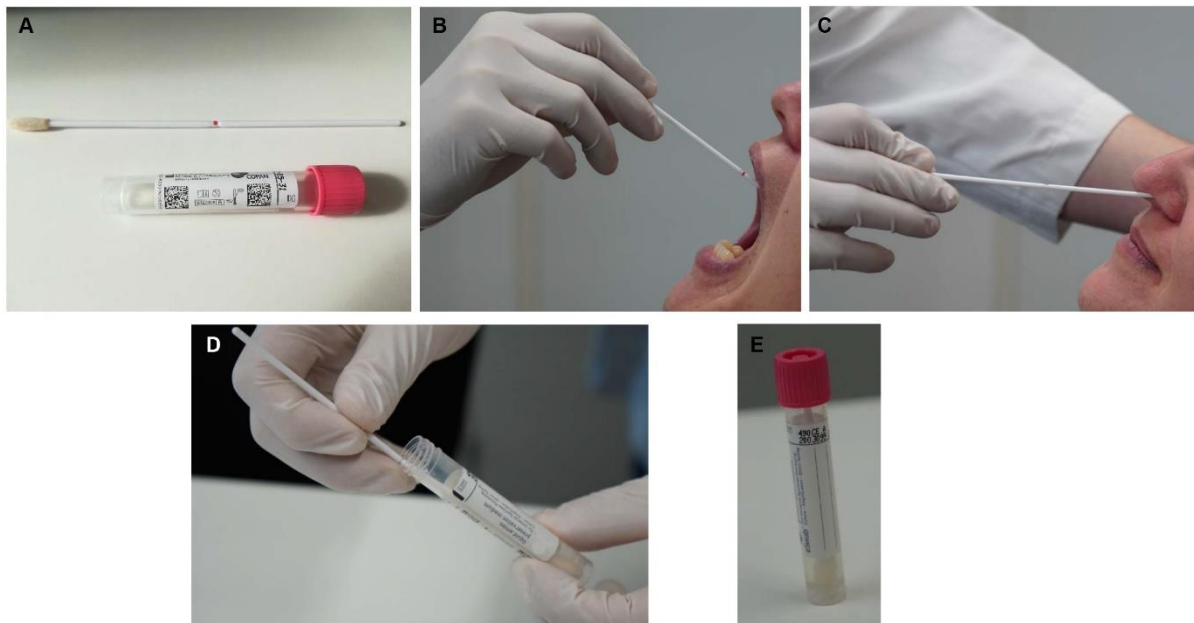


Text GfV zum Thema SARS-CoV-2 PCR

Es gibt immer wieder Diskussionen zur Nutzung des #PCR Tests als diagnostisches Werkzeug für #SARSCoV2. Dieser Text richtet sich daher nicht an Fachleute, sondern soll dazu dienen, **der breiten Öffentlichkeit einen Überblick über den GESAMTEN Prozess der #SARSCoV2 #Diagnostik mit Hilfe der PCR zu geben.** Daher haben wir uns vorgenommen, die drei großen Schritte der PCR Diagnostik auf #SARSCoV2 vom #Abstrich bis zum Befund hier zu beschreiben: 1. Prä-Analytik (= Vorbereitung der Testprobe) 2. Technische Analytik (= Durchführung der PCR) und 3. Post-Analytik (= Beurteilung des PCR Ergebnisses).

Vorbereitung:

Die Vorbereitung umfasst die Probenentnahme, die Probenlagerung und den Transport der Proben (siehe dazu auch NDR Podcast Ciesek @CiesekSandra¹). In der Regel wird ein Nasen- oder Mund-Rachen-Abstrich gemacht und das Abstrichbürstchen (A) in einem Röhrchen mit einer Transportflüssigkeit oder trocken verschlossen (E). Die Abbildung zeigt in der ersten Reihe ein Probenröhrchen (A), gefolgt von einem Rachen- (B) und Nasenabstrich (C). Das Abstrichbürstchen wird dann in ein Probengefäß überführt (D) und im Probengefäß (E) ins Labor gebracht.



