

5.1.2e

Van: [redacted])
Verzonden: woensdag 17 maart 2021 18:08
Aan: 5.1.2i Functionele emailadressen
CC: 5.1.2i Functionele emailadressen [redacted] 5.1.2e [redacted] minvws.nl; 5.1.2i Functionele emailadressen [redacted] Functionele emailadres [redacted] 5.1.2e [redacted]); [redacted] 5.1.2e [redacted] [redacted] 5.1.2e [redacted]); [redacted] 5.1.2e [redacted])
Onderwerp: FW: 5.1.2e c.s./RIVM/Ministerie VWS [D100365_I23434438]
Bijlagen: 20210317_Ministerie VWS_RIVM.pdf; Corman-Drosten.pdf; Retraction paper.pdf
Urgentie: Hoog

Goedemiddag,

Willen jullie dit bericht innemen en uitzetten bij de Covid-afdeling?

Bij voorbaat dank,

5.1.2e

5.1.2e

Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport | Directie Bestuurlijk en Politieke Zaken

Parnassusplein 5 | 2500 EJ | Den Haag | Postbus 20350 | 2500 EJ | Den Haag

[redacted] 5.1.2e [redacted] 5.1.2e [redacted] 5.1.2e [redacted] minvws.nl | www.rijksoverheid.nl |

Bij VWS geldt een legitimatieplicht voor de toegang tot het ministerie. Dit betekent dat bij uw bezoek aan VWS om geldige legitimatie wordt gevraagd voor u het pand verder kunt betreden. Graag vraag ik uw aandacht hiervoor. Alvast bedankt voor de medewerking

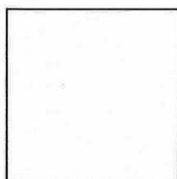
Van: [redacted] 5.1.2e | Open Legal Advocaten <[redacted] 5.1.2e @openlegal.nl>
Verzonden: woensdag 17 maart 2021 17:55
Aan: Minister van VWS <ministerdejonge@minvws.nl>; [redacted] 5.1.2e [redacted] lumc.nl
CC: [redacted] 5.1.2e [redacted] @rivm.nl; [redacted] 5.1.2e [redacted] [redacted] 5.1.2e [redacted] @openlegal.nl>
Onderwerp: 5.1.2e c.s./RIVM/Ministerie VWS [D100365_I23434438]
Urgentie: Hoog

Geachte heer De Jonge, geachte heer [redacted] 5.1.2e

namens cliënten verwijzen wij u naar de bijlagen (*), die u tevens per aangetekend schrijven zullen worden toegezonden. Uw reacties zien wij tegemoet.

Met vriendelijke groet,

5.1.2e



Open Legal Advocaten

Beukenlaan 129
5616 VD EINDHOVEN

T: 
F: 
I: www.openlegal.nl

De informatie verzonden in dit e-mailbericht is strikt vertrouwelijk en uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Openbaarmaking, vermenigvuldiging, verspreiding en/of verstrekking van deze informatie aan derden is, behoudens voorafgaande schriftelijke toestemming van de verzender, niet toegestaan. Open Legal Advocaten staat niet in voor de juiste en volledige overbrenging van de inhoud van een verzonden e-mailbericht, noch voor de tijdige ontvangst daarvan. Voorts kan Open Legal Advocaten niet garanderen dat een verzonden e-mailbericht vrij is van virussen, noch dat e-mailberichten worden overgebracht zonder inbreuk of tussenkomst van onbevoegde derden. Indien een van Open Legal Advocaten afkomstig en door u ontvangen e-mailbericht niet aan u is gericht, verzoeken wij u vriendelijk doch dringend het e-mailbericht te retourneren aan de verzender en het origineel en eventuele kopieën te verwijderen en te vernietigen. Open Legal Advocaten is een handelsnaam van AKV Advocatuur B.V. Ons kantoor staat ingeschreven in het Handelsregister van de Kamer van Koophandel onder KvK nr. 53689399. Op alle opdrachten aan ons kantoor zijn onze algemene voorwaarden van toepassing. Deze voorzien in een beroepsaansprakelijkheidsbeperking in overeenstemming met onze polisvoorwaarden.

AANGETEKEND!

Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport
T.a.v. de heer H.M. de Jonge
Parnassusplein 5
2511 VX DEN HAAG

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
T.a.v. de heer J.T. van Dissel
Antonie van Leeuwenhoeklaan 9
3721 MA BILTHOVEN

Advocaten
mr. N.J.P. Vanaken
mr. E.E.V. Swaabe
mevr. mr. R.A. van den Berkhoutel

Managing director
mevr. S. Joerawan

Praktijkondersteuner
R. Diederik

Beukenlaan 129
5616 VD Eindhoven

T 040 - 848 01 69
F 040 - 209 40 28

BTW NL850977113B01
KvK 53689399

Datum : 17 maart 2021
Onze referentie : D100365
Inzake : Yip c.s. / Ministerie VWS en RIVM

Geachte heer De Jonge, geachte heer Van Dissel,

Tot ons kantoor hebben zich meerdere belanghebbenden gewend, hieronder begrepen de heer Won Yip, de heer Laurens Meijer, de heer Niels Verwij, de heer Michel Schreuders, de heer Thomas Croiset van Uchelen en de heer Ytzen Zijlstra. Voormelde personen hebben ons verzocht hun belangen te behartigen, naar aanleiding waarvan wij u als volgt berichten.

Coronamaatregelen

Cliënten ondervinden reeds een jaar lang zowel persoonlijk als zakelijk in aanzienlijke mate hinder van de ingrijpende coronamaatregelen, zoals opgelegd door de Nederlandse overheid. Naar hun stellige verwachting geldt hetzelfde voor het merendeel van de burgers.

Uiteraard zijn cliënten van mening dat, voor zover noodzakelijk, de overheid tot taak heeft om de meest kwetsbare groep burgers te beschermen tegen de nadelige gevolgen van COVID-19. Zij stellen zich evenwel op het standpunt dat de tot op heden getroffen overheidsmaatregelen inmiddels niet meer in verhouding staan tot het aanvankelijk nagestreefde doel, te weten de effectieve bestrijding van het virus. Naast het feit dat het merendeel van deze maatregelen disproportioneel te noemen zijn, geldt dat een aantal van deze maatregelen aantoonbaar weinig tot geen effect sorteren in de strijd tegen het virus.

Cliënten stellen zich de vraag in hoeverre op goede grond nog langer kan worden vastgehouden aan het huidige coronabeleid. Een beleid waarbij alle Nederlandse burgers zich binnen de tijden van een avondklok, zonder fysiek contact en voorzien van een mondkapje, angstig voortbewegen binnen een volledig lamgelegde samenleving. Een beleid dat erop gericht is om zelfs onze kinderen lijdend voorwerp te laten zijn van grootschalige onnodige testcampagnes en waarbij inmiddels de eerste voorbereidingen worden getroffen tot het instellen van een vaccinatiepaspoort.

Open Legal Advocaten is een handelsnaam van AKV Advocatuur B.V. en staat ingeschreven in het Handelsregister van de Kamer van Koophandel onder KvK nr. 53689399. Op alle opdrachten aan ons kantoor zijn onze algemene voorwaarden van toepassing. Deze voorzien in een beroepsaansprakelijkheidsbeperking in overeenstemming met onze polisvoorwaarden.



Zelfs al zou het merendeel van de bevolking op enig moment ingeënt zijn met de fel gepromoteerde vaccins, dan nog geldt dat de overheid haar burgers geen enkele garantie kan bieden dat de opgelegde overheidsmaatregelen zullen kunnen worden teruggedraaid. Aanvullend geldt dat van deze vaccins überhaupt niet bekend is of zij werkelijk bescherming bieden tegen ziekte en overlijden, zeker als het om varianten gaat. Verder is nog niet bekend of zij de keten van transmissie onderbreken en dus of gevaccineerde mensen nog in staat zijn om het virus verder te verspreiden. Evenmin is bekend in hoeverre het gebruik van de vaccins op langere termijn tot bijwerkingen en hiermee tot lichamelijke schade zullen leiden.

Hetgeen wel met zekerheid kan worden gesteld, is dat cliënten en met hen tal van andere burgers als gevolg van de getroffen overheidsmaatregelen economisch, fysiek en mentaal in toenemende mate schade leiden. Cliënten zijn stellig van mening dat het tot op heden gevoerd coronabeleid zo spoedig mogelijk een halt dient te worden toegevoerd. Om die reden wenden wij ons tot u.

Besmettingscijfers

Vaststaat dat alle door de overheid getroffen coronamaatregelen hun grondslag vinden in de 'besmettingscijfers' zoals geïnterpreteerd door het RIVM, beter verwoord als positieve PCR-testresultaten. Het RIVM stelt de richtlijnen op voor de uitgevoerde PCR-testen en adviseert op basis van de testresultaten het Ministerie van VWS ten aanzien van het door haar te voeren coronabeleid. Het RIVM ontvangt de testresultaten van de ziekenhuizen en GGD's, die op hun beurt de PCR-testen uitvoeren via de teststraten en andere testlocaties.

2

Het voorgaande heeft kort gezegd tot gevolg dat voor zover er wezenlijke gebreken zouden kleven aan de wijze waarop de PCR-test bij COVID-19 wordt gebruikt, de hieruit voortvloeiende testresultaten onvoldoende betrouwbaar zijn. In zodanig geval kunnen deze testresultaten niet als wetenschappelijke basis dienen voor de tot op heden getroffen overheidsmaatregelen.

Zoals u ongetwijfeld bekend, kan de huidige wijze waarop de PCR-test bij COVID-19 binnen Nederland wordt gebruikt van meet af aan op bijzondere wetenschappelijke kritiek rekenen. De vraag is of de wijze waarop dit testbeleid plaatsvindt deze toets der kritiek kan doorstaan. Cliënten zijn van oordeel dat dit om meerdere redenen niet het geval is en zij stellen daartoe het volgende.

Corman-Drosten paper

De wijze waarop de PCR-test bij COVID-19 tot op heden wordt gebruikt vindt haar oorsprong in bijgevoegde publicatie¹ (*), beter bekend als de 'Corman-Drosten' paper. Deze paper is onder andere door de heren Corman en Drosten op 21 januari 2020 ingediend bij Eurosurveillance. Op 22 januari 2020 is de paper door de editorial board van Eurosurveillance goedgekeurd en op 23 januari 2020 is deze door Eurosurveillance online gepubliceerd.

Over de werkelijke status en achtergrond van Eurosurveillance is opmerkelijk genoeg weinig bekend. Eurosurveillance positioneert zich als een medisch tijdschrift over epidemiologie, dat kennelijk gelieerd is aan het European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Dit ECDC is op haar beurt

¹ 'Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) bij real-time RT-PCR'



gelieerd aan de Europese Unie. Binnen de medisch-wetenschappelijke wereld wordt aan het tijdschrift Eurosurveillance kennelijk geen enkele noemenswaardige status toegekend, dit in tegenstelling tot gerenommeerde medische tijdschriften als The New England Journal of Medicine dan wel The Lancet.

Opvallend is dat aan de totstandkoming van de Corman-Drosten paper maar liefst negen personen gelieerd aan het RIVM als auteur hun inhoudelijke bijdrage hebben geleverd. In dit verband zijn te noemen de heer [5.1.2e], de heer [5.1.2e], mevrouw Daphne Mulders, de heer Bart Haagmans, de heer [5.1.2e], mevrouw [5.1.2e], mevrouw [5.1.2e], mevrouw [5.1.2e] en mevrouw [5.1.2e].

De Corman-Drosten paper beschrijft als zodanig het testprotocol om het COVID-19 virus in de praktijk te detecteren. Vaststaat dat de SARS-CoV2 PCR-test kits, die worden gebruikt om Nederlandse burgers te testen op de aanwezigheid van het COVID-19 virus, zijn ontworpen op basis van het beschreven protocol.

