

Ablauf der Corona-PCR-Testung

Was passiert nachdem man erfolgreich in das Röhrchen gespuckt hat? Wie lange kann die Probe herumliegen? Wie lange dauert eine Testung und welche Leute sind involviert? Wenn ihr euch seit Monaten fragt was denn mit dem Röhrchen mit der roten Kappe genau passiert, findet in den folgenden Zeilen einige Antworten!

Das Gurgulat

Der Ablauf des Gurgelns dürfte mittlerweile den meisten geläufig sein. Salzlösung in den Mund, eine Minute spülen und ab ins Probenröhrchen. Doch was hat es mit dieser **Kochsalzlösung** auf sich? Die Antwort ist recht einfach: Die Flüssigkeit im Inneren einer Zelle, also dort wo das Virus zu Hause ist, enthält ebenfalls Salz. Aufgrund eines chemischen Ungleichgewichts würden die Zellen platzen, wenn man sie einfach in Wasser aufbewahren würde. Das hätte zur Folge, dass das genetische Material des Virus, welches für den Nachweis benötigt wird, frei und ungeschützt im Wasser schwimmen und den Transport nicht unbeschadet überstehen würde.

Um eben das zu vermeiden, simuliert man die natürliche Umgebung der Zellen durch Salzwasser, genauer handelt es sich um eine 0,9 prozentige NaCl-Lösung, die genau der Salzkonzentration in unseren Zellen entspricht. Man spricht auch von einer „physiologischen Salzlösung“. Sie sorgt dafür, dass die Zellen und das potenziell darin enthaltene Virus bis zur Ankunft im Labor gut verpackt bleibt.

Und was ist jetzt dieser **Pufferlösung** – also die Flüssigkeit, in die ihr das Gurgulat hineinspuckt? Nochmal Salzlösung. Warum die Probe weiter verdünnt wird, kann man nur mutmaßen. Es ist jedoch bekannt, dass zu dickflüssige oder verunreinigte Proben zu Problemen bei der Weiterverarbeitung führen. Dazu unten mehr.

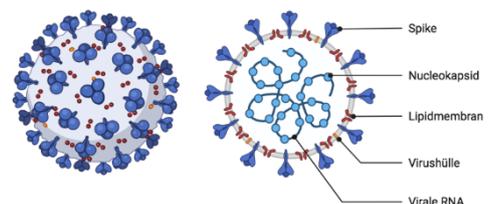
Die weite Reise

Um möglichst gut zu bestimmen, ob und wie viele Viren man in sich trägt, sollte die Probe nun möglichst schnell in das Labor und in den Kühlschrank. Studien zeigen uns aber, dass auch nach ca. 48h bei Raumtemperatur noch die Hälfte aller infektiösen Viren vorhanden ist. Es ist also genug Zeit, um die Proben auch ohne teuren Kühltransporter von der Abgabestelle in das Labor zu befördern. Dort kommt die Probe allerdings spätestens 24h nach der Abgabe dann wirklich in den Kühlschrank.

Dann geht es nach dem Abliefern erst einmal ans Auspacken. Also alles bis auf das Röhrchen wird entsorgt und das Röhrchen kühl gestellt. Je nach Testlabor kann der Ablauf hier ein bisschen variieren. Im Fall des größten Wiener Testlabors, das derzeit täglich bis zu 400.000 Proben auswertet, werden die Röhrchen nach dem Auspacken in speziellen Öfen erhitzt, um potenzielle Coronaviren abzutöten. Anschließend geht es endlich mit dem Testen los.

Die Waschmaschine

Naja ok, noch nicht ganz. Ein Problem gäbe es da nämlich noch. Denn für den Nachweis wird die RNA, also das genetische Material der Viren benötigt. Jedoch sind die meisten Viren noch innerhalb eurer Zellen, die ihr ins Salzwasser gespuckt habt. Dem nicht genug, schützt das Virus seine RNA auch noch mit einer stabilen Hülle. Also müssen die Zellen und die Hülle erst mal weg.



