



Stand 28.1.21 Jur/Pel

## ***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.

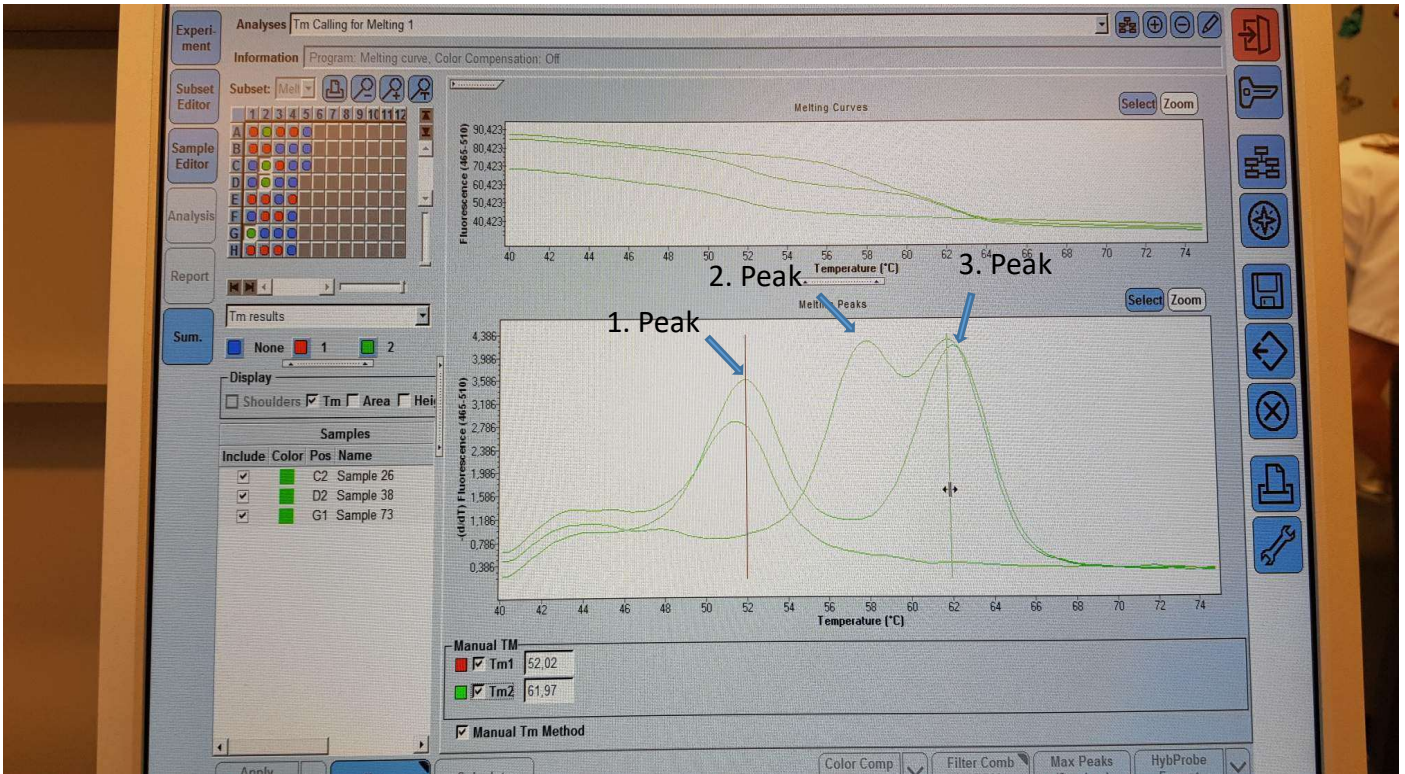
Vor Durchführung der RT-PCR muss bereits ein vorheriger positiver Nachweis des Sars-CoV-2-Virus vorliegen, der auch einen CT-Wert liefern sollte.

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 Berchtesgarden
- 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.



**Abb.:** Lightcycler Schmelzkurve mit ausgewählten Proben

Lauf vom 28.2.21 mit 3 ausgewählte Proben (die jeweils durchgehende Linie entspricht einer Probe!):  
 1x Wildtyp (nur Peak 1), 1x „Cluster Berchtesgaden“ (Peak 1 u. 3), 1x B.1.1.7 (Peak 2 u. 3; 1. Nachweis 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**