

INFOBLATT PCR

von Klaus Steger & Ulrike Kämmerer

„Seine (Anm.: Kary Mullis) Erfindung ist höchst originell und bedeutsam, denn sie teilt die Biologie praktisch in die beiden Epochen vor P.C.R. und nach P.C.R.“ [1, übersetzt]

GESCHICHTE - Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht eine rasche und exponentielle Vervielfältigung von Millionen bis Milliarden von Kopien aus einer extrem kleinen Menge einer beliebigen DNA-Sequenz. Auf der Grundlage des Konzepts der "Reparatur-Replikation [2]" erweiterte und verbesserte **Kary Mullis** (28. Dezember 1944 - 7. August 2019) die Technik durch Anwendung sich wiederholender Temperaturzyklen. Im Jahr 1993 wurde er dafür zusammen mit Michael Smith mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Später wurde eine hitzestabile DNA-Polymerase in den Prozess integriert.

„Mit PCR kann man, wenn man es gut macht, fast alles in jedem finden.“ [3, übersetzt]

PRINZIP - Eine PCR besteht aus einer Abfolge von **30-35 DNA-Amplifikationszyklen**, die jeweils die nachfolgenden drei Schritte (Steps) umfassen:

1. **Denaturierung** (94-98 °C): Trennung der doppelsträngigen DNA-Vorlage in zwei einzelne DNA-Stränge.
2. **Annealing** (60-65 °C): Bindung kurzer, einzelsträngiger DNA-Startersequenzen (Primer) an den beiden Enden der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz. Dieses spezifische Primerpaar definiert somit die Sequenz der Ziel-DNA (Target).
3. **Elongation** (72 °C): Verlängerung der beiden Startersequenzen durch das Enzym DNA-Polymerase, das auch die DNA in den Zellen kopiert. Dies führt zur vollständigen Synthese der Ziel-DNA, deren Sequenz komplementär zur DNA-Vorlage ist.

Das DNA-Produkt jedes Zyklus dient als Ausgangsmaterial für den nachfolgenden Zyklus und führt somit zu einer exponentiellen Vervielfältigung der gewünschten Ziel-DNA. Aufgrund ihrer spezifischen Größe kann das PCR-Endprodukt auf einem Agarose- oder einem Polyacrylamidgel analysiert werden.

Bei den **COVID-19 PCR-Tests** zum Nachweis spezifischer SARS-CoV-2 Sequenzen kam die so genannte **Echtzeit (real-time) PCR** zur Anwendung. Diese verwendet eine zusätzliche „Sonde“, die mit einem inaktiven Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und zwischen dem flankierenden Primerpaar bindet. In den Elongationsphasen wird die „Sonde“ durch die DNA-Polymerase zerstört, was zur Freisetzung eines messbaren Fluoreszenzsignals führt.

- Der **Cycle threshold (Ct)** ist die Zykluszahl, bei der das mit der Menge des PCR-Produkts gekoppelte Fluoreszenzsignal spezifisch über dem Hintergrundrauschen nachweisbar ist. Der Ct-Wert steht im umgekehrten Verhältnis zur ursprünglichen Menge der Ziel-DNA, d.h. je niedriger der Ct-Wert, desto mehr Ziel-DNA war ursprünglich in der Probe vorhanden.
- Für eine valide **quantitative PCR (qPCR)** wird zwingend ein externer Standard mit bekannter DNA-Konzentration benötigt, um den Ct-Wert der Probe (unbekannte DNA-Konzentration) mit dem Ct-Wert des Standards (bekannte DNA-Konzentration) zu vergleichen.
- Für die Analyse einzelsträngiger RNA (wie bei Coronaviren) muss die RNA vor der PCR in DNA umgeschrieben werden. Diese Art von PCR wird als **RT-PCR** (RT für reverse Transkription) bezeichnet.

- Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR Technik muss jegliche Verunreinigung vermieden werden, **da kontaminierende DNA ebenso effektiv amplifiziert wird wie die gesuchte Ziel-DNA**. Im schlimmsten Fall kann eine zu untersuchende Probe bereits mit einer Ziel-DNA aus einer früher durchgeführten PCR verunreinigt sein.

BEACHTEN: Aufgrund ihrer hohen Sensitivität ist die PCR eine hervorragende Technik für den Nachweis kleinster DNA-Mengen (z.B. in der Forensik). Die hohe Sensitivität öffnet aber auch Tür und Tor für vielfältige Fehler und offensichtliche Täuschungen, wenn die PCR falsch verwendet wird (z.B. unspezifisches Testen gesunder Individuen) oder die erzielten Ergebnisse falsch interpretiert werden (z.B. irrationales Aufaddieren PCR-positiver „Fälle“).