Diesen Vorgang nennt man **Extraktion**. Und damit man nicht jede Probe einzeln „waschen“ muss, gibt es dafür Maschinen. Wie genau das funktioniert würde hier zu viel Platz benötigen, aber stellt euch einfach vor ihr habt eurer Lieblingsshirt so verdreckt, dass man die Aufschrift nicht mehr lesen kann. Ab in die Maschine und die erledigt das für uns. Ungefähr so ist das auch mit der Virus-RNA, nur dass hier anstelle des T-Shirts die RNA gereinigt und vom Zellschmutz befreit wird.

Die Proben müssen dafür aber noch in spezielle Behälter überführt werden und auch nur eine genau definierte Menge (circa 1/3 ml) davon, damit die Maschine die richtige – vorher genau eingestellte – Menge an Chemikalien hinzufügt und sie für das passende Verhältnis nicht immer neu eingestellt werden muss.

Nachdem der Barcode auf dem Röhrchen noch gescannt wurde, damit auch dem Computer klar ist welche Probe er bekommt, kann das Umfüllen ebenfalls ein Roboter übernehmen. In manchen Labors machen das auch noch LabormitarbeiterInnen mit der Pipette selbst.

Die Küche

Von der Waschmaschine bekommen wir nach circa 30min unsere gereinigte RNA. Die muss jetzt noch mit den PCR Reagenzien vermischt werden und zwar jede Probe einzeln. Hier wird bereits in allen Analyselaboren¹ ein Roboter eingesetzt, da dieser Schritt bei vielen Proben zu viel Zeit in Anspruch nehmen würde. Der Roboter benötigt für einen Durchgang circa eine halbe Stunde.

Ist das auch getan, kann die PCR² (Polymerase Chain Reaction) starten. Dafür kommen die Proben eine Stunde in den Thermocycler. Dieser ändert die Temperatur so, dass die PCR Reaktion ablaufen kann. Aber was heißt das für unsere Probe? Unter der PCR kann man sich einen Kopiervorgang für RNA (oder auch DNA) vorstellen, der aus ganz wenig Viren-RNA so viel Material macht, dass es von einem Computer gemessen werden kann. Genaugenommen wird die RNA zuerst in cDNA (= complementaryDNA also komplementäre³ DNA) umgeschrieben und diese dann vervielfältigt. Kann am Ende der Reaktion immer noch nichts gemessen werden, kann man davon ausgehen, dass in der Probe auch keine Virus RNA vorhanden war. Die Probe wird als negativ erkannt. Waren in der Probe Viren enthalten wird die Vervielfältigte Corona-RNA vom Computer positiv angezeigt.

Der Papierkram

Die Ergebnisse können nun weitgehend automatisch mit dem Computer analysiert werden. Zur Sicherheit überprüft jedoch noch ausgebildetes, medizinisches Fahrpersonal die Computerdaten. Ist hier alles ok, wird das Ergebnis freigegeben und du bekommst deine Benachrichtigung, dass du es abrufen kannst!

¹ Eine Ausnahme bilden hier lediglich ganz kleine Testlabore, die direkt in Arztpraxen oder Apotheken eingerichtet wurden.

² Mehr zu den einzelnen Corona-Testmethoden kann man hier nachlesen: <https://www.openscience.or.at/link/Coronatetst>

³ Das heißt die entstandene cDNA entspricht dann der gleichen Sequenz wie die RNA.

Questions & Answers⁴

1. Können auch Fehler bei PCR-Nachweisen passieren?

Kurz gesagt ja. Fehler sind nie ausgeschlossen. Sowohl Menschen, als auch Maschinen, machen Fehler. Aber dafür gibt es Kontrollsysteme.

Eine negative Probe kann ein falsch-positives Ergebnis zeigen, wenn nicht sauber gearbeitet wurde und die Probe selbst oder die verwendeten Reagenzien mit dem Material einer anderen Probe verunreinigt wurden. Bei geschultem Personal und geeigneten Robotern kommt dies allerdings so gut wie nie vor. Zur Sicherheit wird aber jede Probe, die als positiv erkannt wurde, gleich darauf noch einmal getestet.

Eine positive Probe negativ zu bekommen ist fast unmöglich. Zwar kann es sein, dass durch Verunreinigung die PCR-Reaktion komplett ausfällt, durch eine gleichzeitig durchgeführte Kontrollreaktion (die sogenannte Positivkontrolle) erkennt dies der Computer jedoch und gibt die Probe als ungültig aus.