Peer review

Medio 2020 heeft dr. Pieter Borger, moleculair bioloog en PCR-deskundige, telefonisch contact opgenomen met een woordvoerder van het RIVM, de heer [5.1.2e]. Deze bracht hem in e-mail contact met de heer [5.1.2e] van het RIVM, zoals gezegd een van de auteurs van de Corman-Drosten paper. Op basis van zijn jarenlange wetenschappelijke achtergrond, is de heer Borger expert op het vlak van PCR-testen te noemen.

De reden waarom de heer Borger de heer Meijer had benaderd, was omdat hij na bestudering van de Corman-Drosten paper een aanzienlijke hoeveelheid wetenschappelijke gebreken ten aanzien van de paper had vastgesteld. Kort gezegd, kon de heer Borger zich niet voorstellen dat de paper door PCR-experts peer-reviewed was. Als editor van wetenschappelijke tijdschriften, is de heer Borger immers zelf bekend met peer review processen.

Het feit dat de paper op 22 januari 2020 door de heren Corman en Drosten bij Eurosurveillance was aangeboden en reeds een dag later als 'erkende wetenschap' door Eurosurveillance voor publicatie werd goedgekeurd, sterkte de heer Borger in zijn vermoeden dat peer review ten aanzien van de paper onmogelijk had plaatsgevonden. Een peer review van een wetenschappelijk artikel beslaat doorgaans immers een periode van enkele weken tot zelfs enkele maanden.

Opvallend is dat op het moment waarop de heer Borger bij de heer Meijer verifieerde of de Corman-Drosten paper voorafgaand aan goedkeuring en publicatie door Eurosurveillance peer-reviewed was, de heer Meijer zonder meer het contact met de heer Borger verbrak.

In reactie hierop heeft de heer Borger met dezelfde vraag dan maar rechtstreeks contact gezocht met Eurosurveillance, waarbij hij uiteindelijk is doorverwezen naar het eerder genoemde ECDC. Ook het ECDC weigerde om inhoudelijk op de vraag van de heer Borger in te gaan. In een kort mailbericht dat de heer Borger op 18 november 2020 van het ECDC in dit verband ontving werd aangegeven dat: *"Disclosure would undermine the purpose of scientific investigations"* en *"disclosure would seriously undermine the decision making process of the ECDC"*.



Opmerking verdient overigens dat de heren Corman en Drosten beiden zelf deel uitmaken van de editorial board van Eurosurveillance. Ook kunnen vraagetekens worden geplaatst bij enkele andere leden van deze editorial board, op grond van belangenverstrengelingen. Zo bevinden zich onder de leden de directeur en de wetenschappelijk adviseur van een bedrijf dat de PCR-testkits fabriceert en verkoopt. Deze PCR-testkits zijn gebaseerd op het Corman-Drosten protocol, waarbij verbazing wekt dat de verkoop hiervan reeds was gestart nog voordat de officiële publicatie van de Corman-Drosten paper überhaupt had plaatsgevonden.

U begrijpt dat de verkregen reacties op de vraag van de heer Borger, in combinatie met deze feitelijke situatie, op zijn minst vragen oproept. De heer Borger merkt in dit verband op dat het juist in het algemeen belang van het wetenschappelijk onderzoek is dat aantoonbaar een peer review van een dergelijke paper plaatsvindt en dat dit effectief kan worden aangetoond. Temeer gezien de 'gouden standaard' status die aan de Corman-Drosten paper in het kader van het testen bij COVID-19 wordt toegekend. Het is onbegrijpelijk dat deze paper (nog steeds) dermate in nevelen gehuld is. Aangezien de PCR-test wordt ingezet als diagnostisch middel met bijzonder verstrekkende gevolgen, zoals verplichte quarantaine, dient de betrouwbaarheid ervan onmiskenbaar vast te staan. Transparantie is hierbij een noodzakelijk vereiste.

Totdat het tegenbewijs daartoe wordt geleverd, dient het ervoor te worden gehouden dat de Corman-Drosten paper niet peer-reviewed is. Voor zover dit wel het geval zou zijn, kan dit onmogelijk op deugdelijke wijze hebben plaatsgevonden. In ieder geval blijkt uit alles dat Eurosurveillance hier bewust niets over vrijgeeft.

4

Voorts is merkwaardig dat de Corman-Drosten paper überhaupt dermate snel aan Eurosurveillance was aangeboden, te weten op een moment waarop nog slechts een zestal COVID-19 sterftegevallen bekend waren. Sterker nog, het Corman-Drosten protocol zoals geschetst in de paper is aantoonbaar ontwikkeld nog voordat men de beschikking had over het virus. Op dat moment was het virus niet geïsoleerd, was hierdoor niet eens duidelijk of het veronderstelde virus daadwerkelijk bestond en kon zodoende niet worden bepaald of het virus als oorzaak van een nieuwe ziekte kon worden bestempeld.

Pas een dag na publicatie van de Corman-Drosten paper, te weten op 24 januari 2020, publiceerden de plaatselijke Chinese wetenschappers² in The New England Journal of Medicine zelf voor het eerst een officieel artikel over het gedetecteerde coronavirus in Wuhan. Op dat moment had de Wereldgezondheidsorganisatie de virusuitbraak overigens nog niet uitgeroepen tot een 'Public Health Emergency of International Concern'. Op deze dag werd ook voor het eerst melding gemaakt van een virusdetectie in Europa (Frankrijk) en op deze dag kwam ook het Outbreak Management Team van het RIVM voor het eerst samen.

Computersimulatie

Dit werpt de vraag op hoe de Corman-Drosten paper dan precies tot stand is kunnen komen. In werkelijkheid heeft de heer Drosten vanuit zijn thuisbasis in Duitsland en derhalve vanop afstand in no time een theoretisch computermodel van de benodigde genetische code van het virus ontworpen. Hierbij heeft de heer Drosten zich louter gebaseerd op sociale mediaberichten (!) die leken te wijzen

² China Novel Coronavirus Investigating and Research Team.



op een nieuw klinisch beeld dat de schijn had van SARS. Overigens is het voorgaande eenvoudig af te leiden uit de inhoud van de Corman-Drosten paper zelf, nu hierin wordt vermeld:

"In the present case of 2019-nCoV, virus isolates or samples from infected patients have so far not become available to the international public health community. We report here on the establishment and validation of a diagnostic workflow for 2019-nCoV screening and specific confirmation, designed in absence of available virus isolates or original patient specimens. Design and validation were enabled by the close genetic relatedness to the 2003 SARS-CoV, and aided by the use of synthetic nucleic acid technology."

en

"Before public release of virus sequences from cases of 2019-nCoV, we relied on social media reports announcing detection of a SARS-like virus. We thus assumed that a SARS-related CoV is involved in the outbreak. We downloaded all complete and partial (if >400 nt) SARS-related virus sequences available in GenBank by 1 January 2020."

Oftewel, het beschreven testprotocol in de Corman-Drosten paper en hiermee de thans gebruikte PCR-test is aantoonbaar niet gestoeld op een echt virus dat geïsoleerd is uit een patiënt, dan wel op een grondig onderzocht klinisch beeld. Hooguit is aansluiting gezocht bij sociale mediaberichten, waaruit de detectie van een 'SARS-like' virus bleek te volgen. Deze gang van zaken geeft bijzonder te denken.

Wijziging testmethode

Toen in het najaar van 2020 de Nederlandse overheid een tweede coronagolf voorspelde, is de heer Borger zich opnieuw gaan verdiepen in de wijze waarop de PCR-test binnen Nederland wordt gebruikt. Met name kon de heer Borger niet rijmen dat enerzijds de zogeheten infection fatality rate (IFR) gedurende de periode april tot en met augustus 2020 aantoonbaar was gezakt tot de nullijn, welke nullijn in de periode augustus tot november 2020 aanhield, terwijl anderzijds volgens het RIVM het aantal positieve PCR-testresultaten structureel bleef stijgen.

Op basis van onderzoek bleek toen dat het RIVM de PCR-testmethodiek kennelijk naar eigen goeddunken had gewijzigd, hetgeen overigens later door het RIVM is bevestigd. Meer bepaald bestond de wijziging erin dat, daar waar de detectie van het Coronavirus aanvankelijk plaatsvond op basis van het testen van twee genen van de virusstreng, nog slechts met één gen werd getest. Oftewel, de PCR-test was aanzienlijk vereenvoudigd, uiteraard met gevolgen voor de testresultaten.

Hiernaast had het RIVM op of omstreeks 25 september 2020 in de richtlijn op haar website een wijziging aangebracht ten aanzien van het toetsingsmoment in verhouding tot de amplificatiecurve. Meer bepaald had zij het toetsingsmoment van een Ct-waarde van >30 verhoogd naar een Ct-waarde van >35. In de praktijk leidde deze verhoging ertoe dat in de testlaboratoria enkel nog boven de 35 cycli een beoordeling van de amplificatiecurve plaatsvond, met logischerwijs meer positieve PCR-testresultaten tot gevolg. Voorheen werden de PCR-testresultaten tussen de 30 en 35 cycli nog extra beoordeeld aan de hand van de curve.



Op de gerichte vraag van Tweede Kamerlid Wybren van Haga aan de heer De Jonge tijdens het Kamerdebat d.d. 14 oktober 2020, wat de precieze reden van deze wijziging was en op welk tijdstip de wijziging was doorgevoerd, volgde weinig meer dan dat de vraag van de heer Van Haga 'waanzinnig technisch ingewikkeld' van aard was en dat de heer De Jonge om die reden het antwoord schuldig diende te blijven. In de bijgevoegde schriftelijke toelichting van het RIVM (*) op deze vraag van de heer Van Haga, volgde dan weer het weinig zeggend antwoord:

"De tekst op de website is 25 september 2020 aangepast. De aanpassing is gemaakt om de laatste stand van zaken in ontwikkelingen van PCR-testen, andere type testen en ontwikkelingen op diagnostiek gebied te communiceren. De aanpassing van de waarschuwing Ct-waarde is gemaakt omdat de opgedane ervaring leert dat onder Ct 35 er geen twijfelcurves zijn."

Over de aanpassing in de wijziging in het aantal genen waarmee wordt getest, gaf het RIVM in haar schriftelijke toelichting nog aan:

"De aanpassing aan aantal target genen in PCR-testen en andere typen testen is gemaakt om het veranderde landschap aan beschikbare en gebruikte testen in Nederland te beschrijven."

Volgens de heer Borger is deze handelwijze van het RIVM hoe dan ook onbegrijpelijk en wetenschappelijk ontoelaatbaar. Bij het uitvoeren van een wetenschappelijke diagnostische test is immers van wezenlijk belang dat een standaard operationele procedure (SOP) wordt toegepast, dit om verzamelde data over een bepaalde periode op objectieve wijze met elkaar te kunnen vergelijken. Wordt op enig moment de procedure gewijzigd en gaat men hierdoor met andere detectiemethoden werken, dan is een dergelijk vergelijkingsproces niet meer mogelijk. Deze wijziging maakt volgens de heer Borger dat het wetenschappelijk onverantwoord is om op basis van de gebruikte PCR-test te stellen dat het aantal positieve testresultaten in het najaar van 2020 ten opzichte van de periode daarvoor zou zijn toegenomen. Nochtans is dit hetgeen de overheid haar burgers structureel heeft voorgehouden.

6

Retraction paper

In deze zelfde periode stelde de heer Borger binnen zijn internationaal wetenschappelijk netwerk vast dat meerdere academici en wetenschappers gelijkaardige bezwaren formuleerden ten aanzien van de inhoud van de Corman-Drosten paper. Deze academici en wetenschappers beschikken op basis van hun achtergrond over diepgaande kennis ten aanzien van PCR-testen. Onder hen bevindt zich zelfs de heer ^{5.1.2e} Yeadon, voormalig Chief of Science van het farmaceutisch bedrijf Pfizer, nota bene een van de huidige COVID-19 vaccinfabrikanten.

