



## Nachweis von Sars-CoV-2 Virus Varianten mittels orientierender Marker-RT-PCR

Zwei neuartige Varianten (Mutationen) des Coronavirus SARS-CoV-2 haben sich in den vergangenen Wochen massiv in Großbritannien B.1.1.7 und Südafrika B.1.351 verbreitet. Inzwischen sind beide Mutationen auch bei COVID-19-Erkrankten in Deutschland festgestellt worden. Eine dritte Mutante, erstmals in Brasilien entdeckt - B.1.1.28 -, könnte ebenfalls relevant für die Bevölkerung werden. Die Labore Deutschlands sind über die Coronavirus-Surveillanceverordnung des Bundesgesundheitsministeriums, die am 19.1.2021 in Kraft getreten ist, verpflichtet worden durch Ganzgenom-Sequenzierung diese Sars-CoV2 Varianten nachzuweisen. Derzeit sind diese Sequenzierungs-Kapazitäten allerdings in Brandenburg erst aufzubauen und somit setzen wir hier im CTK eine Überbrückungs-Methode ein, welche nicht mit der Sequenzierung vergleichbar ist. Diese Marker-PCR Methode kann aber relativ schnell eine sichere Orientierung geben, ob bestimmte Varianten auch bereits BB verbreitet sind.

Diese orientierende Marker-RT-PCR weist auf der Genom-Ebene (RNA) Veränderungen (Mutationen) im spike-Gen nach, welche auf der Aminosäureebene zur Veränderung des spike-Proteins führen. Nachgewiesen werden ein Aminosäure-Austausch in Position 501 der Aminosäuresequenz von N=Asparagin zu Y=Tyrosin und eine Deletion (Verlust) von 6 RNA-Basen mit der Folge das zwei Aminosäuren in den Position 69 und 70 der Aminosäuresequenz im spike-Protein fehlen. Aus der Kombination dieser beiden Mutationen können Rückschlüsse auf die möglicherweise vorliegende Virus Variante (Mutations-Genotypen) gezogen werden.

Vor Durchführung der RT-PCR muss bereits ein vorheriger positiver Nachweis des SARS-CoV-2-Virus vorliegen, der auch einen CT-Wert liefern sollte. Anschließend kann die orientierende RT-PCR den Wildtyp (Virus OHNE Mutation) von den unten genannten Varianten unterscheiden.

- 501N / keine Deletion = Wildtyp
- 501N / + Deletion = Cluster V oder Berchtesgaden
- 501Y / keine Deletion = möglicherweise South Africa- oder Brazilian Variante
- 501Y / + Deletion = wahrscheinlich B 1.1.7 variant (UK-variant)

Die Analytik für diese Marker-PCR läuft im Lightcycler über sogenannte „Schmelzkurvenanalyse“, welche die spezifischen Mutationsbereiche in „Schmelzkurven-Peaks“ sichtbar werden lassen (s. Abb.). Der Aufwand besteht im derzeit überwiegend per Hand notwendigen Pipettieren vor Durchführung des Lightcycler-Laufs. Weitere Mutationen, wenn relevant, werden sicherlich zukünftig auch über Marker PCR Teste nachweisbar werden und diese Marker-PCRs, da schnell im Ergebnis und auch in molekular-diagnostischen Laboren in Deutschland relativ einfach durchführbar, werden sicherlich noch umfassender von den Herstellern angeboten werden.

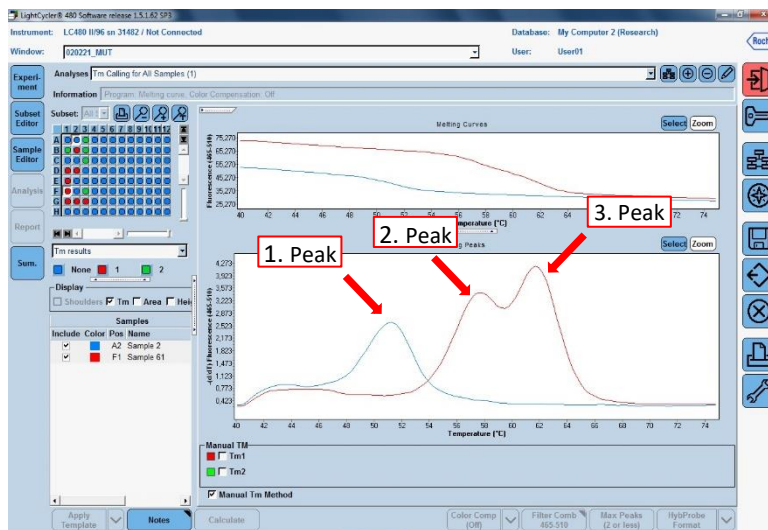


Abbildung 1 Lightcycler Schmelzkurve mit ausgewählter Probe

**Abb.1:** Lauf vom 28.2.21 mit 2 ausgewählten Proben (die jeweils durchgehende Linie entspricht einer Probe!):

- 1 x Wildtyp (nur Peak 1),
- 1 x B.1.1.7 (Peak 2 u. 3; Erstnachweis in BB!)

Mögliche Konstellationen in der Schmelzkurve:

- NUR 1. Peak = Wildtyp...KEIN Nachweis vom B.1.1.7
- Peak 1 UND 3 = Cluster V bekannt aus Berchtesgaden
- NUR 2. Peak = Südafrika und/oder Brasilianische Variante (NICHT abgebildet!)
- Peak 2 UND 3 = Nachweis der N501Y Mutation UND der Deletion, typisch für **UK Variante B.1.1.7**