Quelle: Lohmann/ Bühler, UKL Heidelberg

Wichtig dabei ist neben der Lagerung der Probe vor allem die Abstrich-Technik. Diese ist entscheidend, da hiermit festgelegt wird, wieviel Zellmaterial und somit auch wieviel Viren aufgenommen werden. Ausführliche Videoanleitungen zu den verschiedenen Abstrichverfahren sind mehrfach im Internet zu finden. Außerdem hat das Robert Koch-Institut (RKI) Hinweise zum Probenmaterial veröffentlicht² und

¹ <https://www.ndr.de/nachrichten/info/57-Coronavirus-Update-Goldstandard-bleibt-der-PCR-Test,podcastcoronavirus244.html>

² https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html

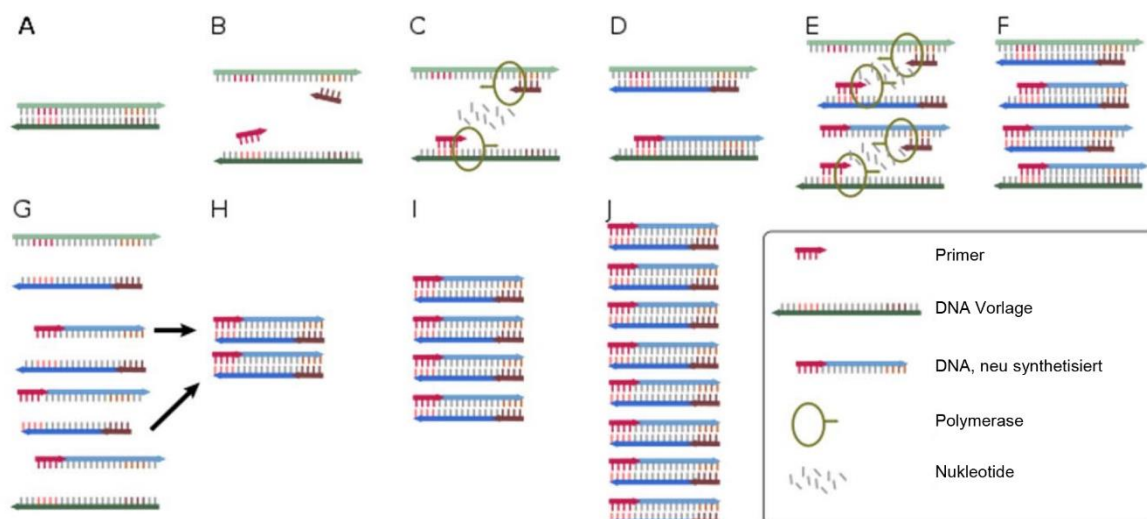
Abstrich-Zentren, Analyselabore und Kliniken haben sogenannte „Standard Operating Protocols“ (SOPs) herausgegeben. Das sind Handlungsanweisungen, die die Abstrich-Technik, die Aufbewahrung und den Transport der Proben genau beschreiben, um so die Qualität des gesamten Verfahrens zu sichern.

Durchführung:

Für den direkten Nachweis des Virus #SARSCoV2 wird die Polymerasekettenreaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) herangezogen. Diese Technik wurde von Kary Mullis entwickelt, der 1983 dafür den Nobelpreis für Chemie bekam.

Für den #SARSCoV2-Test wird zunächst das Erbgut des Erregers (eine sogenannte RNA) aus dem Abstrichmaterial isoliert und aufgereinigt. Diese RNA muss zunächst in eine DNA-Kopie überführt werden, was man im Labor mit einer einfachen Enzymreaktion erreicht, die man als „reverse Transkription“ (abgekürzt RT) bezeichnet. Danach wird die eigentliche #PCR mit der umgeschriebenen DNA-Kopie des Virus als Grundlage (A-J) gestartet. Die Reaktion vervielfältigt einen kurzen Bereich dieser DNA-Kopie, wobei dieser Bereich durch zwei sogenannte Starter (englisch „Primer“; rote und braune Pfeile in der Abbildung) vorgegeben wird. Der Trick dabei ist, dass man durch die vielfache Wiederholung einer Reaktionskette den von den Primern eingerahmten Bereich exponentiell vermehren kann.