„Bis heute gibt es keine diagnostischen Tests, die das Vorhandensein infektiöser Viren zuverlässig nachweisen.“ [4, übersetzt]

Es wird behauptet, dass ein PCR-Test positiver „Fall“ mit einem infektiösen Individuum gleichzusetzen ist, aber das STIMMT NICHT → **Hier sind die FAKTEN**

- Die **Probenaufarbeitung für die PCR erfordert den vollständigen Aufschluss der biologischen Strukturen**, um Nukleinsäuren von Proteinen, Lipiden und Zelltrümmern abzutrennen. Bei allen Protokollen werden die Proben mit einem Gemisch aus hochgiftigen Chemikalien [5] behandelt, wodurch komplexe Organismen unweigerlich zerstört werden.
- Unabhängig vom angewandten Protokoll kann mit einer PCR ausschließlich auf das **Vorhandensein der durch das spezifische Primerpaar ausgewählten Zielsequenz(en)** getestet werden, die aber nur einen **Bruchteil des gesamten Virengensoms** repräsentiert. Somit kann eine PCR selbst bei ordnungsgemäßer Durchführung keinesfalls die Anwesenheit eines vermehrungsfähigen, infektiösen Virus mit intaktem Genom in der untersuchten Probe beweisen.
- Ein „positives“ PCR Testergebnis bedeutet **NICHT**, dass in der untersuchten Probe ein vermehrungsfähiges, infektiöses Virus vorliegt. Es ist nur als ein molekularer Indikator zu verstehen, der einen Anfangsverdacht be- oder entkräftet, der aber immer eine weiterführende Differenzialdiagnose unter Einbeziehung der Symptome des Patienten durch einen Arzt erfordert - wie dies auch bei JEDEM anderen Labortest der Fall ist!
- Es muss beachtet werden, dass die **Symptome einer Atemwegsinfektion durch eine Vielzahl verschiedener Viren** sowie Bakterien, Pilze und Protozoen, einzeln oder in Kombination, verursacht werden können. Generell basiert die Differentialdiagnose auf den klinischen Symptomen des Patienten, wobei Labortests, wie z.B. das Wachstum eines beteiligten Bakteriums in Kultur, dem Arzt zusätzliche Informationen liefern. Die **Untersuchung von Virus-Subtypen** ist von rein wissenschaftlichem Interesse, **hat für die klinische Routine aber keine Bedeutung**, da Anti-Virus-Therapien meist nur symptomatischer Natur sind, also unabhängig von Virus-Subtypen oder der Kombination verschiedener Viren. Dies ist ein klarer Unterschied zur Behandlung von Krankheiten, die durch Bakterien (z.B. Antibiotika), Pilze (z.B. Antimykotika) oder Protozoen (z.B. Antibiotika) verursacht werden.
- **Multiplex-Tests zur Erfassung eines breiten Spektrums von Erregern sind daher zwingend erforderlich, um zwischen verschiedenen Lungeninfektionen zu unterscheiden, die sich in ähnlichen klinischen Symptomen manifestieren**, oder um aus Gründen der Überwachung die aktuell zirkulierenden Erreger zu bestimmen [6]. Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR ist es möglich, auch RNA/DNA-Sequenzen eines unterrepräsentierten Erregers in einem komplexen Erregergemisch nachzuweisen, wie dies bei zwei der ersten fünf COVID-19 Patienten der Fall war [7]. Darüber hinaus ist es möglich, einen Erreger komplett zu übersehen, wenn die Probe zum Nachweis dieses Erregers nicht im Test enthalten ist.
- Schließlich besteht das Risiko falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse, die sowohl auf technischen als auch klinischen Fehlern beruhen können. Ein **PCR-positives Testergebnis bedeutet nicht automatisch, dass die getestete Person ein intaktes Virus in sich trägt und übertragen kann**. Diese Diskrepanz wird bei den so genannten asymptomatischen Personen, also PCR-positiv getesteten, aber gesunden Individuen deutlich, deren Testergebnis einen hohen Ct-Wert und somit eine niedrige

Ausgangskonzentration der Ziel-DNA in der untersuchten Probe aufweist. Die überwiegende Mehrheit dieser Individuen wird weder intakte Erreger in sich tragen, noch infektiös sein. Bei der geringen Menge der nachgewiesenen viralen Nukleinsäure handelt es sich entweder um Reste einer bereits überstandenen Infektion oder, was wahrscheinlicher ist, um ein falsch-positives Testergebnis aufgrund unsachgemäßer Probenbehandlung oder Verunreinigung.

