



Qualitativer molekularbiologischer Nachweis von SARS-CoV-2 mittels Multiplex real-time RT PCR-Verfahren



Markus Hergenroether, Judith Emmler, Tobias Kamholz

Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr München (Christoph-Probst-Kaserne)

Hintergrund

Die weltweite Ausbreitung von COVID-19 wurde am 11.03.2020 von der WHO zu einer Pandemie erklärt. Seither hält die Verbreitung von SARS-CoV-2 die Gesundheitsdienste sowohl in Europa als auch international in Atem. Das Robert Koch-Institut schätzt die Gefährdung für die Gesundheit der Bevölkerung in Deutschland unverändert als hoch, für Risikogruppen sogar als sehr hoch ein. Trotz erfolgreicher Eindämmung der Verbreitung des Virus durch bundesweite erhebliche „Lockdown-Maßnahmen“ im Frühjahr und Sommer 2020 besitzt der Erreger nach wie vor ein hohes Potenzial zur dynamischen Ausbreitung, sodass trotz Beginn der ersten Lockerungsmaßnahmen in Deutschland immer noch von einer hohen Ausbreitungstendenz ausgegangen und eine zweite Infektionswelle befürchtet wird. Der grobzeitliche Ablauf einer COVID-19 Infektion sowie die damit verbundenen diagnostischen Nachweismöglichkeiten sind in Abb. 2 dargestellt. Laborkapazitäten zum Nachweis einer Infektion mit COVID-19 im Bereich der Bundeswehr bestanden aufgrund fachlicher Kooperationen, u.a. mit der Charité Berlin, am InstMikroBioBw. Zur Entlastung des Gesundheitswesens der Bundeswehr im süddeutschen Raum wurde bereits kurz nach Beginn des Infektionsgeschehens unter Federführung der Abt F der SanAkBw München eine Kooperation am Standort München aufgebaut, um so zügig zusätzliche Laboruntersuchungskapazitäten zu schaffen. Gemäß Auftrag wurde die Methode hierzu zunächst an das ZInstSanBw München transferiert und in fachlichem Austausch mit den Laborfachärzten der Abt XXI BwKrhs Ulm Mikrobiologie/Krankenhaushygiene und unter Heranziehung von Vergleichsmaterialien und zusätzlicher Fachexpertise aus dem InstMikroBioBw erfolgreich validiert. Seit 27.04.2020 steht das Untersuchungsverfahren nunmehr auch in der Christoph-Probst-Kaserne in Garching als interdisziplinäres Laborverbundprojekt zwischen der Abt A des ZInstSanBw München und der Abt XXI des BwKrhs Ulm zur Verfügung. Durch wieder steigende Fallzahlen und dem damit verbundenen höheren Bedarf an Testkapazitäten wurde die Singleplex-Methode schließlich durch das Laborfachpersonal der Abteilung Veterinärmedizin in einer weiteren Validierung erfolgreich in ein Multiplex-Verfahren überführt. Hierbei kann ein höheres Probenaufkommen bearbeitet, Ergebnisse schneller und effizienter übermittelt und auch Personal- und Materialressourcen geschont werden. Zusätzlich wurde die Validierung der CoV-2 Diagnostik an mehreren PCR-Cyclern zur besseren Durchhaltefähigkeit etabliert.

Material

Molekularbiologische Diagnostik nach Aufreinigung von Patientenproben mittels Säulenaufreinigung und real-time RT PCR nach Empfehlung der WHO:

Probenmaterial: Tupfer von Nasen- und Rachenabstrichen, Virusmedium mit oder ohne Tupfer oder induziertes Sputum, Trachealsekret bzw. bronchoalveoläre Lavage

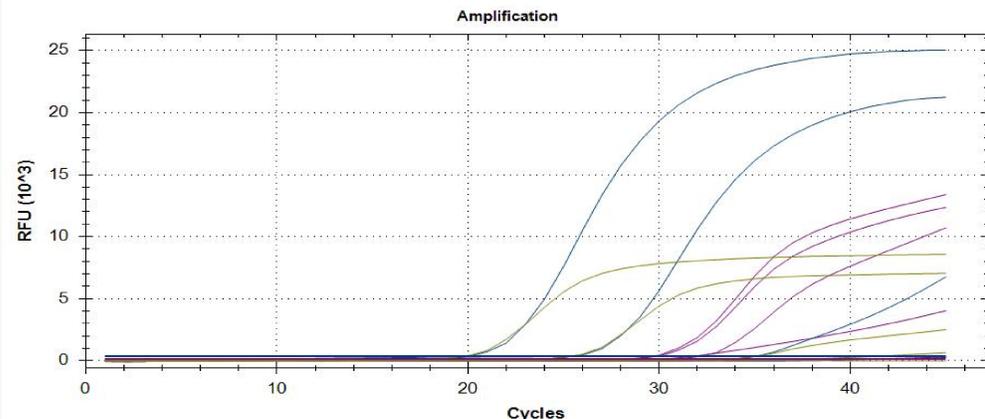
Aufreinigung: QIAamp®Viral RNA Mini Kit, Fa. Qiagen
Säulenaufreinigung nach Herstellerprotokoll

Quantitative Echtzeit PCR (RT qPCR):
96-well Plattenformat; CFX96 (Fa. BioRad)/LightCycler96 (Fa. Roche)
LightCycler® Multiplex RNA Virus Master, Fa. Roche