Die Reaktionskette läuft dabei wie folgt ab: Nachdem man die in der Patientenprobe enthaltene Virus-RNA in eine DNA(A) umgeschrieben hat, wird diese zuerst erhitzt (B), wodurch sich die beiden Stränge der DNA trennen. Nach Abkühlung binden nun die beiden Primer an ihre jeweils genau passenden Regionen innerhalb der DNA-Kopie (B). Dabei ist die Lage der Primer so gewählt, dass sie sich „gegenüberstehen“ und nur einen kleinen Teil der DNA-Kopie vermehren, was aber für diagnostische Zwecke vollkommen ausreicht. In dem Reaktionsgefäß enthalten ist ein hitzestabiles Enzym (eine sogenannte Polymerase), die die „Enden“ der Primer erkennt und diese verlängert (C). Dadurch entstehen jetzt zwei DNA-Kopien (D). Diese Reaktionsmischung wird jetzt erneut den Zyklus durchlaufen lassen, so dass am Ende des zweiten Zyklus 4 DNA-Kopien vorhanden sind (F). Nach dem dritten Zyklus sind es 8 (J), dann 16, 32 usw.

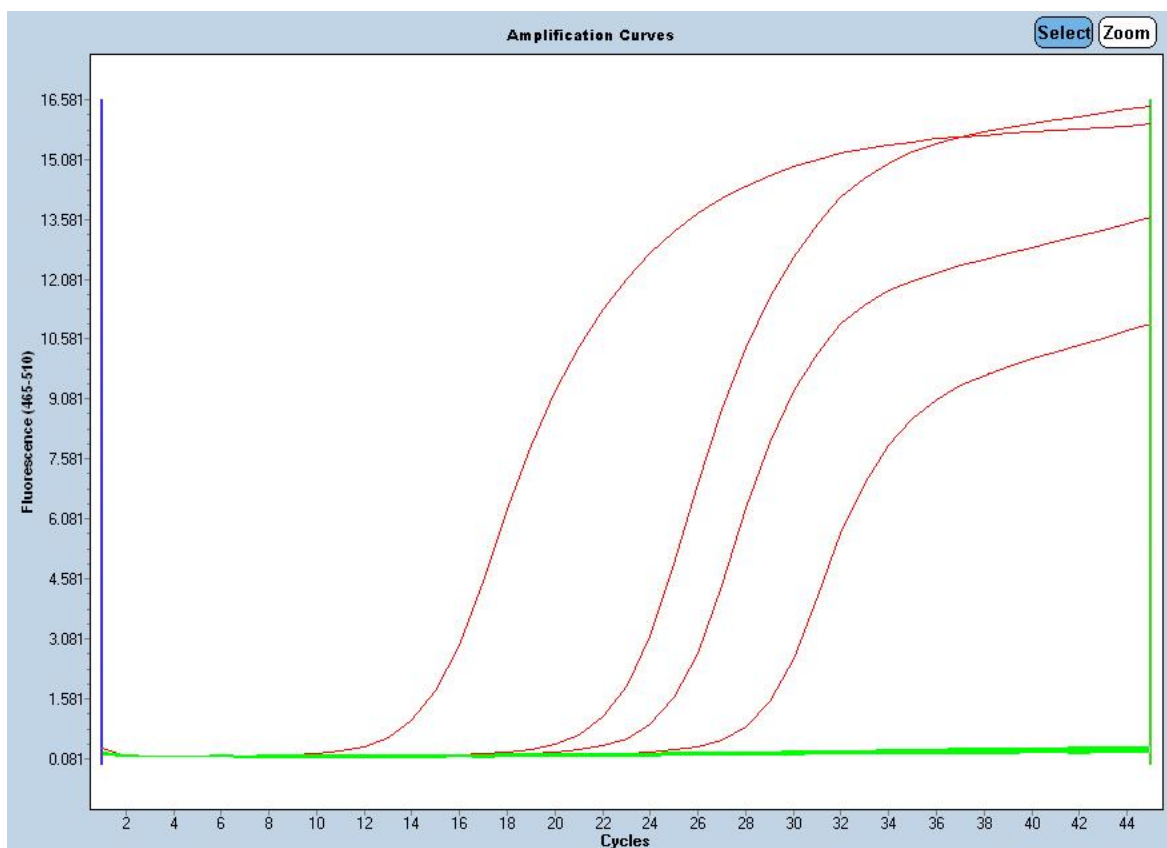


Quelle: modifiziert von Wikipedia³

³ <https://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion>

Die Methode der PCR ist in der molekularen Diagnostik eine etablierte und seit vielen Jahrzehnten routinemäßig eingesetzte Methode, die in vielen Bereichen einen bewährten Standard darstellt. Die Zuverlässigkeit der Methode ist in umfassenden medizinischen und technischen Studien dokumentiert.