2. Könnte es sein, dass die PCR Tests nicht gültig sind, wenn man sie in kalten bzw. warmen Orten aufbewahrt?

Ja und nein. Ungültig nicht direkt, da die Reaktion mit dem Material noch durchführbar ist. Jedoch könnte das genetische Material des Virus so beschädigt werden, dass es nicht mehr erkannt werden kann. Falsche Lagerung kann also dazu führen, dass deine Probe negativ wird, obwohl ursprünglich Viren vorhanden waren.

Höhere Temperaturen führen hier schnell zu Problemen. Im Kühlschrank hingegen ist deine Probe länger, manchmal sogar mehrere Tage noch gut zu gebrauchen. Grundsätzlich gilt aber, so schnell wie möglich ins Labor damit. Zusätzlich zerstört Licht genetisches Material sehr schnell.

3. Wieso beeinflussen gewisse Getränke/Speisen das Ergebnis? Warum soll man 30min davor nicht essen?

Essen besteht aus verschiedensten chemischen Substanzen. Manche Stoffe zerstören die RNA bevor sie überhaupt untersucht werden kann. Zu viele Fette in der Probe können wiederum die Aufreinigung der viralen RNA an ihre Grenzen bringen.

Vor allem Säuren aus Erfrischungsgetränken oder Früchten können zum Ausfall der Reaktion führen, da sie die Enzyme, welche für eine PCR eingesetzt werden daran hindern zu arbeiten. Und das nur, um einige Beispiele zu nennen. Am besten ist es, die Probe so sauber wie möglich und nur mit deinen Zellen zu beladen, denn genau dafür wurden die Aufreinigungsmaschinen entwickelt.

4. Wieso hat man nicht von Anfang an die PCR verwendet?

Das hat man tatsächlich. Das Corona Virus wurde das erste Mal mit einer PCR erkannt. Man hatte nur gehofft, dass auch Antigen-Tests einmal ausreichen könnten, denn PCR-Reaktionen sind sehr teuer und man muss länger auf das Ergebnis warten. Nichtsdestotrotz ist die PCR die zuverlässigste Nachweismethode, die es gibt.

⁴ Die hier aufgelisteten Fragen wurden im Rahmen des Vienna Online Lab PCR-Kurses im Winter 2021 gesammelt.

5. Wie oft muss man eine Probe vervielfältigen, bis sie nachgewiesen werden kann?

Derzeit verwendet man 35-40 Zyklen. Sprich die RNA wird 35-40 mal verdoppelt. Wird dann immer noch keine Virenlast erkannt, kann man davon ausgehen, dass kein Virus vorhanden war.

6. Warum muss man die Menge vervielfältigen? Warum nicht einfach ein bessere/sensibleres Gerät bauen?

Das Problem ist, dass man nicht ausschließlich die SARS-CoV RNA isolieren kann. Die Probe enthält nach der Reinigung nicht nur Virus-RNA, sondern auch die DNA und RNA all deiner Zellen. Man sucht also quasi die Nadel im Heuhaufen. Durch den Kopiervorgang (bei dem ganz spezifisch nur die SARS-CoV2-RNA kopiert wird) wird das Verhältnis an Virus-RNA im Gemisch erhöht und diese somit detektierbar.

7. Was ist die minimale Menge, die man braucht?

Theoretisch reicht ein einziger Virus in der Probe aus, um sie als positiv zu erkennen. Die tatsächliche Menge, ab der ein Nachweis erfolgen kann hängt aber auch von der Probenqualität ab (siehe auch Frage 3.).

8. Wieso sollen frisch Genesene nicht testen?

Frisch Genesene sollten auf jeden Fall testen. Das ist auch notwendig, um zu bestimmen, dass sie genesen sind.

9. Bei welcher Virenlast ist man wie infektiös?

Das lässt sich nicht so einfach sagen, hier spielen auch andere Faktoren eine große Rolle. Des Weiteren ist die tatsächliche Virenlast nur sehr schwer bestimmbar. Als Referenzwert für die Virenlast wird oft der CT-Wert (Cyclethreshold) angegeben. Das ist die Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, um die cDNA so weit zu vervielfältigen bis ein eindeutiges Signal gegeben werden kann. In der Regel wird also ein höherer CT-Werte mit einer geringeren Virenlast gleichgesetzt.