Gezien hun toenemende kritiek op de inhoud van de Corman-Drosten paper, hebben een aantal van deze wetenschappers gezamenlijk op 1 december 2020 een zogeheten Retraction paper (*) ingediend bij Eurosurveillance. Op basis van deze Retraction paper³ hebben zij Eurosurveillance dringend verzocht om de publicatie van de Corman-Drosten paper vanwege haar vele gebreken in te trekken.

³External peer review of the RTPCR test to detect SARS-CoV2 reveals 10 major scientific flaws at the molecular and methodological level: consequences for false positive results'



Aan dit intrekingsverzoek heeft Eurosurveillance geen gevolg gegeven. Op 4 februari 2021 heeft Eurosurveillance ter zake een officiële reactie gepubliceerd. In haar reactie geeft zij aan dat peer-review van de Corman-Drosten paper vanwege de tijdsdruk via een zeer versnelde procedure had plaatsgevonden⁴. Naar eigen zeggen was peer-review niettemin in afdoende mate op de inhoud van de paper toegepast. Ook stelde Eurosurveillance zonder noemenswaardige toelichting geen enkele aanleiding te zien om te kunnen spreken van belangenverstremming binnen haar editorial board. Om deze redenen zag Eurosurveillance geen reden om de paper in te trekken.

Het meest opmerkelijk is evenwel dat Eurosurveillance op geen enkele wijze inhoudelijk is ingegaan op de geuite wetenschappelijke kritiek ten aanzien van de paper. Dit zou men toch op zijn minst hebben verwacht. Hooguit werd door Eurosurveillance gesteld dat *'het door de heer Corman e.a. gepubliceerd artikel wetenschappelijk toereikend was voor het doel ervan en voor de beperkte gegevens die in dat vroege stadium van de COVID-19-pandemie beschikbaar waren'*.

U zult het ongetwijfeld met cliënten eens zijn dat de weinige mate aan transparantie ten aanzien van de Corman-Drosten paper en het hoge 'de slager keurt zijn eigen vlees' gehalte de betrouwbaarheid van het binnen Nederland gehanteerd testprotocol zoals gebaseerd op deze paper geen goed doet.

Gebrekkige toepassing PCR-test

De heer Borger en de andere academici en wetenschappers stellen zich op het standpunt dat de Corman-Drosten paper maar liefst tien wezenlijke gebreken kent, waarvan enkele gebreken zelfs ernstig te noemen zijn. Deze gebreken zijn veeleer wetenschap-technisch van aard en staan allen gedetailleerd beschreven in de Retraction paper. Hierbij wordt opgemerkt dat na de indiening van de Retraction paper nog meer gebreken ten aanzien van de Corman-Drosten paper zijn vastgesteld.

7

Gesteld wordt dat de PCR-testmethodiek op zichzelf beschouwd als een goede wetenschappelijke testmethode kan gelden. Daarentegen zijn zij het unaniem erover eens dat de wijze waarop de PCR-test thans binnen Nederland en daarbuiten in de praktijk wordt toegepast volstrekt ongeschikt is om succesvol COVID-19 bij mensen vast te stellen. Eenvoudig gesteld, is het onduidelijk wat de PCR-test bij het huidige gebruik ervan precies detecteert.

Ter zake merken cliënten op dat de oorspronkelijk uitvinder en ontwikkelaar van de PCR-test, de heer Kary Mullis, zelf steeds erop gewezen heeft dat de PCR-test als een uiterst gevoelig laboratorium-instrument dient te worden beschouwd. Volgens de heer Mullis is de PCR-test bovendien slechts een techniek die bedoeld om genetisch materiaal te vermeerderen met het oog op vervolgentoelichting, niets meer of minder. Deze test heeft deze nooit tot doel gehad om als diagnostisch instrument virussen of infecties vast te stellen.

Een van de vastgestelde gebreken bestaat erin dat bij het huidige gebruik van de PCR-test om het COVID-19 virus te detecteren gebruik wordt gemaakt van niet-specifieke primers en probes. Hiernaast geldt dat de gebruikte primerconcentratie aantoonbaar vier tot vijf keer te hoog is, terwijl het van belang is dat wordt uitgegaan van een juiste primerconcentratie. Ook geldt dat bij twee tot drie van

⁴ Zoals gezegd, was op dat moment volgens de WHO nog helemaal geen sprake van een urgente gezondheidsbedreigende situatie en binnen Europa was nog geen virus gedetecteerd.



de in totaal zes bestaande primers het GC-gehalte beduidend te laag is; het juiste GC-gehalte behoort tussen de 40 en 60 procent te liggen, terwijl bij de gebruikte primers het GC gehalte tussen de 28 en 34 procent blijkt te liggen. Reeds deze enkele feiten maken dat de PCR-test gebaseerd is op een slecht wetenschappelijk ontwerp.

Voorts geldt dat binnen een primerpaar het temperatuurverschil hooguit een tot twee graden mag bedragen. Bij de huidige PCR-test bedraagt het temperatuurverschil bij een van de belangrijke genen circa tien graden. De heer Borger stelt dat hij vermoedt dat het RIVM onder meer om deze reden één gen, te weten dit betreffend gen, uit de PCR-test heeft verwijderd.

Zo ook is van belang dat ten aanzien van het COVID-19 virus de gehele RNA streng wordt onderzocht, dit om vast te stellen of men te maken heeft met de gehele streng en niet slechts met fragmenten ervan. Via de huidige PCR-testmethodiek worden onvoldoende delen van het virus gedetecteerd om te kunnen vaststellen of het daadwerkelijk het COVID-19 virus betreft.

Om de aanwezigheid van het COVID-19 virus te detecteren is verder van belang dat een negatieve controle wordt toegepast, ingevolge waarvan de mogelijkheid dat andere coronavirussen worden gedetecteerd wordt uitgesloten. Ook deze exclusie vindt bij de huidige PCR-testmethodiek niet plaats.

Zoals eerder gesteld, heeft het RIVM hiernaast eigenhandig het aantal cycli verhoogd van >30 naar >35. Afgezien van het feit dat het wetenschappelijk niet toelaatbaar is om 'tijdens het spel zomaar de spelregels te wijzigen', kan ingeval van 35 cycli of meer een infectueus virus nauwelijks nog gedetecteerd worden. Dit is wetenschappelijk aangetoond.

8

Tot slot geeft de PCR-test zowel vals positieve als vals negatieve uitslagen, als gevolg waarvan het van belang is dat in ieder geval bij een positieve testuitslag een tweede en bij voorkeur een derde PCR-test plaatsvindt om fouten uit te sluiten.

Ook onder meer Drs. 5.1.2e, biochemicus gespecialiseerd in de moleculaire genetica, heeft eerder al via de Tweede Kamer zijn ernstige bezwaren geuit ten aanzien van het huidig testbeleid. De heer Ortiz Buijsse stelt dat in Nederland het PCR-testbeleid aldus plaatsvindt dat grote delen van de bevolking lukraak worden gescreend om na te gaan of zij 'besmet' zijn. Volgens hem is de wijze waarop de PCR-techniek daartoe wordt ingezet en geïnterpreteerd aantoonbaar onjuist.

Allereerst geldt volgens hem dat de PCR-test slechts bij hooguit 1 tot 2% van alle geteste personen leidt tot een 'positief' testresultaat. Op zich is het reeds opmerkelijk te noemen dat alle doorgevoerde coronamaatregelen louter op een dergelijk klein percentage gestoeld zijn.

Bij deze positief geteste personen wordt enkel de aanwezigheid van een brokstukje dood genetisch materiaal van het virus (viraal RNA) in het neusslijmvlies aangetroffen. Hoewel de kans laag is, valt niet uit te sluiten dat een positief PCR-testresultaat het gevolg is van een aangetroffen brokstukje van een ander verwant virus. Waar men ook op bedacht moet zijn, is dat dit brokstukje genetisch materiaal vanwege legio oorzaken al weken tot maanden lang in het lichaam van de betreffende persoon aanwezig kan zijn. De kans is bijgevolg reëel dat deze persoon al lang niet meer besmet is. Zo geldt ook



dat op het moment waarop het RNA brokstukje wordt aangetroffen, niet bekend is of het virus in staat is om zich te repliceren.

Ondanks dat deze conclusie wel steevast door het RIVM en in haar kielzog de Nederlandse overheid wordt getrokken, houdt een enkele positieve PCR-testuitslag niet in dat de betreffende geteste persoon ook daadwerkelijk klinisch is geïnfecteerd, besmettelijk is, ziek is dan wel ziek gaat worden. Deze persoon kan perfect gezond zijn en verder is de kans reëel dat dezelfde persoon bij een tweede PCR-test een negatieve testuitslag kent. Volgens de heer Ortiz stelt de PCR-test ons eenvoudigweg niet in staat om dergelijke conclusies hieraan te verbinden.

Om dit te kunnen bepalen, zijn extra klinische parameters oftewel aanvullende medische onderzoeken door een (huis)arts nodig. Aangetoond dient immers te worden dat de betreffende persoon ook daadwerkelijk actief levend virus in zich draagt. De arts verricht daartoe symptomatisch onderzoek en kan bijvoorbeeld nagaan of er sprake is van voldoende saturatie, van koorts of van andere symptomen die aan COVID-19 gerelateerd zijn.

Overigens heeft de heer Van Dissel namens het RIVM zelf meermaals de noodzaak erkend van het doen plaatsvinden van bijkomend klinisch onderzoek ingeval van een positieve PCR-testuitslag, ter vaststelling of de positief getest persoon ook effectief drager is van actief virus. Ter zake verwijs ik u naar de mondeling verstrekte antwoorden door de heer van Dissel op de vragen van Tweede Kamerlid Wybren van Haga tijdens de Technische Briefing d.d. 16 december 2020⁵.

9

Ook de heer Van Dissel erkent dat de PCR-test louter vaststelt of genetisch materiaal van het virus in het lichaam van een persoon aanwezig is en dat deze test niet per definitie aantoont dat deze persoon drager is van levend virus. Ook toont de test naar zijn zeggen niet aan dat een persoon drager is van levend virus waar men ziek van wordt. Bovendien stelt de heer Van Dissel dat het weinig zinvol is om personen die geen symptomen vertonen of klachten ervaren te testen, omdat dan 'vaak moeilijk te interpreteren valt wat er dan speelt'. In dit verband verwijs ik u naar de mondeling verstrekte antwoorden door de heer van Dissel op de vragen van Tweede Kamerlid Wybren van Haga tijdens de Technische Briefing d.d. 22 augustus 2020⁶.

In dit verband merken cliënten op dat ook de Wereldgezondheidsorganisatie aantoonbaar meermaals heeft aangegeven dat de PCR-test slechts als *hulp*middel bij de diagnose van COVID-19 dient te worden ingezet en dat elk resultaat van de test gecombineerd dient te worden met klinische observatie⁷. Dat de overheid aan dit advies geen gevolg geeft, terwijl zij op andere vlakken aantoonbaar wel de adviezen van de Wereldgezondheidsorganisatie volgt is merkwaardig.

Waar het huidige Coronabeleid ook eenvoudig overheen stapt, is dat het massaal testen van mensen onmiskenbaar leidt tot statistische fouten. Dit als gevolg van het feit dat de PCR-test in de specificiteit een foutmarge van 1-2% kent, wat niet valt te betwisten. Ter illustratie merkt de heer Ortiz Buisse op dat ingeval gedurende een week 200.000 mensen met de PCR-test worden getest, hierdoor sprake zal

⁵ Terug te zien via de YouTube video <https://www.youtube.com/watch?v=kijqhLQpAFw>

⁶ Terug te zien via de YouTube video <https://www.youtube.com/watch?v=ROF5UNdfq8k>.

⁷ 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.



zijn van 4.000 (!) vals positieven. Oftewel 4.000 mensen die hierdoor onterecht in quarantaine worden geplaatst, met alle gevolgen van dien.