Die Daten einer PCR zeigen auf, wie viele Zyklen benötigt wurden, um die in die Reaktion gegebene DNA zu vervielfältigen. Dies wird dann durch den Ct-(cycle threshold) Wert angegeben. In der nachfolgenden Abbildung ist zu sehen, dass die Daten die Menge der vermehrten Probe (Intensität des nachweisbaren Signals; y-Achse) in Abhängigkeit von der Zahl der PCR-Zyklen (x-Achse) angibt; dies ergibt ein Kurvendiagramm. Die Negativ-Kontrolle (eine Probe ohne DNA) ist die grüne Linie, die Positivkontrolle (enthält eine definierte Anzahl an DNA-Kopien) ist die zuerst ansteigende rote Kurve. Bei den anderen drei Kurven handelt es sich um Patientenproben, in denen ebenfalls DNA nachweisbar ist. Dabei gilt: Ist der Ct-Wert niedrig, ist die zu vervielfältigende DNA schon früh nachweisbar, was heißt, dass viel #SARSCoV2 Erbgut in der Patientenprobe war. Ist der Ct-Wert hoch, benötigt man viele PCR-Zyklen, um die DNA zu vervielfältigen. Das ist der Fall, wenn wenig #SARSCoV2 Erbgut in der Probe enthalten war.



Quelle: Weidner/Schnitzler, UKL Heidelberg

Wichtig für den ärztlichen Befund ist: Nur wenn die in jedem Testlauf mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen korrekt verlaufen und es keine untypischen Kurvenverläufe gibt, wird der Test zu einer Befundung herangezogen. Sind die Kontrollen nicht zuverlässig, muss die Analytik wiederholt werden. Nur nach dieser technischen Validierung geht das Ergebnis an den Laborarzt zur Befundung. Es gibt viele verschiedene Anbieter von PCR-Testsystemen in Deutschland. Die Auswahl des Tests wird durch das Analyselabor selbst vorgenommen und dort vor dem Einsatz intern anhand bereits analysierter Proben, also Proben bekannten Inhalts, geeicht. Die PCR-Tests weisen meistens 2 oder 3 verschiedene Bereiche im Erbgut des #SARSCoV2 nach. Die zur Vervielfältigung dieser Bereiche

verwendeten Primer unterscheiden sich zwischen den Testsystemen. Damit ist es auch möglich, unklare Testergebnisse mit einem anderen System und anderen Primern erneut zu untersuchen und zu klären. Den PCR-Tests liegt eine Beschreibung bei, die auch Auskunft über Kreuzreaktionen mit anderen Erregern (z.B. anderen Coronaviren), die Empfindlichkeit des Tests (Sensitivität) und die Genauigkeit des Testergebnisses (Spezifität) gibt. Die Homepage <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-molecular/> zeigt das Ergebnis der klinischen Spezifität und Sensitivität für 22 Testsysteme.

Die **Sensitivität** ist die Wahrscheinlichkeit, mit der eine infizierte Person als positiv getestet wird. Ein Test mit einer Sensitivität von 99 % zeigt 99 von 100 Infektionen und eine nicht. Die **Spezifität** ist die Genauigkeit, mit der NUR der gesuchte Erreger zu einem positiven Ergebnis führt und nicht infizierte Personen zuverlässig als negativ erkannt werden. Ein Test mit einer Spezifität von 99 % liefert bei einem von 100 Nichtinfizierten ein falsch-positives Ergebnis. Letztere beiden Punkten sind ein großes Diskussionsfeld und wurden schon ausführlich in Tweets von @cieseksandra, @thebinderlab und anderen erklärt und diskutiert. Bereits hier soll schon einmal darauf hingewiesen werden, dass man grundsätzlich zwischen technisch positiven Testergebnissen (Ergebnisse aus einem Labortest) und der klinischen Bedeutung unterscheiden muss.

Die sehr gute klinische Spezifität kann zum Beispiel auch aus der Tatsache abgeleitet werden, dass in vielen Ländern mit niedriger oder sogar gestoppter Virusverbreitung (z.B. Neuseeland), jedoch auch in Deutschland direkt nach dem Lock-down im Frühjahr und über die Sommermonate, weiterhin sehr viele Proben getestet wurden⁴, und dennoch regional keine oder nur eine sehr geringe Anzahl an positiven Resultaten gemeldet wurden. Ebenso zeigen retrospektive Untersuchungen an gelagerten Proben aus der Zeit vor der Pandemie mit den aktuell verwendeten diagnostischen Tests, dass hier der PCR Nachweis stets negativ ist. Das ist zu erwarten, weil zum Zeitpunkt der Probenentnahme das Virus noch gar nicht verbreitet war⁵.