Um die genaue Virusmenge bestimmen zu können, müsste man aber auch sicher gehen, von jedem Menschen gleich viel Probenmaterial zu entnehmen. Da nicht jede*r gleich gurgeln kann, ist der Vergleich von CT Werten zweier verschiedener Proben immer mit Vorsicht zu behandeln. Statistisch kann man jedoch auswerten, dass Menschen über einem CT von 30 kaum dazu neigen, infektiös zu werden.

10. Der Ct-Wert gibt an wie hoch die Viruskonzentration in der Untersuchungsprobe ist, sagt er somit aus, wie stark man sich infiziert hat?

Nein. Er lässt Rückschlüsse auf die relative Virenlast in der Probe zu. Aber auch diese sind nur statistisch und auf die Population zu betrachten. Es fehlen Referenzwerte für die einzelnen Proben und ein standardisiertes Abstrichverfahren um für einzelne Personen Rückschlüsse auf die genaue Viruskonzentration ziehen zu können.

11. Wie viele Vermehrungszyklen laufen durchschnittlich bei einem Test ab?

30-40 Zyklen

12. Gibt es Unterschiede zwischen Hals-Rachen, Nasenabstrich und gurgeln/spülen?

Grundsätzlich haben alle Methoden gezeigt, dass sie ausreichend sind um eine Infektion nachzuweisen. Hals-Rachen Abstriche werden aber von geschultem Personal durchgeführt und es kommt zu einer geringeren Verunreinigung durch Essensreste oder Ähnlichem. Gleichzeitig wird sichergestellt, dass genug Material aufgenommen wird. Eine gute Vorbereitung für eine sichere PCR ist damit sichergestellt.

13. Was wird mit der Probe gemacht, um festzustellen, ob man Corona hat und wie lange dauert das?

Siehe Erklärung der Corona Testung. Die eigentliche Testung mit Verifizierung und ohne Poolung dauert in etwa 4h.

14. Kann die PCR nicht mehr anschlagen, wenn das Virus zu viel mutiert?

Theoretisch ja. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich dabei noch um ein infektiöses Coronavirus handelt sehr gering. Das Virus hat mehrere Gene. Eines davon, das Gen für das berühmte Spike-Protein, neigt eher zu Mutationen, da hier eine Anpassung an den Wirt zu einer verbesserten Aufnahme in die Wirtszelle führen und damit vorteilhaft für das Virus sein kann. Würde man bei der PCR das Spike-Gen testen bekäme man tatsächlich schnell ein Problem mit Mutanten.

Bei der PCR testet man jedoch Gene, die nicht dazu neigen zu mutieren, weil das Virus ohne sie nicht lange existieren könnte und eine Mutation somit fatal wäre. Meistens handelt es sich hier um N-Gene (für Nukleoprotein) und E-Proteine (für Envelope) oder die Reverse Transkriptase (Rpd-Gene).

15. Kann man die PCR verwenden, um jede andere Virus-Art nachzuweisen

Ja, mit dem Grippevirus ist das auch bereits seit Jahrzehnten gängige Praxis und eine Testung auch bei jedem Diagnoselabor möglich (leider nicht gratis).

16. Kann die PCR alleine erkennen, welche Virusvariante ich habe?

Mit dem regulären Corona-PCR-Test nicht. Allerdings kann mit SARS-CoV-2-positive Proben eine weitere, sogenannte Multiplex RT-PCR, durchgeführt werden. Dabei werden gleichzeitig mehrere Abschnitte im Virus-Genom, die sich bei den einzelnen Varianten aufgrund von Mutationen unterscheiden, vervielfältigt. Aus der Kombination dieser Mutationen (bzw. der positiven PCR-Signalen für die einzelnen Abschnitte) können Rückschlüsse auf die möglicherweise vorliegende Variante bzw. Mutations-Genotypen gezogen werden.

Weiters können Mutanten mit Hilfe der PCR-Schmelzkurvenanalysen identifiziert werden. Hier wird nach der PCR die Temperatur im Probenröhrchen langsam erhöht bis die Temperatur erreicht ist, an der sich die beiden DNA-Stränge der PCR-Produkte voneinander lösen. Diese Temperatur bzw. der Verlauf der Schmelzkurve ist abhängig von der Sequenz. Um ganz sicher zu gehen, kann man das PCR Produkt auch sequenzieren, das ist aber sehr teuer.