Evenals de heer Borger, werpt ook de heer Ortiz Buijsse op dat het wetenschappelijk ontoelaatbaar is dat het RIVM van de ene op de andere dag in haar richtlijn de CT waarde van >30 verhoogt naar >35 en hiermee zomaar het testbeleid aanpast. Sowieso geldt dat de diverse testlaboratoria ook nog eens verschillend van elkaar de PCR-test toepassen, elk volgens hun eigen testprotocol. Met andere woorden, er geldt geen algemeen aanvaardbaar standaard protocol voor de beoordeling van de PCR-test om te concluderen of een persoon positief is.

Aanvullend stelt de heer Ortiz Buijsse dat de huidige coronamaatregelen uitsluitend worden gebaseerd op angst. Hierbij wordt door de overheid onterecht gebruik gemaakt van de term 'besmettingen' en ook worden toenames in de positieve PCR-testresultaten in de vorm van absolute aantallen aan de bevolking gepresenteerd. Dit doorgaans na opgeschaald testbeleid binnen de GGD (in het kader waarvan ons kantoor over een betrouwbare getuigenverklaring beschikt). Voor de burger is hierdoor niet bekend hoeveel personen precies zijn getest en derhalve hoe de genoemde aantallen te begrijpen zijn. Bovendien is de eerder geschetste foutmarge van de PCR-test niet in de genoemde aantallen verdisconteerd. Oftewel, het werkelijk aantal PCR-positief geteste personen ligt sowieso lager dan hetgeen gerapporteerd en gecommuniceerd wordt. Het feit dat de overheid haar burgers op deze wijze willens en wetens op het verkeerde been zet, is bijzonder kwalijk te noemen.

Conclusie: PCR-testresultaten vormen geen basis voor coronamaatregelen

In de situatie waarbij gebruik wordt gemaakt van een PCR-test die:

10

- aantoonbaar gebaseerd is op een ernstig gebrekkig onderliggend testprotocol (Corman-Drosten);
- in het beste geval slechts in staat is om een dood brokstukje RNA van een virus bij een persoon te detecteren;
- niet uitsluit dat dit aangetroffen brokstukje RNA afkomstig is van een ander verwant virus;
- ter detectie van dit brokstukje virus-RNA onderhevig is aan wetenschappelijk ontoelaatbare doorgevoerde wijzigingen in het testbeleid;
- op meerdere foutieve wijzen in de praktijk wordt toegepast;
- op verschillende wijzen door de diverse testlaboratoria conform hun eigen testprotocol wordt gebruikt;
- überhaupt niet aantoont of de betreffende persoon daadwerkelijk besmet, besmettelijk, ziek is of ziek gaat worden en dit vanuit haar aard ook niet kan;
- niet gepaard gaat met klinisch onderzoek door een arts die het voorgaande dient vast te stellen;

werpt zich de vraag op: waar is de overheid eigenlijk mee bezig?

Cliënten stellen dat de enige gerechtvaardigde conclusie die hieruit kan worden getrokken is dat geen enkele betrouwbare wetenschappelijke waarde kan en mag worden toegekend aan de testresultaten die uit het huidig gebruik van de PCR-test voortvloeien. Om diezelfde reden kunnen de gerapporteerde en gecommuniceerde positieve PCR-testresultaten op geen enkele wijze als basis dienen voor het gevoerde coronabeleid door de overheid.



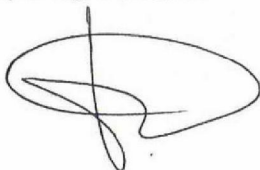
Bijgevolg verzoeken en, voor zover nodig, sommeren wij namens cliënten het Ministerie van VWS en het RIVM om het huidige gebruik van de PCR-test ter detectie van COVID-19 per omgaand te staken, althans het gebruik ervan op zijn minst gepaard te laten gaan met standaard klinisch onderzoek door een arts. Deze arts kan alsdan per patiënt deugdelijk vaststellen of ingeval van een positief verkregen PCR-testresultaat op basis van de eventuele symptomen daadwerkelijk sprake is van COVID-19. Dit leidt tot aanzienlijk betrouwbaardere uitkomsten dan thans het geval is.

Voorts verzoeken en, voor zover nodig, sommeren wij namens cliënten het Ministerie van VWS en het RIVM om haar huidige misleidende communicatie ten aanzien van de 'besmettingscijfers' zodanig te wijzigen dat hierover bij de burgers een correct beeld bestaat en de onnodig gecreëerde angstcultuur achterwege blijft.

Graag vernemen wij binnen een termijn van 7 dagen na heden uw bevestiging daartoe, alsook vernemen wij dan graag uw toelichting op de wijze waarop hieraan praktisch uitvoering zal worden gegeven. Bij gebreke hiervan hebben wij opdracht van cliënten om over te gaan tot het treffen van rechtsmaatregelen, in welk geval de onderste steen zal worden bovengehaald. Een verzoek aan de rechtbank tot het doen plaatsvinden van een (voorlopig) getuigen- en deskundigenverhoor over het gebrekkige PCR-testbeleid sluiten wij dan niet uit.

Namens cliënten behouden wij ons alle rechten en wren voor.

Met vriendelijke groet,
Open Legal Advocaten



Niels Vanaken
Advocaat



Edo Sweebe
Advocaat

(*) Bijlagen



RESEARCH






Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR

Victor M Corman¹, Olfert Landt², Marco Kaiser³, Richard Molenkamp⁴, Adam Meijer⁵, Daniel KW Chu⁶, Tobias Bleicker¹, Sebastian Brünink¹, Julia Schneider¹, Marie Luisa Schmidt¹, Daphne GJC Mulders⁴, Bart L Haagmans⁴, Bas van der Veer³, Sharon van den Brink⁵, Lisa Wijsman⁵, Gabriel Goderski⁵, Jean-Louis Romette⁷, Joanna Ellis⁸, Maria Zambon⁸, Malik Peiris⁸, Herman Goossens⁹, Chantal Reusken⁵, Marion PG Koopmans⁴, Christian Drosten¹

1. Charité – Universitätsmedizin Berlin Institute of Virology, Berlin, Germany and German Centre for Infection Research (DZIF), Berlin, Germany
2. Tib-Molbiol, Berlin, Germany
3. GenExpress GmbH, Berlin, Germany*
4. Department of Viroscience, Erasmus MC, Rotterdam, the Netherlands
5. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands
6. University of Hong Kong, Hong Kong, China
7. Université d Aix-Marseille, Marseille, France
8. Public Health England, London, United Kingdom
9. Department of Medical Microbiology, Vaccine and Infectious Diseases Institute, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

Correspondence:    @charite.de

Citation style for this article:

Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp  Adam, Chu Daniel KW,  Brünink Sebastian, 
 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,  Reusken Chantal,  PG,  L. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

Article submitted on 21 Jan 2020 / accepted on 22 Jan 2020 / published on 23 Jan 2020

Background: The ongoing outbreak of the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) poses a challenge for public health laboratories as virus isolates are unavailable while there is growing evidence that the outbreak is more widespread than initially thought, and international spread through travellers does already occur. **Aim:** We aimed to develop and deploy robust diagnostic methodology for use in public health laboratory settings without having virus material available. **Methods:** Here we present a validated diagnostic workflow for 2019-nCoV, its design relying on close genetic relatedness of 2019-nCoV with SARS coronavirus, making use of synthetic nucleic acid technology. **Results:** The workflow reliably detects 2019-nCoV, and further discriminates 2019-nCoV from SARS-CoV. Through coordination between academic and public laboratories, we confirmed assay exclusivity based on 297 original clinical specimens containing a full spectrum of human respiratory viruses. Control material is made available through European Virus Archive – Global (EVAg), a European Union infrastructure project. **Conclusion:** The present study demonstrates the enormous response capacity achieved through coordination of academic and public laboratories in national and European research networks.

Introduction

According to the World Health Organization (WHO), the WHO China Country Office was informed of cases of pneumonia of unknown aetiology in Wuhan City, Hubei Province, on 31 December 2019 [1]. A novel coronavirus currently termed 2019-nCoV was officially announced

as the causative agent by Chinese authorities on 7 January. A viral genome sequence was released for immediate public health support via the community online resource virological.org on 10 January (Wuhan-Hu-1, GenBank accession number MN908947 [2]), followed by four other genomes deposited on 12 January in the viral sequence database curated by the Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID). The genome sequences suggest presence of a virus closely related to the members of a viral species termed severe acute respiratory syndrome (SARS)-related CoV, a species defined by the agent of the 2002/03 outbreak of SARS in humans [3,4]. The species also comprises a large number of viruses mostly detected in rhinolophid bats in Asia and Europe.

As at 20 January 2020*, 282 laboratory-confirmed human cases have been notified to WHO [5]. Confirmed cases in travellers from Wuhan were announced on 13 and 17 January in Thailand as well as on 15 January in Japan and 19 January in Korea. The extent of human-to-human transmission of 2019-nCoV is unclear at the time of writing of this report but there is evidence of some human-to-human transmission.

Among the foremost priorities to facilitate public health interventions is reliable laboratory diagnosis. In acute respiratory infection, RT-PCR is routinely used to detect causative viruses from respiratory secretions. We have previously demonstrated the feasibility of introducing robust detection technology based on real-time RT-PCR in public health laboratories during international

TABLE 1***

Primers and probes, real-time RT-PCR for 2019 novel coronavirus

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence ^a	Concentration ^b
RdRP gene	RdRp_SARs-F	GTGARATGGTCATGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARs-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV. Use 100 nM per reaction and mix with P1
	RdRp_SARs-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_SARs-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-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 200 nM per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 800 nM per reaction

^a 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.

health emergencies by coordination between public and academic laboratories [6-12]. In all of these situations, virus isolates were available as the primary substrate for establishing and controlling assays and assay performance.

In the present case of 2019-nCoV, virus isolates or samples from infected patients have so far not become available to the international public health community. We report here on the establishment and validation of a diagnostic workflow for 2019-nCoV screening and specific confirmation, designed in absence of available virus isolates or original patient specimens. Design and validation were enabled by the close genetic relatedness to the 2003 SARS-CoV, and aided by the use of synthetic nucleic acid technology.

Methods

Clinical samples and coronavirus cell culture supernatants for initial assay evaluation

Cell culture supernatants containing typed coronaviruses and other respiratory viruses were provided by Charité and University of Hong Kong research laboratories. Respiratory samples were obtained during 2019 from patients hospitalised at Charité medical centre and tested by the NxTAG respiratory pathogen panel (Luminex, S' Hertogenbosch, The Netherlands) or in cases of MERS-CoV by the MERS-CoV upE assay as published before [10]. Additional samples were selected from biobanks at the Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven, at Erasmus University Medical Center, Rotterdam, at Public Health England (PHE), London, and at the University of Hong Kong. Samples from all collections

comprised sputum as well as nose and throat swabs with or without viral transport medium.

Faecal samples containing bat-derived SARS-related CoV samples (identified by GenBank accession numbers) were tested: KC633203, Betacoronavirus BtCoV/Rhi_eur/BB98-98/BGR/2008; KC633204, Betacoronavirus BtCoV/Rhi_eur/BB98-92/BGR/2008; KC633201, Betacoronavirus BtCoV/Rhi_bla/BB98-22/BGR/2008; GU190221 Betacoronavirus Bat coronavirus BR98-19/BGR/2008; GU190222 Betacoronavirus Bat coronavirus BM98-01/BGR/2008; GU190223, Betacoronavirus Bat coronavirus BM98-13/BGR/2008. All synthetic RNA used in this study was photometrically quantified.