Es wird behauptet, dass die PCR-Technik der „neue Goldstandard“ zum Nachweis einer Infektiosität ist, aber das STIMMT NICHT → **Hier sind die FAKTEN**

Der Goldstandard für die Bestimmung der infektiösen Viruslast ist die Reproduzierbarkeit eines bestimmten Virus in einer geeigneten Zellkultur [4]. Da der Umgang mit infektiösen Viren besondere Sicherheitsvorkehrungen erfordert, dürfen derartige Untersuchungen nur in dafür spezialisierten Labors durchgeführt werden und können daher nicht in der Routinediagnostik eingesetzt werden.

- In der Routinediagnostik kann aber **ersatzweise eine PCR** durchgeführt werden, um dem Arzt eine Entscheidungshilfe für die bestmögliche Weiterbehandlung des Patienten an die Hand zu geben. **Hierbei muss betont werden, dass das Ergebnis des PCR-Tests nicht als einfache Ja-Nein-Antwort verstanden werden darf, sondern zwingend die Festlegung eines so genannten Ct "Cut-off" Wertes erfordert.** Dieser muss im Vorfeld von einem Speziallabor ermittelt werden (durch Vergleich der PCR Ergebnisse mit den Ergebnissen aus der Zellkultur) und anschließend von dem Labor, das den PCR-Test durchführt, angepasst werden (durch Vergleich der PCR Ergebnisse mit den Ergebnissen aus externen Standards, welche inaktivierte Viren mit bekannten Konzentrationen enthalten).
- Während in der Klinik eine hohe Sensitivität angestrebt wird, um eine vermutete Infektion bei symptomatischen Patienten zu bestätigen oder auszuschließen, **kommt im Rahmen einer Epidemie die Spezifität eine wichtigere Rolle zu [8],** um zu vermeiden, dass gesunde Individuen mit falsch-positiven Testergebnissen unnötig in Quarantäne geschickt werden.
- Eine hohe Empfindlichkeit geht mit einem starken Engpass in der PCR Leistung einher. Selbst bei einer 100%igen Spezifität, d.h. wenn es keine falsch-positiven Ergebnisse gibt, bedeutet dies lediglich, dass keine anderen Sequenzen als die ausgewählte(n) Zielsequenz(en) amplifiziert werden. Bei der Routineanwendung (d.h. außerhalb zertifizierter Speziallabore) **werden Verunreinigungen und Handhabungsfehler jedoch unweigerlich zu einigen falsch-positiven Testergebnissen führen.**
- Wie zuvor bereits angemerkt erfordert die absolute Quantifizierung der Virenlast in einer bestimmten Probe die Durchführung einer qPCR unter Einbeziehung einer Verdünnungsreihe mit bekannten Mengen inaktiver Viren. Im Anschluss daran kann der Ct-Wert einer unbekannten Probe mit den Ct-Werten aus der Verdünnungsreihe verglichen werden, um die darin enthaltene Menge an Viruspartikeln abzuschätzen. **Ein positives PCR-Signal lässt alleine keine Rückschlüsse auf eine mögliche infektiöse Viruslast zu, sofern kein Ct-Wert vorliegt,** der das Ergebnis spezifisch zu einer definierten Standardkurve in Beziehung setzt [9].
- Da die reverse Transkription, die Priming-Bedingungen und die Sekundärstrukturen an den Primer-Bindungsstellen stochastische Prozesse darstellen, **kann der Ct-Wert zwischen verschiedenen PCR-Ansätzen und verschiedenen Laboren variieren.** Ein Vergleich mit Referenzgenen in bekannten Konzentrationen ist daher zwingend erforderlich, um die relative Quantifizierung zwischen verschiedenen Laboren zu messen.
- Eine mögliche Vermehrungsaktivität eines Virus innerhalb eines getesteten Individuums könnte durch einen RT-PCR Assay erfolgen, der auf dem Nachweis von subgenomischer RNA (sgRNA) basiert, die ausschließlich während der Virusreplikation in infizierten Zellen gebildet wird. Da sgRNA jedoch auch noch Tage und Wochen nach einer Infektion nachgewiesen werden kann, deutet das Fehlen von sgRNA zwar auf das Fehlen einer viralen Replikation hin, das Vorhandensein von sgRNA lässt aber nicht zwingend auf eine Infektiosität schließen [10].