17. PCR-Tests sind sicherer als Antigen-Tests. Wie kann es sein, dass manchmal der Antigentest positiv aber der PCR-Test negativ ist?

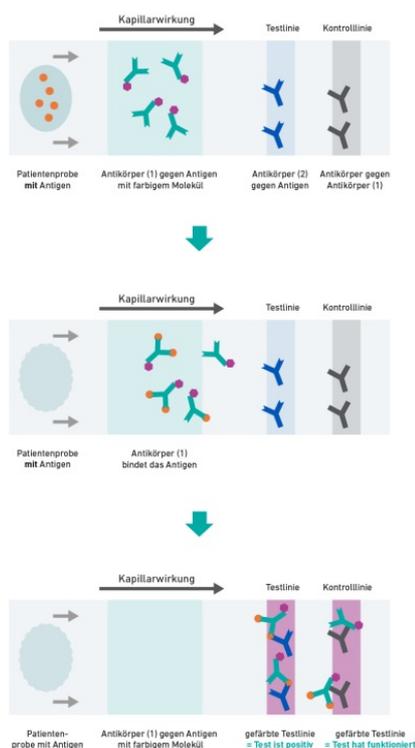
Kurz gesagt: andere Stoffe, die in der Probe enthalten sind, können dazu führen, dass die Farbreaktion am Test ausgelöst wird.

Dazu muss man sich näher anschauen, wie der Antigentest funktioniert. Er besteht aus einem Papierstreifen auf dem sich Antikörper befinden, die mit einem Farbstoff versehen sind und spezifisch Teile des Coronavirus erkennen bzw. daran binden. Wird Flüssigkeit auf das Testfeld aufgetragen, zieht die Kapillarkraft diese in Richtung Testlinie [T] und Kontrolllinie [C]. Dabei nimmt die Flüssigkeit auch die oben erwähnten Antikörper mit. Diese können an sich nicht an den Teststreifen binden und schwimmen weiter zur Kontrolllinie, wo sie immer binden und dadurch eine Farbreaktion hervorrufen, die man mit freiem Auge sehen kann.

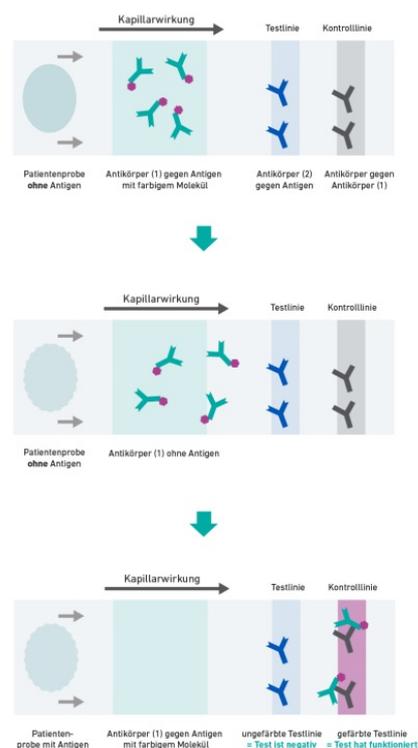
Enthält die Probe jedoch Corona-Viren binden diese die Antikörper und haften an ihnen. Der Komplex aus Antikörper und Corona-Antigen wird weiter zum Teststreifen gezogen, wo er nun binden kann. Somit ist der Antikörper indirekt an den Teststreifen gebunden und löst auch dort eine Farbreaktion aus. Diese indirekte Bindung kann unter Umständen auch von anderen Stoffen als dem Corona Virus hergestellt werden und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

Lateral Flow Test

Beispiel: positiver Nachweis



Beispiel: negativer Nachweis



Quelle: LADR Laborverbund Dr. Kramer & Kollegen

18. Muss das Testverfahren in irgendeiner Weise geändert werden, wenn man neue/andere Coronavarianten erkennen will?

Um nachzuweisen, dass es sich um einen SARS-CoV 2 Virus handelt nicht. Es werden meist nur Gene getestet, die von Mutationen nicht betroffen sind, zum Beispiel Gene für das N-Protein oder die Reverstranskriptase, die bei allen Varianten gleich sind.