RNA extraction

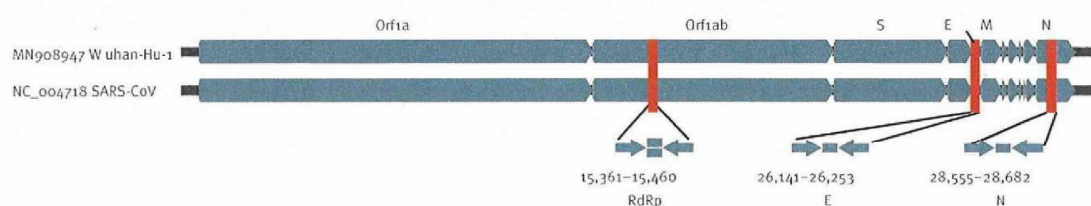
RNA was extracted from clinical samples with the MagNA Pure 96 system (Roche, Penzberg, Germany) and from cell culture supernatants with the viral RNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

Real-time reverse-transcription PCR

A 25 µL reaction contained 5 µL of RNA, 12.5 µL of 2 × reaction buffer provided with the Superscript III one step RT-PCR system with Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, Darmstadt, Germany; containing 0.4 mM of each deoxyribontriphosphates (dNTP) and 3.2 mM magnesium sulphate), 1 µL of reverse transcriptase/Taq mixture from the kit, 0.4 µL of a 50 mM magnesium sulphate solution (Invitrogen), and 1 µg of nonacetylated bovine serum albumin (Roche). Primer and probe sequences, as well as optimised concentrations are shown in Table 1. All oligonucleotides were synthesised and provided by Tib-Molbiol (Berlin,

FIGURE 1

Relative positions of amplicon targets on the SARS coronavirus and the 2019 novel coronavirus genome



E: envelope protein gene; M: membrane protein gene; N: nucleocapsid protein gene; ORF: open reading frame; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase gene; S: spike protein gene.

Numbers below amplicons are genome positions according to SARS-CoV, GenBank NC_004718.

Germany). Thermal cycling was performed at 55°C for 10 min for reverse transcription, followed by 95°C for 3 min and then 45 cycles of 95°C for 15 s, 58°C for 30 s. Participating laboratories used either Roche Light Cycler 480II or Applied Biosystems ViiA7 instruments (Applied Biosystems, Hong Kong, China).

Protocol options and application notes

Laboratories participating in the evaluation used the TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher) with the same oligonucleotide concentrations and cycling conditions. The QIAGEN One-Step RT-PCR Kit was also tested and found to be compatible.

The intended cross-reactivity of all assays with viral RNA of SARS-CoV allows us to use the assays without having to rely on external sources of specific 2019-nCoV RNA.

For a routine workflow, we recommend the E gene assay as the first-line screening tool, followed by confirmatory testing with the RdRp gene assay. Application of the RdRp gene assay with dual colour technology can discriminate 2019-nCoV (both probes positive) from SARS-CoV RNA if the latter is used as positive control. Alternatively, laboratories may choose to run the RdRp assay with only the 2019-nCoV-specific probe.

Ethical statement

The internal use of samples for diagnostic workflow optimisation was agreed under the medical ethical rules of each of the participating partners.

Results

Before public release of virus sequences from cases of 2019-nCoV, we relied on social media reports announcing detection of a SARS-like virus. We thus assumed that a SARS-related CoV is involved in the outbreak. We downloaded all complete and partial (if >400 nt) SARS-related virus sequences available in GenBank by 1 January 2020. The list (n = 729 entries) was manually checked and artificial sequences (laboratory-derived,

synthetic, etc), as well as sequence duplicates were removed, resulting in a final list of 375 sequences. These sequences were aligned and the alignment was used for assay design (Supplementary Figure S1). Upon release of the first 2019-nCoV sequence at virological.org, three assays were selected based on how well they matched to the 2019-nCoV genome (Figure 1). The alignment was complemented by additional sequences released independently on GISAID (<https://www.gisaid.org>), confirming the good matching of selected primers to all sequences. Alignments of primer binding domains with 2019-nCoV, SARS-CoV as well as selected bat-associated SARS-related CoV are shown in Figure 2.

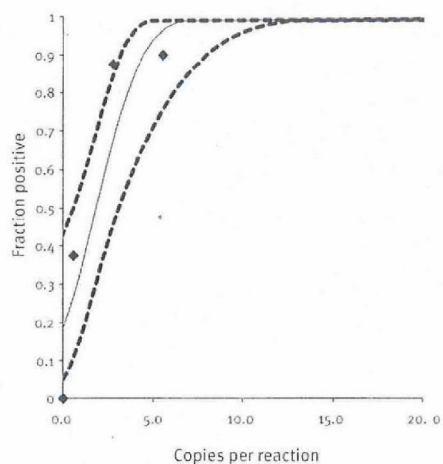
Assay sensitivity based on SARS coronavirus virions

To obtain a preliminary assessment of analytical sensitivity, we used purified cell culture supernatant containing SARS-CoV strain Frankfurt-1 virions grown on Vero cells. The supernatant was ultrafiltered and thereby concentrated from a ca 20-fold volume of cell culture supernatant. The concentration step simultaneously reduces the relative concentration of background nucleic acids such as not virion-packaged viral RNA. The virion preparation was quantified by real-time RT-PCR using a specific in vitro-transcribed RNA quantification standard as described in Drosten et al. [8]. All assays were subjected to replicate testing in order to determine stochastic detection frequencies at each assay's sensitivity end point (Figure 3A and B). All assays were highly sensitive, with best results obtained for the E gene and RdRp gene assays (5.2 and 3.8 copies per reaction at 95% detection probability, respectively). These two assays were chosen for further evaluation. One of the laboratories participating in the external evaluation used other basic RT-PCR reagents (TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix) and repeated the sensitivity study, with equivalent results (E gene: 3.2 RNA copies/reaction (95% CI: 2.2–6.8); RdRp: 3.7 RNA copies/reaction (95% CI: 2.8–8.0). Of note, the N gene assay also performed well but was not subjected

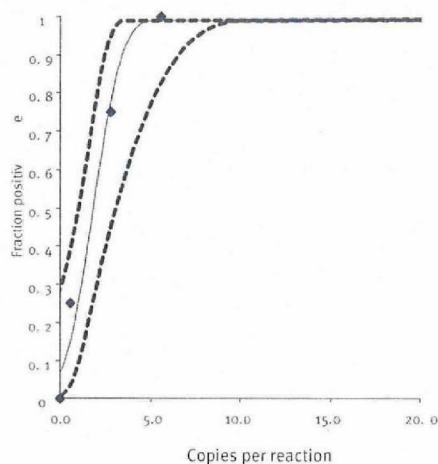
FIGURE 3

Determination of limits of detection based on SARS coronavirus genomic RNA and 2019 novel coronavirus-specific in vitro transcribed RNA

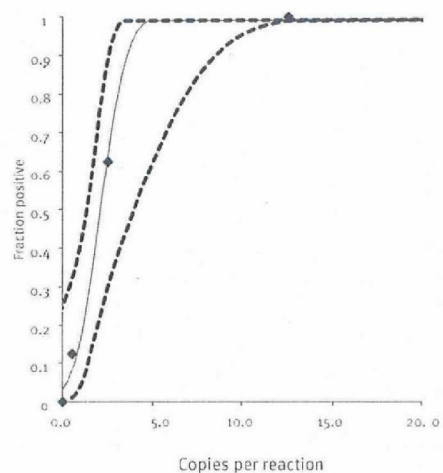
A. E gene assay vs SARS-CoV: 5.2 c/r (95% CI: 3.7–9.6)



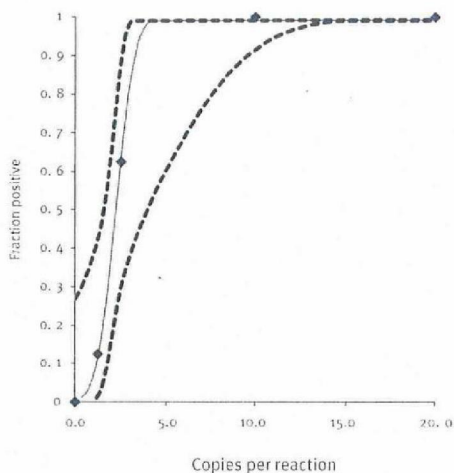
B. RdRp gene assay vs SARS-CoV: 3.8 c/r (95% CI: 2.7–7.6)



C. E gene assay vs 2019-nCoV IVT RNA: 3.9 c/r (95% CI: 2.8–9.8)



D. RdRp assay vs 2019-nCoV IVT RNA: 3.6 c/r (95% CI: 2.7–11.2)



CI: confidence intervals; c/r: copies per reaction; IVT: in vitro-transcribed RNA.

A: E gene assay, evaluated with SARS-CoV genomic RNA. B: RdRp gene assay evaluated with SARS-CoV genomic RNA. C: E-gene assay, evaluated with 2019-nCoV-specific in vitro-transcribed RNA standard. D: RdRp gene assay evaluated with 2019-nCoV-specific in vitro-transcribed RNA standard.

The x-axis shows input RNA copies per reaction. The y-axis shows positive results in all parallel reactions performed, squares are experimental data points resulting from replicate testing of given concentrations (x-axis) in parallel assays (eight replicate reactions per point).

Technical limits of detection are given in the panels headings. The inner line is a probit curve (dose-response rule). The outer dotted lines are 95% CI.

TABLE 2

Tests of known respiratory viruses and bacteria in clinical samples and cell culture preparations for cross-reactivity in 2019 novel coronavirus E and RdRp gene assays (n = 310)

Clinical samples with known viruses	Clinical samples ^a	Virus isolates ^b
HCoV-HKU1	14	1 ^c
HCoV-OC43	16	2 ^d
HCoV-NL63	14	1 ^e
HCoV-229E	18	2 ^f
MERS-CoV	5	1 ^g
Influenza A(H1N1)pdm09	17	1
Influenza A(H3N2)	16	1
Influenza A (untyped)	11	NA
Influenza A(H5N1)	1	1
Influenza A(H7N9)	0	1
Influenza B (Victoria or Yamagata)	31	1
Rhinovirus/enterovirus	31	NA
Respiratory syncytial virus (A/B)	33	NA
Parainfluenza 1 virus	12	NA
Parainfluenza 2 virus	11	NA
Parainfluenza 3 virus	14	NA
Parainfluenza 4 virus	11	NA
Human metapneumovirus	16	NA
Adenovirus	13	1
Human bocavirus	6	NA
<i>Legionella</i> spp.	3	NA
<i>Mycoplasma</i> spp.	4	NA
Total clinical samples	297	NA

^a For samples with multiple viruses detected, the virus with highest concentration is listed, as indicated by real-time PCR Ct value.

^b Directly quantified or spiked in human negative-testing sputum.

^c 1×10^6 RNA copies/mL, determined by specific real-time RT-PCR. Isolated from human airway epithelial culture.

^d 1×10^{10} RNA copies/mL, determined by specific real-time RT-PCR of one isolate. The other isolate was not quantified but spiked in human negative-testing sputum.

^e 4×10^9 RNA copies/mL, determined by specific real-time RT-PCR.

^f 3×10^9 RNA copies/mL, determined by specific real-time RT-PCR of one isolate. The other isolate was not quantified spiked in human negative-testing sputum.

^g 2.1×10^6 RNA copies/mL, determined by specific real-time RT-PCR.

signals, all assays were tested 120 times in parallel with water and no other nucleic acid except the provided oligonucleotides. In none of these reactions was any positive signal detected.

Cross-reactivity with other coronaviruses

Cell culture supernatants containing all endemic human coronaviruses (HCoV)229E, NL63, OC43 and HKU1 as well as MERS-CoV were tested in duplicate in all three assays (Table 2). For the non-cultivable HCoV-HKU1, supernatant from human airway culture was used. Viral RNA concentration in all samples was determined by specific real-time RT-PCRs and in vitro-transcribed RNA

standards designed for absolute quantification of viral load. Additional undiluted (but not quantified) cell culture supernatants were tested as summarised in Table 2. These were additionally mixed into negative human sputum samples. None of the tested viruses or virus preparations showed reactivity with any assay.

