηση του ECDC στον Δρ. Peter Borger, 18 Νοεμβρίου 2020:
[Συμπληρωματικό υλικό](#)

[25] Καθ. Δρ. Ulrike Kämmerer & ομάδα, έρευνα & πίνακας Primer-BLAST:
[Συμπληρωματικό υλικό](#)

Επιπλέον βιβλιογραφία:

Περιγραφή RT-PCR RKI Γερμανία, στη σελίδα 10 του παρόντος σύνδεσμο:
<https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBE>

Συνεργασίες συγγραφέα :

- 1) Dr. Pieter Borger (MSc, PhD), Molecular Genetics, W + W Research Associate, Lörrach, Γερμανία
 - 2) Rajesh Kumar Malhotra (Καλλιτέχνης ψευδώνυμο: Bobby Rajesh Malhotra), πρώην τρισετάστατος καλλιτέχνης / επιστημονικές απεικονίσεις στο CeMM - Κέντρο Μοριακής Ιατρικής της Αυστριακής Ακαδημίας Επιστημών (2019-2020), Πανεπιστήμιο Εφαρμοσμένων Τεχνών - Τμήμα Ψηφιακών Τεχνών Βιέννη, Αυστρία
 - 3) Δρ. Michael Yeadon BSs (Hons) Biochem Tox U Surrey, PhD Pharmacology U Surrey. Διευθύνων Σύμβουλος, Yeadon Consulting Ltd, πρώην Chief Scientist της Pfizer, Ηνωμένο Βασίλειο
 - 4) Dr. Clare Craig MA, (Cantab) BM, BCh (Oxon), FRCPath, Ηνωμένο Βασίλειο
 - 5) Ο Kevin McKernan , BS Emory University, Chief Scientific Officer, ιδρυτής Medical Genomics, σχεδίασε τον αγωγό αλληλουχίας στο WIBR / MIT για το Human Genome Project, εφευρέθηκε και ανέπτυξε τον SOLiD sequencer, απονέμει διπλώματα ευρεσιτεχνίας που σχετίζονται με PCR, DNA Isolation and Sequencing, USA
 - 6) Καθ. Δρ. Klaus Steger , Τμήμα Ουρολογίας, Παιδιατρικής Ουρολογίας και Ανδρολογίας, Μοριακής Ανδρολογίας, Κέντρο Βιοϊατρικής Έρευνας του Πανεπιστημίου Justus Liebig, Giessen, Γερμανία
 - 7) Δρ. Paul McSheehy (BSc, PhD), Biochemist & Industry Pharmacologist, Loerrach, Γερμανία
 - 8) Δρ. Lidiya Angelova , MSc στη Βιολογία, Διδακτορικό στη Μικροβιολογία, Πρώην ερευνητής στο Εθνικό Ινστιτούτο Αλλεργίας και Λοιμωδών Νοσημάτων (NIAID), Μέριλαντ, ΗΠΑ
 - 9) Ο Δρ Fabio Franchi , πρώην Dirigente Medico (MD) σε θάλαμο μολυσματικών ασθενειών, ειδικευμένος στις «Λοιμώδεις ασθένειες» και «Υγιεινή και προληπτική ιατρική», Società Scientifica per il Principio di Precauzione (SSPP), Ιταλία
 - 10) Δρ. Med. Thomas Binder, Παθολόγος και Καρδιολόγος (FMH), Ελβετία
 - 11) Καθηγητής Dr. med. Henrik Ullrich, ειδικός διαγνωστικής ακτινολογίας, επικεφαλής ιατρός στο Κέντρο ακτινολογίας του Collm Oschatz-Hospital, Γερμανία
 - 12) Καθηγητής Dr. Makoto Ohashi , ομότιμος καθηγητής, Διδακτορικό στη Μικροβιολογία και Ανοσολογία, Πανεπιστήμιο Tokushima, Ιαπωνία
 - 13) Δρ Stefano Scoglio, B.Sc. Διδακτορικό, Μικροβιολόγος, Διατροφολόγος, Ιταλία
 - 14) Δρ. Marjolein Doesburg-van Kleffens (MSc, PhD), ειδικός στην εργαστηριακή ιατρική (κλινική χημεία), Maasziekenhuis Pantein, Beugen, Ολλανδία
 - 15) Δρ Dorothea Gilbert (MSc, PhD), PhD Περιβαλλοντική Χημεία και Τοξικολογία. DGI Consulting Services, Όσλο, Νορβηγία
 - 16) Δρ Rainer J. Klement, PhD. Τμήμα Ογκολογίας Ακτινοβολίας, Νοσοκομείο Leopoldina Schweinfurt, Γερμανία
 - 17) Δρ. Ruth Schrufer, PhD, ανθρώπινη γενετική / ανοσολογία, Μόναχο, Γερμανία,
 - 18) Ντρα. Berber W. Pieksma, Γενικός Ιατρός, Κάτω Χώρες
 - 19) Δρ. Jan Bonte (GJ), Σύμβουλος Νευρολόγος, Ολλανδία
 - 20) Δρ. Bruno H. Dalle Carbonare (Molecular biologist), ειδικός IP, BDC Basel, Ελβετία
 - 21) Dr. Kevin P. Corbett , MSc Nursing (Kings College London) PhD (London South Bank) Social Sciences (Science & Technology Studies) Λονδίνο, Αγγλία, Ηνωμένο Βασίλειο
 - 22) Καθηγητής Dr. Ulrike Kämmerer, ειδικός στην ιολογία / ανοσολογία / Ανθρώπινη βιολογία / Κυτταρική βιολογία, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Würzburg, Γερμανία
- Συνεισφορές του συγγραφέα:
- PB: Σχεδίασε και διεξήγαγε τις αναλύσεις και την έρευνα, εννοώντας το χειρόγραφο.
- BRM: Σχεδίασε και διεξήγαγε την έρευνα, εννοώντας τα σχήματα και το χειρόγραφο.
- MY: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
- KMcK: Πραγματοποίησε τις αναλύσεις και την έρευνα, αντιλήφθηκε το χειρόγραφο.
- KS: Πραγματοποίησε τις αναλύσεις και την έρευνα.
- PMcS: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
- LA: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
- FF: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.

TB: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
HU: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
MO: Προδιατύπωση των αναλύσεων και της έρευνας
SS: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
MDvK: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
ΓΔ: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
RJK: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
RS: Προδιατύπωση των αναλύσεων και της έρευνας, καθώς και το χειρόγραφο.
BWK: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
RvV: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
JB: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
KC: Προεπισκόπηση των αναλύσεων και της έρευνας.
Ηνωμένο Βασίλειο: Σχεδίασε και διεξήγαγε τις αναλύσεις και την έρευνα, εννοώντας το χειρόγραφο.

ΠΗΓΗ