Es wird behauptet, dass PCR-Massentests eine geeignete Methode zur Überwachung der Verbreitung von Viren und der Gesundheit der Bevölkerung darstellen, aber das STIMMT NICHT → **Hier sind die FAKTEN**

- Da die PCR nicht in der Lage ist, nachzuweisen oder vorherzusagen, ob ein positiv getestetes Individuum intakte Viren in sich trägt oder diese übertragen kann, **sollten PCR-basierte Labortests niemals zur Überwachung einer gesunden Bevölkerung verwendet werden, mit dem ausschließlichen Ziel, eine bestimmte Nukleinsäuresequenz eines beliebigen Erregers nachzuweisen.**
- Jeder Labortest, selbst wenn er sowohl eine hohe Spezifität als auch eine hohe Sensitivität aufweist, **führt zu falsch-positiven Ergebnissen, die bei einer niedrigen Prävalenz (Zahl der tatsächlich infizierten Individuen) sogar die Zahl der richtig-positiven Ergebnisse übersteigen können**, wie es bei Massentests von gesunden Individuen der Fall ist [11].
- **Positiv getestete, gesunde Personen weisen typischerweise eine niedrige Ausgangskonzentration der Ziel-DNA auf**, die mit hohen Ct-Werten verbunden sind. Selbst wenn das Testergebnis korrekt ist, **sind diese Individuen nicht infektiös, sondern stellen klinisch Falsch-Positive dar**, die entweder aus genesenen Personen bestehen, die noch Virusreste in sich tragen, oder aus immunen Personen, die aufgrund ihrer niedrigen Viruslast nicht ansteckend sind [12].
- Kaum beachtet wird, dass ein **hoher Durchsatz (z.B. aufgrund unspezifischer Massentests)** mit immer demselben PCR-Ansatz in den Testlaboren zu einem starken Anstieg des Risikos von Handhabungsfehlern und der Entstehung großer Mengen an Aerosolen führt [13]. Letztere können nachfolgende PCR-Ansätze verunreinigen und so **zu vermehrt falsch-positiven Testergebnissen führen**. Dies wurde in der Tat für COVID-19 Tests berichtet.
- Die einzige Möglichkeit, falsch-positive Testergebnisse auf nahezu Null zu reduzieren, ist die Durchführung einer **Sanger-Sequenzierung** [14], die auch **von der WHO empfohlen** wird [15]. **Unvermeidbare Verunreinigungen können aber auch in diesem Fall falsch-positive Testergebnisse nicht vollkommen ausschließen.**

Es wird behauptet, dass bei neuen Virenvarianten generell mit einer erhöhten Infektiosität und Mortalität zu rechnen ist, aber das STIMMT NICHT → **Hier sind die FAKTEN**

- Neue Virus-Subtypen zeichnen sich durch kleine Veränderungen in ihrer Nukleinsäuresequenz aus, die NICHT automatisch mit einer erhöhten Infektiosität einhergehen müssen. Darüber hinaus ist eine erhöhte Infektiosität NICHT zwangsläufig mit einer erhöhten Mortalität verbunden. **Ganz im Gegenteil tendieren evolutionär erfolgreiche Viren dazu, mit jeder weiteren Mutation mehr ansteckend, aber weniger gefährlich zu werden.**
- **Möglicherweise sind neue Virus-Subtypen auch gar NICHT neu für unser Immunsystem**, da frühere Kontakte mit Viren aus derselben Virusfamilie bereits zu einer Kreuzimmunität geführt haben können. Dies wurde tatsächlich für SARS-CoV-2 in aufbewahrten Blutspenderproben aus der Zeit vor COVID-19 nachgewiesen [16,17,18].

Literatur [1] <https://www.nytimes.com/1998/09/15/science/scientist-at-work-kary-mullis-after-the-eureka-a-nobelists-drops-out.html>, [2] [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90469-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90469-4), [3] <https://www.facebook.com/nico.davinci.56/videos/1749227998568399/>, [4] <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>, [5] <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>, [6] <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013665>, [7] <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000722>, [8] <https://doi.org/10.1007/s10441-020-09393-w>, [9] <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114102>, [10] <https://doi.org/10.15252/emmm.202115290>, [11] <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.10.003>, [12] <https://doi.org/10.1136/bmj.m3862>, [13] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15648778/>, [14] <https://publichealthpolicyjournal.com/volume/v4-2019-2024/>, [15] <https://www.who.int/news/item/20-01-2021-who-information-notice-for-ivd-users-2020-05>, [16] <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>, [17] <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>, [18] <https://doi.org/10.1126/science.abh1823>. Weiterführende Details zur PCR Technik: <https://doi.org/10.56098/ijvtp.v3i1.71>.