Exclusivity of 2019 novel coronavirus based on clinical samples pre-tested positive for other respiratory viruses
Using the E and RdRp gene assays, we tested a total of 297 clinical samples from patients with respiratory disease from the biobanks of five laboratories that provide diagnostic services (one in Germany, two in the Netherlands, one in Hong Kong, one in the UK). We selected 198 samples from three university medical centres where patients from general and intensive care wards as well as mainly paediatric outpatient departments are seen (Germany, the Netherlands, Hong Kong). The remaining samples were contributed by national public health services performing surveillance studies (RIVM, PHE), with samples mainly submitted by practitioners. The samples contained the broadest range of respiratory agents possible and reflected the general spectrum of virus concentrations encountered in diagnostic laboratories in these countries (Table 2). In total, this testing yielded no false positive outcomes. In four individual test reactions, weak initial reactivity was seen but they were negative upon retesting with the same assay. These signals were not associated with any particular virus, and for each virus with which initial positive reactivity occurred, there were other samples that contained the same virus at a higher concentration but did not test positive. Given the results from the extensive technical qualification described above, it was concluded that this initial reactivity was not due to chemical instability of real-time PCR probes but most probably to handling issues caused by the rapid introduction of new diagnostic tests and controls during this evaluation study.

Discussion

The present report describes the establishment of a diagnostic workflow for detection of an emerging virus in the absence of physical sources of viral genomic nucleic acid. Effective assay design was enabled by the willingness of scientists from China to share genome information before formal publication, as well as the availability of broad sequence knowledge from ca 15 years of investigation of SARS-related viruses in animal reservoirs. The relative ease with which assays could be designed for this virus, in contrast to SARS-CoV in 2003, proves the huge collective value of descriptive studies of disease ecology and viral genome diversity [8,15-17].

Real-time RT-PCR is widely deployed in diagnostic virology. In the case of a public health emergency, proficient diagnostic laboratories can rely on this robust technology to establish new diagnostic tests within their routine services before pre-formulated assays become available. In addition to information on

reagents, oligonucleotides and positive controls, laboratories working under quality control programmes need to rely on documentation of technical qualification of the assay formulation as well as data from external clinical evaluation tests. The provision of control RNA templates has been effectively implemented by the EVAg project that provides virus-related reagents from academic research collections [18]. SARS-CoV RNA was retrievable from EVAg before the present outbreak; specific products such as RNA transcripts for the here-described assays were first retrievable from the EVAg online catalogue on 14 January 2020 (<https://www.european-virus-archive.com>). Technical qualification data based on cell culture materials and synthetic constructs, as well as results from exclusivity testing on 75 clinical samples, were included in the first version of the diagnostic protocol provided to the WHO on 13 January 2020. Based on efficient collaboration in an informal network of laboratories, these data were augmented within 1 week comprise testing results based on a wide range of respiratory pathogens in clinical samples from natural infections. Comparable evaluation studies during regulatory qualification of in vitro diagnostic assays can take months for organisation, legal implementation and logistics and typically come after the peak of an outbreak has waned. The speed and effectiveness of the present deployment and evaluation effort were enabled by national and European research networks established in response to international health crises in recent years, demonstrating the enormous response capacity that can be released through coordinated action of academic and public laboratories [18-22]. This laboratory capacity not only supports immediate public health interventions but enables sites to enrol patients during rapid clinical research responses.

*Author's correction

The sentence As at 20 January 2020, 282 laboratory-confirmed human cases have been notified to WHO was originally published with a wrong date (As at 20 January 2019...). This mistake was corrected on 8 April 2020.

On 29 July 2020 the correct affiliation of [5.1.2e] was added and the remaining affiliations were renumbered.

**Addendum

The Conflict of interest section was updated on 29 July 2020.

***Erratum

In the second half of Table 1, nM (nanomolar) was misspelled as nm when this article was published. This mistake was corrected on 4 February 2021. We apologise for any inconvenience this typo may have caused.

Acknowledgements

This work was funded by European Union DG Research through projects Prepare (GA602525), Compare (GA643476),

and EVAg (GA653316); by European Union DG SANCO through EVD-LabNet, as well as by the German Ministry of Research through projects RAPID (01KI1723A) and DZIF (301-4-7-01.703).

We gratefully acknowledge the authors, the originating and submitting laboratories for their sequence and metadata shared through GISAID, on which this research is based. All authors of data may be contacted directly via www.gisaid.org; National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC (Wenjie Tan, Xiang Zhao, Wenling Wang, Xuejun Ma, Yongzhong Jiang, Roujian Lu, Ji Wang, Weimin Zhou, Peihua Niu, Peipei Liu, Faxian Zhan, Weifeng Shi, Baoying Huang, Jun Liu, Li Zhao, Yao Meng, Xiaozhou He, Fei Ye, Na Zhu, Yang Li, Jing Chen, Wenbo Xu, George F. Gao, Guizhen Wu); Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences (Peng Zhou, Xing-Lou Yang, Ding-Yu Zhang, [5.1.2e] Zhu, Hao-Rui Si, Zhengli Shi); Institute of Pathogen Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College (Lili Ren, Jianwei Wang, Qi Jin, Zichun Xiang, Yongjun Li, Zhiqiang Wu, Chao Wu, Yiwei Liu); and National Institute for Communicable Disease Control and Prevention (ICDC), China CDC (Zhang Y-Z, Wu, F, Chen Y-M, Pei Y-Y, Xu L, Wang W, Zhao S, Yu B, Hu Y, Tao Z-W, Song Z-G, Tian J-H, Zhang Y-L, [5.1.2e], Zheng J-J, Dai F-H, Wang Q-M, She J-L and Zhu T-Y)

We thank Marta Zuchowski, Sigrid Kersten, and Joerg Hofmann for help with sample logistics. In vitro-transcribed control RNA for the E gene assay can be acquired from author C. D. through the European Virus Archive platform (www.european-virus-archive.com).

Conflict of interest **

[5.1.2e] is CEO of Tib-Molbiol; [5.1.2e] is senior researcher at GenExpress and serves as scientific advisor for Tib-Molbiol.

Authors' contributions

VMC: Planned and conducted experiments, conceptualised the laboratory work

OL: Planned and conducted experiments, conceptualised the laboratory work

MK: Planned and conducted experiments

RM: Planned and conducted experiments, conceptualised the laboratory work

AM: Planned and conducted experiments, conceptualised the laboratory work

DKWC: Planned and conducted experiments

TB: Planned and conducted experiments

SB: Planned and conducted experiments

JS: Planned and conducted experiments

MLS: Planned and conducted experiments

DGJCM: Planned and conducted experiments

BLH: Planned and conducted experiments

BvdV: Planned and conducted experiments

SvdB: Planned and conducted experiments

LW: Planned and conducted experiments

GG: Planned and conducted experiments

JLR: Contributed to overall study conceptualization

JE: Planned and conducted experiments, conceptualised the laboratory work

MZ: Planned laboratory work, contributed to overall study conceptualization

MP: Planned laboratory work, contributed to overall study conceptualization

HG: Contributed to overall study conceptualization

CR: Planned experiments, conceptualised the laboratory work

MPGK: Planned experiments, conceptualised the laboratory work

CD: Planned experiments, conceptualised the laboratory work, conceptualised the overall study, wrote the manuscript draft.

References

- World Health Organization (WHO). Coronavirus. Geneva: WHO; 2020 [Accessed 21 Jan 2020]. Available from: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>
- Zhang Y-Z. Novel 2019 coronavirus genome. *Virological*. [Accessed 21 Jan 2020]. Available from: <http://virological.org/t/novel-2019-coronavirus-genome/319>
- de Groot RJ, Baker SC, Baric R, Enjuanes L, Gorbalenya AE, Holmes KV, et al. Family Coronaviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London; Waltham: Academic Press; 2012. p. 806-20.
- Peiris JS, Yuen KY, Osterhaus AD, Stöhr K. The severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003;349(25):2431-41. <https://doi.org/10.1056/NEJMra032498> PMID: 14681510
- World Health Organization. (WHO). Novel Coronavirus (2019-nCoV). Situation report – 1. Geneva: WHO; 21 Jan 2020. Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf>
- Abbott A. SARS testing; First past the post. *Nature*. 2003;423(6936):114. <https://doi.org/10.1038/423114a> PMID: 12736651
- Corman VM, Müller MA, Costabel U, Timm J, Binger T, Meyer B, et al. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill*. 2012;17(49):20334. <https://doi.org/10.2807/ese.17.49.20334-en> PMID: 23231891
- Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348(20):1967-76. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747> PMID: 12690091
- Corman VM, Eickmann M, Landt O, Bleicker T, Brünink S, Eschbach-Bludau M, et al. Specific detection by real-time reverse-transcription PCR assays of a novel avian influenza A(H7N9) strain associated with human spillover infections in China. *Euro Surveill*. 2013;18(16):20461. PMID: 23611031
- Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill*. 2012;17(39):20285. <https://doi.org/10.2807/ese.17.39.20285-en> PMID: 23041020
- Panning M, Charrel RN, Donoso Mantke O, Landt O, Niedrig M, Drosten C. Coordinated implementation of chikungunya virus reverse transcription-PCR. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(3):469-71. <https://doi.org/10.3201/eid1503.081104> PMID: 19239767
- Corman VM, Rasche A, Baronti C, Aldabbagh S, Cadar D, Reusken CB, et al. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. *Bull World Health Organ*. 2016;94(12):880-92. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.175950> PMID: 27994281
- Drexler JF, Gloza-Rausch F, Glende J, Corman VM, Muth D, Goettsche M, et al. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J Virol*. 2010;84(21):11336-49. <https://doi.org/10.1128/JVI.00650-10> PMID: 20686038
- Muth D, Corman VM, Roth H, Binger T, Dijkman R, Gottula LT, et al. Attenuation of replication by a 29 nucleotide deletion in SARS-coronavirus acquired during the early stages of human-to-human transmission. *Sci Rep*. 2018;8(1):15177. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33487-8> PMID: 30310104
- Corman VM, Muth D, Niemeyer D, Drosten C. Hosts and sources of endemic human coronaviruses. *Adv Virus Res*. 2018;100:163-88. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.01.001> PMID: 29551335
- Drexler JF, Corman VM, Drosten C. Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Res*. 2014;101:45-56. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.013> PMID: 24184128
- Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(3):181-92. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9> PMID: 30531947
- Romette JL, Prat CM, Gould EA, de Lamballerie X, Charrel R, Coutard B, et al. The European Virus Archive goes global: A growing resource for research. *Antiviral Res*. 2018;158:127-34. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.017> PMID: 30059721
- Alleweldt F, Kara S, Osinski A, Van Baal P, Kellerborg K, Aarestrup FM, et al. Developing a framework to assess the cost-effectiveness of COMPARE - a global platform for the exchange of sequence-based pathogen data. *Rev Sci Tech*. 2017;36(1):311-22. <https://doi.org/10.20506/rst.36.1.2631> PMID: 28926006
- Domingo C, Ellerbrok H, Koopmans M, Nitsche A, Leitmeyer K, Charrel RN, et al. Need for additional capacity and improved capability for molecular detection of yellow fever virus in European Expert Laboratories: External Quality Assessment, March 2018. *Euro Surveill*. 2018;23(28):1800341. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.28.1800341> PMID: 30017021
- Pas SD, Patel P, Reusken C, Domingo C, Corman VM, Drosten C, et al. First international external quality assessment of molecular diagnostics for Mers-CoV. *J Clin Virol*. 2015;69:81-5. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.05.022> PMID: 26209385
- Gobat N, Amuasi J, Yazdanpanah Y, Sigfid L, Davies H, Byrne JP, et al. Advancing preparedness for clinical research during infectious disease epidemics. *ERJ Open Res*. 2019;5(2):00227-2018. <https://doi.org/10.1183/23120541.00227-2018> PMID: 31123684

License, supplementary material and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence and indicate if changes were made.

Any supplementary material referenced in the article can be found in the online version.

This article is copyright of the authors or their affiliated institutions, 2020.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

External peer review of the RTPCR test to detect SARS-CoV-2 reveals 10 major scientific flaws at the molecular and methodological level: consequences for false positive results.

Pieter Borger ^{1*}, Rajesh K. Malhotra ², ^{5.1.2e} 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 J. Klement ¹⁶, Ruth Schrufer ¹⁷, Berber W. Pieksma ¹⁸, Jan Bonte ¹⁹,
Bruno H. Dalle Carbonara ²⁰, Kevin P. Corbett ²¹, Ulrike Kämmerer ²².