19. Wie kommen falsche Ergebnisse bei Testungen zustande?

Bei der PCR durch menschliches Versagen. Durch die massive Anzahl an Proben und die hohe Sensitivität der Methode ist es leider nicht zu hundert Prozent auszuschließen, dass es beispielsweise zu Verunreinigung einer eigentlich negativen Probe mit Viruspartikeln aus einer positiven Probe kommt. Daher sollte ein positiver Test immer durch eine Wiederholung abgesichert werden.

20. Wieso schlägt der Test bei Geimpften/ Genesenen nicht an?

Weil die Gene von SARS-CoV 2 gesucht werden und nicht Indizien für die Immunantwort des Körpers. Beim PCR-Test werden nur bestimmte Genabschnitte der Virus-RNA kopiert und nachgewiesen. Der Impfstoff enthält andere Teile des Virus. Im Fall von Totimpfstoffen sind das Virusproteine. Vektor- und mRNA-Impfstoffe enthalten zwar Teile der Virus-RNA, auf die jedoch im Rahmen der PCR nicht getestet wird.

21. Wie schnell kann man den PCR- Test neuen Viren oder Virusmutationen anpassen?

Das ist nur nötig, wenn man wirklich spezifisch auf eine Variante testen will. Dann dauert es je nach Glück eine bis mehrere Wochen.

22. Wie funktioniert die Analyse des CT-Werts?

Bei der PCR zum Nachweis von SARS-CoV2 wird ein Fluoreszenzfarbstoff beigemischt, der erst aktiv wird, sobald er in einen – während der PCR neu synthetisierten – DNA Strang eingebaut wird. Das Fluoreszenzsignal nimmt also zu, je mehr Kopien des gesuchten Abschnittes (von Zyklus zu Zyklus) vorhanden sind. Um als detektiert zu gelten, muss das Signal der Fluoreszenz allerdings einen bestimmten Wert überschreiten. Die Anzahl der Zyklen, die notwendig sind bis das passiert bestimmt den CT-Wert.

23. Kann die Anzahl der Ct Werte feststellen, wie stark das Corona Virus sich auf den Körper auswirkt?

Nein. Hier spielen zu viele Variablen eine Rolle.

24. Wird jeder PCR Test einzeln untersucht?

Je nach Auslastung kommt es zur Poolung der Proben. Das heißt, es werden mehrere Proben gemischt und gleichzeitig getestet. Im Falle eines positiven Ergebnisses wird der Test für alle Proben im Pool einzeln wiederholt.

25. Können PCR-Tests frühere oder zukünftige Infektionen erkennen?

Nein. Für PCR Tests ist das virale Genmaterial notwendig.

26. Hat ein positiver PCR Test Auswirkungen auf die anderen Tests, die gleichzeitig untersucht wurden?

Nein. Außer im Falle einer Poolung. Hier werden mehrere Proben gemeinsam getestet. Es handelt sich dann um nur noch eine PCR Reaktion für alle. Ist also eine davon positiv, ist die gesamte Reaktion positiv. Die Proben aus dem Pool müssen dann noch einmal getrennt voneinander getestet werden.

27. Wie viele Labore arbeiten professionell mit dieser Methode, um in Wien die Leute auf Sars-Cov2 zu testen?

Neben unzähligen kleineren Laboren sind in Wien vier große Labore bekannt, die die Hauptlast der SARS-CoV 2 Testungen durchführen.

28. Besteht die Gefahr von einer Kontamination (das falsches DNA-Material in die Probe hineinfällt, wie z.B. Pilzsporen). Kann das das Ergebnis verfälschen?

Leider ja. Positive Proben sollten deshalb auch immer noch ein weiteres Mal überprüft werden.

Weitere hilfreiche Links zum Thema von Open Science:

<https://www.openscience.or.at/de/wissen/medizin-mensch-ernaehrung/2020-12-09-coronatests-pcr-test-antigentest-und-antikoerper-test-methoden-zum-nachweis-von-sars-cov2/>

<https://www.openscience.or.at/de/wissen/sonstiges/2021-11-09-was-bedeutet-der-ct-wert-bei-der-pcr/>

<https://www.openscience.or.at/de/wissen/medizin-mensch-ernaehrung/2021-02-04-nasenbohrertest-spucktest-gurgeltest-was-hinter-den-corona-selbsttests-steckt/>