Zuletzt noch eine kurze Anmerkung zur Überprüfung der diagnostischen Zuverlässigkeit von Laboren durch den INSTAND e. V., eine von der Bundesärztekammer bestellte Referenzinstitution: Durch die Teilnahme an regelmäßigen Ringversuchen, die für medizinische Labore vorgeschrieben sind, wird die Fähigkeit des Labors, ein bestimmtes Nachweisverfahren korrekt durchzuführen, überprüft. Es geht in diesen Versuchen NICHT um die Analyse der Spezifität oder Sensitivität der PCR Tests. Darauf wurde auch explizit von INSTAND e.V. in einer Stellungnahme hingewiesen⁶. Aber natürlich kann man diese in Näherung ableiten. Dabei ist darauf zu achten, dass in den PCR-Testsystemen, die in den Diagnostiklaboren verwendet werden, häufig 2 oder 3 Bereiche der #SARSCoV2 Erbinformation gleichzeitig detektiert werden. Die Spezifität eines PCR-Tests ergibt sich letztlich aus der Gesamtspezifität des Tests und ist NICHT die Einzelspezifität für eine Region, oder einfacher gesagt: je mehr Gene untersucht werden, desto genauer der Test.

Beurteilung des Ergebnisses: Mit der technischen Beurteilung einer PCR über oder unter der Nachweisgrenze wird dann eine medizinische Befundung durchgeführt. In diesem Schritt wird das technische Ergebnis in den klinischen Zusammenhang gestellt (siehe dazu auch NDR Podcast Ciesek @CiesekSandra⁷). Ist das Ergebnis zweifelhaft, weil z. B. nur ein Genabschnitt von zwei oder drei im

⁴ https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Testzahl.html

⁵ Lhopitallier L, Brahier T, Opota O, Kronenberg A, Mueller Y, Hugli O, et al. No evidence of SARS-CoV-2 circulation before identification of the first Swiss SARS-CoV-2 case. Int J Antimicrob Agents. 2020;56(3):106100.

⁶ Stellungnahme zum INSTAND RV 340 SARS-CoV-2 NAT April 2020 vom 29.09.2020 über <https://www.instand-ev.de/>

⁷ <https://www.ndr.de/nachrichten/info/57-Coronavirus-Update-Goldstandard-bleibt-der-PCR-Test,podcastcoronavirus244.html>

Testsystem nachzuweisenden erfolgreich vervielfältigt wurde, dann wird der Test mit einem PCR-Test eines anderen Herstellers wiederholt oder es wird eine neue Probe des Patienten angefordert. Erst wenn das Testergebnis technisch einwandfrei ist, wird es für den Befund herangezogen.

FAZIT: Aus der beschriebenen technischen und medizinischen Beurteilung ergibt sich eine hohe klinisch-diagnostische Sensitivität für #SARSCoV2 von nahezu 100 %. Die vom RKI gemeldeten Daten zum Infektionsgeschehen spiegeln somit medizinische Befunde und keine rohen Testergebnisse wieder, so dass von einer sehr hohen Zuverlässigkeit der Analysemethode auszugehen ist.

Autoren:

Der Vorstand der Gesellschaft für Virologie

Prof. Dr. Ralf Bartenschlager, Universitätsklinikum Heidelberg

Prof. Dr. Thomas Stamminger, Universitätsklinikum Ulm

Prof. Dr. Ulf Dittmer, Universitätsklinikum Essen

Prof. Dr. Sandra Ciesek, Universitätsklinikum Frankfurt

Prof. Dr. Klaus Überla, Universitätsklinikum Erlangen

unter Beteiligung von:

Dr. Marco Binder, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg

Dr. Sandra Bühler, Universitätsklinikum Heidelberg

Prof. Dr. Isabella Eckerle, Universitätsklinikum Genf, Schweiz

Prof. Dr. Markus Panning, Universitätsklinikum Freiburg

Jun. Prof. Dr. Stephanie Pfänder, Ruhr-Universität Bochum