* Corresponding author

ABSTRACT

In the publication entitled "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR" (Eurosurveillance 25(8) 2020) the authors present a diagnostic workflow and RT-qPCR protocol for detection and diagnostics of 2019-nCoV (now known as SARS-CoV-2), which they claim to be validated, as well as being a *robust diagnostic methodology for use in public-health laboratory settings*.

In light of all the consequences resulting from this very publication for societies worldwide, a group of independent researchers performed a point-by-point review of the aforesaid publication in which 1) all components of the presented test design were cross checked, 2) the RT-qPCR protocol-recommendations were assessed w.r.t. good laboratory practice, and 3) parameters examined against relevant scientific literature covering the field.

The published RT-qPCR protocol for detection and diagnostics of 2019-nCoV and the manuscript suffer from numerous technical and scientific errors, including insufficient primer design, a problematic and insufficient RT-qPCR protocol, and the absence of an accurate test validation. Neither the presented test nor the manuscript itself fulfils the requirements for an acceptable scientific publication. Further, serious conflicts of interest of the authors are not mentioned. Finally, the very short timescale between submission and acceptance of the publication (24 hours) signifies that a systematic peer review process was either not performed here, or of problematic poor quality.

We provide compelling evidence of several scientific inadequacies, errors and flaws. Considering the scientific and methodological blemishes presented here, we are confident that the editorial board of Eurosurveillance has no other choice but to retract the publication.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Nevertheless these *in silico* sequences were used to develop a RT-PCR test methodology to identify the aforesaid virus. This model was based on the assumption that the *novel* virus is very similar to SARS-CoV from 2003 (Hereafter named SARS-CoV-1) as both are beta-coronaviruses.

The PCR test was therefore designed using the genomic sequence of SARS-CoV-1 as a control material for the Sarbeco component; we know this from our personal email-communication with [2] one of the co-authors of the Corman-Drosten paper. This method to model SARS-CoV-2 was described in the Corman-Drosten paper as follows:

“the establishment and validation of a diagnostic workflow for 2019-nCoV screening and specific confirmation, designed in absence of available virus isolates or original patient specimens. Design and validation were enabled by the close genetic relatedness to the 2003 SARS-CoV, and aided by the use of synthetic nucleic acid technology.”

In short, a design relying merely on close genetic relatives does not fulfill the aim for a “robust diagnostic test” as cross reactivity and therefore false-positive results will inevitably occur.

Validation was only done in regards to *in silico* (theoretical) sequences and within the laboratory-setting, and not as required for in-vitro diagnostics with isolated genomic viral RNA. This very fact hasn’t changed even after 10 months of introduction of the test into routine diagnostics.

There are numerous other severe scientific errors regarding the biomolecular design of the primers, the PCR method, as well as the molecular validation of the PCR products and methods described in the Corman-Drosten paper which are examined in detail in the following chapters. The paper itself already signifies that a large number of false positive results are generated by this test, even under controlled laboratory conditions, making it completely unsuitable as a reliable virus screening method for entire populations in an ongoing pandemic. Given the far-reaching implications, including quarantine measures, lockdowns, curfews and impacts on education etc., this paper must be immediately retracted.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

[reviewed in 3]

4. Molecular biological validations; amplified PCR products must be validated either by running the products in a gel with a DNA ruler, or by direct DNA sequencing
5. Positive and negative controls should be specified to confirm/refute specific virus detection
6. There should be a Standard Operational Procedure (SOP) available, which unequivocally specifies the above parameters, so that all laboratories are able to set up the exact same test conditions. To have a validated universal SOP is essential, because it enables the comparison of data within and between countries.

MINOR CONCERNS WITH THE CORMAN-DROSTEN PAPER

1. In Table 1 of the Corman-Drosten paper, different abbreviations are stated - "nM" is specified, "nm" isn't. Further in regards to correct nomenclature, nm means "nanometer" therefore nm should read nM here.
2. It is the general consensus to write genetic sequences always in the 5'-3' direction, including the reverse primers. It is highly unusual to do alignment with reverse complementary writing of the primer sequence as the authors did in figure 2 of the Corman-Drosten paper. Here, in addition, a wobble base is marked as "y" without description of the bases the Y stands for.
3. Two misleading pitfalls in the Corman-Drosten paper are that their Table 1 does not include T_m-values (annealing-temperature values), neither does it show GC-values (number of G and C in the sequences as %-value of total bases).

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

concentrations of primers in this protocol. Rather, these concentrations lead to increased unspecific binding and PCR product amplification.

Table1: Primers and probes (adapted from Corman-Drosten paper; erroneous primer concentrations are highlighted)

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

^a 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.

1b) Unspecified ("Wobbly") primer and probe sequences

To obtain reproducible and comparable results, it is essential to distinctively define the primer pairs. In the Corman-Drosten paper we observed six unspecified positions, indicated by the letters R, W, M and S (Table 2). The letter W means that at this position there can be either an A or a T; R signifies there can be either a G or an A; M indicates that the position may either be an A or a C; the letter S indicates there can be either a G or a C on this position.

This high number of variants not only is unusual, but it also is highly confusing for laboratories. These six unspecified positions could easily result in the design of several different alternative primer sequences which do not relate to SARS-CoV-2 (2 distinct RdRp_SARsR_F primers + 8 distinct RdRp_SARsR_P1 probes + 4 distinct RdRp_SARsR_R). The design variations will inevitably lead to results that are not even SARS-CoV-2 related. Therefore, the confusing unspecific description in the Corman-Drosten paper is not suitable as a Standard Operational Protocol. These unspecified positions should have been designed unequivocally.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

confirmatory assays, and this would have resulted in an almost sufficient virus RNA detection diagnostic tool protocol. Three confirmatory assay-steps would at least minimize-out errors & uncertainties at every fold-step in regards to “Wobbly”-spots. (Nonetheless, the protocol would still fall short of any “good laboratory practice”, when factoring in all the other design-errors).

As it stands, the N gene assay is regrettably neither proposed in the WHO-recommendation (Figure 1) as a mandatory and crucial third confirmatory step, nor is it emphasized in the Corman-Drosten paper as important optional reassurance “for a routine workflow” (Table 2).

Consequently, in nearly all test procedures worldwide, merely 2 primer-matches were used instead of all three. This oversight renders the entire test-protocol useless with regards to delivering accurate test-results of real significance in an ongoing pandemic.

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

Figure 1: The N-Genie confirmatory-assay is neither emphasized as necessary third step in the official WHO Drosten-Corman protocol-recommendation [8] nor is it required as a crucial step for higher test-accuracy in the Eurosurveillance publication.

1c) Erroneous GC-content (discussed in 2c, together with annealing temperature (T_m))

1d) Detection of viral genes

RT-PCR is not recommended for primary diagnostics of infection. This is why the RT-PCR Test

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

the Corman-Drosten paper with Thermofisher's primer dimer web tool [11]. The RdRp forward primer has 6bp 3prime homology with Sarbeco E Reverse. At high primer concentrations this is enough to create inaccuracies.

Of note: There is a perfect match of one of the N primers to a clinical pathogen (*Pantoea*), found in immuno-compromised patients. The reverse primer hits *Pantoea* as well but not in the same region (Figure 3).

These are severe design errors, since the test cannot discriminate between the whole virus and viral fragments. The test cannot be used as a diagnostic for SARS-CoV-2 viruses.

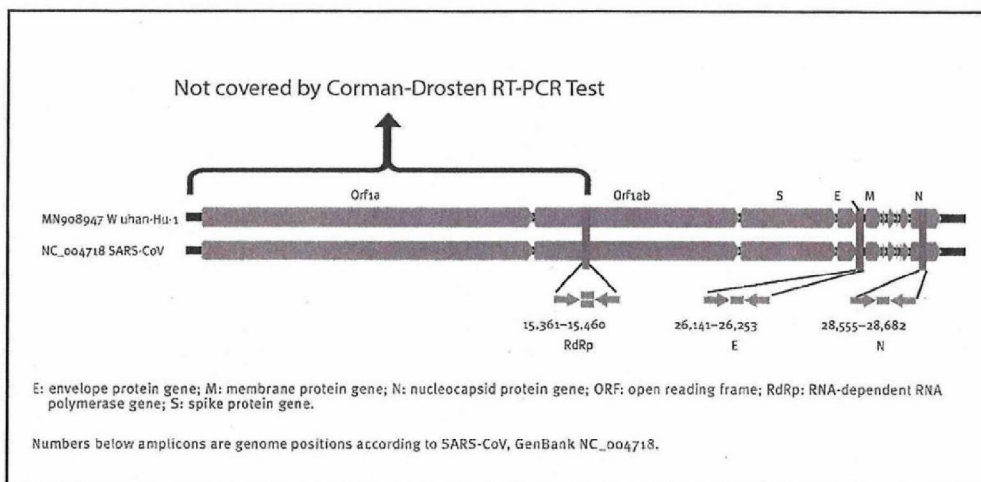


Figure 2: Relative positions of amplicon targets on the SARS-CoV-1 coronavirus and the 2019 novel coronavirus genome. ORF: open reading frame; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase. Numbers below amplicons are genome positions according to SARS-CoV-1, NC_004718 [1];

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

be detected). This means for a target-sequence to be recognized we have to choose a temperature which is as close as possible to the actual annealing-temperature (best practise-value) for the primer not to detach again, while at the same time specifically selecting the target sequence.

If the T_m -value is very low, as observed for all wobbly-variants of the RdRp reverse primers, the primers can bind non-specifically to several targets, decreasing specificity and increasing potential false positive results.

The annealing temperature (T_m) is a crucial factor for the determination of the specificity /accuracy of the qPCR procedure and essential for evaluating the accuracy of qPCR-protocols. Best-practice recommendation: Both primers (forward and reverse) should have an almost similar value, preferably the identical value.

We used the freely available primer design software Primer-BLAST [12, 25] to evaluate the best-practise values for all primers used in the Corman-Drosten paper (Table 3). We attempted to find a T_m -value of 60° C, while similarly seeking the highest possible GC%-value for all primers. A maximal T_m difference of 2° C within primer pairs was considered acceptable. Testing the primer pairs specified in the Corman-Drosten paper, we observed a difference of 10° C with respect to the annealing temperature T_m for primer pair1 (RdRp_SARSr_F and RdRp_SARSr_R). *This is a very serious error and makes the protocol useless as a specific diagnostic tool.*

Additional testing demonstrated that only the primer pair designed to amplify the N-gene (N_Sarbeco_F and N_Sarbeco_R) reached the adequate standard to operate in a diagnostic test, since it has a sufficient GC-content and the T_m difference between the primers (N_Sarbeco_F and N_Sarbeco_R) is 1.85° C (below the crucial maximum of 2° C difference). Importantly, this is the gene which was neither tested in the virus samples (Table 2) nor emphasized as a confirmatory test. In addition to highly variable melting temperatures and degenerate sequences in these primers, there is another factor impacting specificity of the procedure: the dNTPs (0.4uM) are 2x higher than recommended for a highly specific amplification. There is additional magnesium sulphate added to the reaction as well. This procedure combined with a low annealing temperature can create non-specific amplifications. When additional magnesium is required for qPCR, specificity of the assay should be further scrutinized.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

PCR data evaluated as positive after a Ct value of 35 cycles are completely unreliable.

Citing Jaafar *et al.* 2020 [3]: “At Ct = 35, the value we used to report a positive result for PCR, <3% of cultures are positive.” In other words, there was no successful virus isolation of SARS-CoV-2 at those high Ct values.

Further, scientific studies show that only non-infectious (dead) viruses are detected with Ct values of 35 [22].

Between 30 and 35 there is a grey area, where a positive test cannot be established with certainty. This area should be excluded. Of course, one could perform 45 PCR cycles, as recommended in the Corman-Drosten WHO-protocol (Figure 4), but then you also have to define a reasonable Ct-value (which should not exceed 30). But an analytical result with a Ct value of 45 is scientifically and diagnostically absolutely meaningless (a reasonable Ct-value should not exceed 30). All this should be communicated very clearly. It is a significant mistake that the Corman-Drosten paper does not mention the maximum Ct value at which a sample can be unambiguously considered as a positive or a negative test-result. This important cycle threshold limit is also not specified in any follow-up submissions to date.

3. Discrimatory assay		
<u>RdRp assay:</u>		
<u>MasterMix:</u>	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_SARS-F2 (10 µM stock solution)	1.5 µl	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
Primer RdRP_SARS-R1 (10 µM stock solution)	2 µl	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
Probe RdRP_SARS-F2 (10 µM stock solution)	0.5 µl	FAM-CAGGTGGAACTCATCAGGABATGG-BBQ
SSIIITaq 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
 ** MgSO₄ (50 mM) [Sigma]. This component is not provided with the OneStep RT-PCR kit.
 *** non-acetylated [Roche].


Cycles:
 55°C 10'
 94°C 3'
 94°C 15"
 58°C 30" 

Figure 4: RT-PCR Kit recommendation in the official Corman-Drosten WHO-protocol [8]. Only a “Cycler”-value (cycles) is to be found without corresponding and scientifically reasonable Ct (Cutoff-value). This or any other cycles-value is nowhere to be found in the actual Corman-Drosten paper.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

All individuals testing positive with the RT-PCR test, as described in the Corman-Drosten paper, are assumed to be positive for SARS-CoV-2 infections. There are three severe flaws in their assumption. First, a positive test for the RNA molecules described in the Corman-Drosten paper cannot be equated to "infection with a virus". A positive RT-PCR test merely indicates the presence of viral RNA molecules. As demonstrated under point 1d (above), the Corman-Drosten test was not designed to detect the full-length virus, but only a fragment of the virus. We already concluded that this classifies the test as unsuitable as a diagnostic test for SARS-virus infections.

Secondly and of major relevance, the functionality of the published RT-PCR Test was not demonstrated with the use of a positive control (isolated SARS-CoV-2 RNA) which is an essential scientific gold standard.

Third, the Corman-Drosten paper states:

"To show that the assays can detect other bat-associated SARS-related viruses, we used the E gene assay to test six bat-derived faecal samples available from Drexler et al. [...] und Muth et al. [...]. These virus-positive samples stemmed from European rhinolophid bats. Detection of these phylogenetic outliers within the SARS-related CoV clade suggests that all Asian viruses are likely to be detected. This would, theoretically, ensure broad sensitivity even in case of multiple independent acquisitions of variant viruses from an animal reservoir."

This statement demonstrates that the E gene used in RT-PCR test, as described in the Corman-Drosten paper, is not specific to SARS-CoV-2. The E gene primers also detect a broad spectrum of other SARS viruses.

The genome of the coronavirus is the largest of all RNA viruses that infect humans and they all have a very similar molecular structure. Still, SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 have two highly specific genetic fingerprints, which set them apart from the other coronaviruses. First, a unique fingerprint-sequence (KTFPPTPEPKDKKKK) is present in the N-protein of SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 [13,14,15]. Second, both SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 do not contain the HE protein, whereas all other coronaviruses possess this gene [13, 14]. So, in order to specifically detect a SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 PCR product the above region in the N gene should have been chosen as the amplification target. A reliable diagnostic test should focus on this specific region in the N gene as a confirmatory test. The PCR for this N gene was not further validated nor recommended as a test gene by the Drosten-Corman paper, because of

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

7. Consequences of the errors described under 1-5: false positive results.

The RT-PCR test described in the CD paper contains so many molecular biological design errors (see 1-5) that it is not possible to obtain unambiguous results. It is inevitable that this test will generate a tremendous number of so-called "false positives". The definition of false positives is a negative sample, which initially scores positive, but which is negative after retesting with the same test. False positives are erroneous positive test-results, i.e. negative samples that test positive. And this is indeed what is found in the CD paper. On page 6 of the manuscript PDF the authors demonstrate, that even under well-controlled laboratory conditions, a considerable percentage of false positives is generated with this test:

"In four individual test reactions, weak initial reactivity was seen however they were negative upon retesting with the same assay. These signals were not associated with any particular virus, and for each virus with which initial positive reactivity occurred, there were other samples that contained the same virus at a higher concentration but did not test positive. Given the results from the extensive technical qualification described above, it was concluded that this initial reactivity was not due to chemical instability of real-time PCR probes and most probably to handling issues caused by the rapid introduction of new diagnostic tests and controls during this evaluation study." [1]

The first sentence of this excerpt is clear evidence that the PCR test described in the Corman-Drosten paper generates false positives. Even under the well-controlled conditions of the state-of-the-art Charité-laboratory, 4 out of 310 primary-tests are false positives per definition. Four negative samples initially tested positive, then were negative upon retesting. This is the classical example of a false positive. In this case the authors do not identify them as false positives, which is intellectually dishonest.

Another telltale observation in the excerpt above is that the authors explain the false positives away as "handling issues caused by the rapid introduction of new diagnostic tests". Imagine the laboratories that have to introduce the test without all the necessary information normally described in an SOP.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

because the authors were also part of the editorial board at Eurosurveillance. This practice is categorized as compromising scientific integrity .

SUMMARY CATALOGUE OF ERRORS FOUND IN THE PAPER

The Corman-Drosten paper contains the following specific errors:

1. There exists no specified reason to use these extremely high concentrations of primers in this protocol. The described concentrations lead to increased nonspecific bindings and PCR product amplifications, making the test unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.
2. Six unspecified wobbly positions will introduce an enormous variability in the real world laboratory implementations of this test; the confusing nonspecific description in the Corman-Drosten paper is not suitable as a Standard Operational Protocol making the test unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.
3. The test cannot discriminate between the whole virus and viral fragments. Therefore, the test cannot be used as a diagnostic for intact (infectious) viruses, making the test unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus and make inferences about the presence of an infection.
4. A difference of 10° C with respect to the annealing temperature T_m for primer pair1 (RdRp_SARSr_F and RdRp_SARSr_R) also makes the test unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.
5. A severe error is the omission of a Ct value at which a sample is considered positive and negative. This Ct value is also not found in follow-up submissions making the test unsuitable as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.
6. The PCR products have not been validated at the molecular level. This fact makes the protocol useless as a specific diagnostic tool to identify the SARS-CoV-2 virus.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

The decision as to which test protocols are published and made widely available lies squarely in the hands of Eurosurveillance. A decision to recognise the errors apparent in the Corman-Drosten paper has the benefit to greatly minimise human cost and suffering going forward. Is it not in the best interest of Eurosurveillance to retract this paper? Our conclusion is clear. In the face of all the tremendous PCR-protocol design flaws and errors described here, we conclude: There is not much of a choice left in the framework of scientific integrity and responsibility.

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

[9] Kurkela, Satu, and David WG Brown. "Molecular-diagnostic techniques." *Medicine* 38.10 (2009): 535-540.

[10] Wolfel *et al.*, Virological assessment of hospitalized patients with 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>

[12] Primer-BLAST, NCBI - National Center for Biotechnology Information:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

[13] Marra MA, Steven JMJ, Caroline RA, Robert AH, Angela BW et al. (2003) *Science*. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300(5624): 1399-1404.

[14] Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN908947>

[15] Borger P. A SARS-like Coronavirus was expected but nothing was done to be prepared. *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; archive: <https://archive.is/i76Hu>

[16] Eurosurveillance paper evaluation / review process:
<https://www.eurosurveillance.org/evaluation>

[17] Official recommendation of the Corman-Drosten protocol & manuscript by the WHO, published on January 13th 2020 as version 1.0 of the document:
<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf>; archive: <https://bit.ly/3m3jXVH>

[18] Official WHO-recommendation for the Corman / Drosten RT-qPCR-protocol, which directly derives from the Eurosurveillance-publication, document-version 2-1, published on

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020**Author's Affiliations:**

- 1) **Dr. Pieter Borger** (MSc, PhD), Molecular Genetics, W+W Research Associate, Lörrach, Germany,
- 2) **Rajesh Kumar Malhotra** (Artist Alias: **Bobby Rajesh Malhotra**), Former 3D Artist / Scientific Visualizations at CeMM - Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences (2019-2020), University for Applied Arts - Department for Digital Arts Vienna, Austria
- 3) **Dr. ^{5.12e} Yeadon** BSc(Hons) Biochem Tox U Surrey, PhD Pharmacology U Surrey. Managing Director, Yeadon Consulting Ltd, former Pfizer Chief Scientist, United Kingdom,
- 4) **Dr. Clare Craig** MA, (Cantab) BM, BCh (Oxon), FRCPath, United Kingdom
- 5) **Kevin McKernan**, BS Emory University, Chief Scientific Officer, founder Medical Genomics, engineered the sequencing pipeline at WIBR/MIT for the Human Genome Project, Invented and developed the SOLiD sequencer, awarded patents related to PCR, DNA Isolation and Sequencing, USA
- 6) **Prof. Dr. Klaus Steger**, Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Molecular Andrology, Biomedical Research Center of the Justus Liebig University, Giessen, Germany
- 7) **Dr. Paul McSheehy** (BSc, PhD), Biochemist & Industry Pharmacologist, Loerrach, Germany
- 8) **Dr. Lidiya Angelova**, MSc in Biology, PhD in Microbiology, Former researcher at the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Maryland, USA
- 9) **Dr. Fabio Franchi**, Former Dirigente Medico (M.D) in an Infectious Disease Ward, specialized in "Infectious Diseases" and "Hygiene and Preventive Medicine", Società Scientifica per il Principio di Precauzione (SSPP), Italy
- 10) **Dr. med. Thomas Binder**, Internist and Cardiologist (FMH), Switzerland
- 11) **Prof. Dr. med. Henrik Ullrich**, specialist Diagnostic Radiology, Chief Medical Doctor at the Center for Radiology of Collm Oschatz-Hospital, Germany
- 12) **Prof. Dr. Makoto Ohashi**, Professor emeritus, PhD in Microbiology and Immunology, Tokushima University, Japan
- 13) **Dr. Stefano Scoglio**, B.Sc. Ph.D., Microbiologist, Nutritionist, Italy
- 14) **Dr. Marjolein Doesburg-van Kleffens** (MSc, PhD), specialist in Laboratory Medicine (clinical chemistry), Maasziekenhuis Pantein, Beugen, the Netherlands
- 15) **Dr. Dorothea Gilbert** (MSc, PhD), PhD Environmental Chemistry and Toxicology. DGI Consulting Services, Oslo, Norway

Review Report - Corman-Drosten *et al.*, Eurosurveillance 2020

Author's Contributions:

PB: Planned and conducted the analyses and research, conceptualising the manuscript.

RKM: Planned and conducted the research, conceptualising the figures and manuscript.

MY: Conducted the analyses and research.

KMcK: Conducted the analyses and research, conceptualized the manuscript.

KS: Conducted the analyses and research.

PMcS: Proofreading the analyses and research.

LA: Proofreading the analyses and research.

FF: Proofreading the analyses and research.

TB: Proofreading the analyses and research.

HU: Proofreading the analyses and research.

MO: Proofreading the analyses and research.

SS: Proofreading the analyses and research.

MDvK: Proofreading the analyses and research.

DG: Proofreading the analyses and research.

RJK: Proofreading the analyses and research.

RS: Proofreading the analyses and research, and the manuscript.

BWK: Proofreading the analyses and research.

RvV: Proofreading the analyses and research.

JB: Proofreading the analyses and research.

KC: Proofreading the analyses and research.

UK: Planned and conducted the analyses and research, conceptualising the manuscript.

Acknowledgement:

We are grateful to Saji N Hameed (Environmental Informatics, University of Aizu, Tsuruga, Ikki-machi, Aizuwakamatsu-shi, Fukushima, Japan) and Howard R. Steen (MA Chem. Eng. Cantab (1969-'73), Former Research Manager, UK) for proofreading our manuscript.