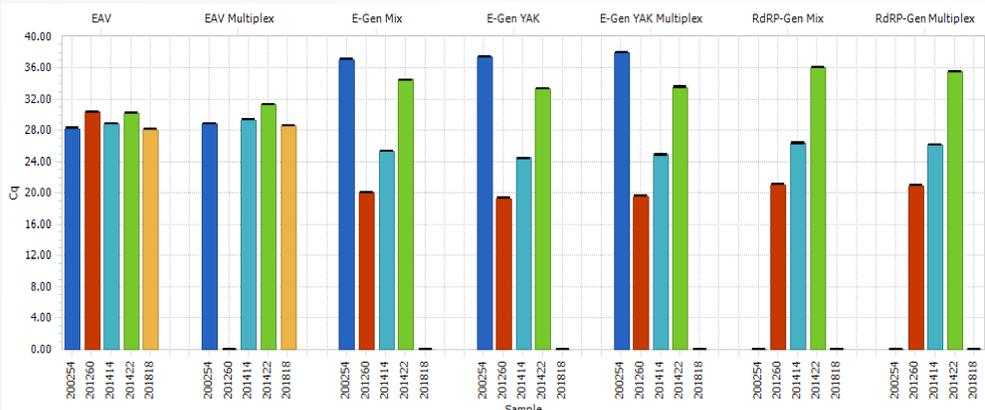
Design Primer-/Sondensequenzen:
TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH Berlin



Abb. 1:



A – grafische Darstellung einer Multiplexauswertung am CFX96



B – grafische Darstellung einer Auswertung am LC96 im Vergleich Singleplex- und Multiplexansätze

Diskussion

Warum kann ein Antikörpertest nicht die PCR Untersuchung ersetzen? siehe Abb. 2:

In der Frühphase der Erkrankung ist der Goldstandard zum direkten Virusnukleinsäurenachweis eine Untersuchung mittels RT-PCR. Ab dem Zeitpunkt der Serokonversion eignen sich auch Serologische Tests für epidemiologische Analysen oder stützen die PCR-Ergebnisse in der späten Akutphase, wenn die Sensitivität des Virusnachweises im Rachenabstrich bereits nachlässt. Antikörpertests werden erst nach Induktion einer spezifischen Immunantwort positiv. Ein Vorgang, der erregerspezifisch mehrere Tage bis Wochen dauern kann. Somit eignen sich Antikörpertests nicht für den Infektionsnachweis in der Frühphase der Erkrankung. Ein Antikörpertest kann daher bei der Abklärung einer akuten Infektion eine PCR-Untersuchung nicht ersetzen. So kann aber auch z. B. der Nachweis einer Serokonversion, also die erstmalige Nachweisbarkeit von Antikörpern, durch einen positiven Antikörper-Test eine bereits zurückliegende SARS-CoV-2 Infektion im Nachhinein nahelegen, auch wenn der Virusnachweis mittels PCR negativ war.

Literatur

1. Robert Koch Institut, COVID-19 (Coronavirus SARS-CoV-2)
2. Corman, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 25, 1–8 (2020).
3. Bundesministerium für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz, Anwendungsempfehlungen für den Nachweis von Antikörpern bei SARS-CoV-2, 14. Mai 2020
4. Drosten, C. et al. Evaluation of advanced reverse transcription-PCR assays and an alternative PCR target region for detection of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2043–2047, 2004.

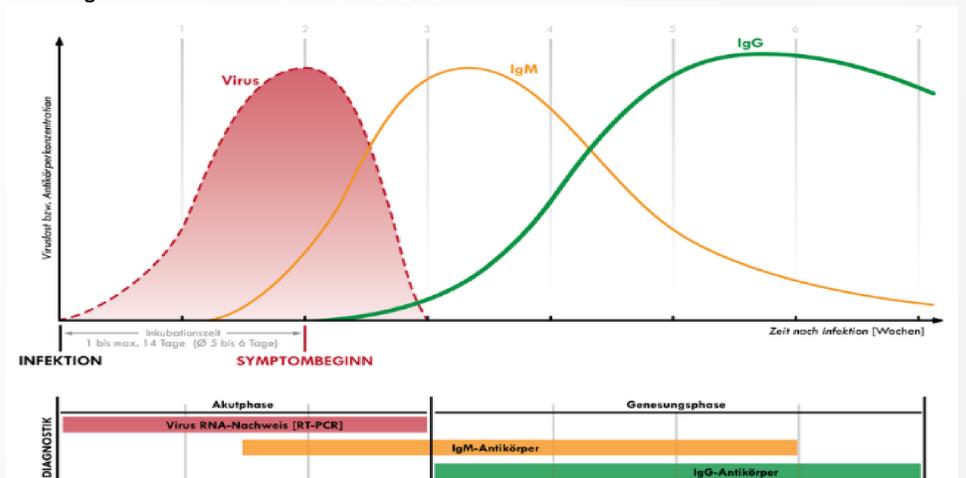
Validierung und Methode

Etablierte in-house Methoden, die nach den geltenden Vorgaben der WHO eingeführt werden, wie das durch die Charité Berlin in Zusammenarbeit mit TIB MOLBIOL Berlin publizierte Nachweisverfahren, beruhen auf dem Nachweis von 2 Gensequenzen. Hierbei ist das E-Gen selektiv für das Genus Betacoronavirus sowie das RdRP-Gen spezifisch für den Cladus SARS-CoV-2. Darüber hinaus muss durch eine zusätzliche interne Kontrolle, welche die Nukleinsäureextraktion und -amplifikation sowie die Integrität der Reagenzien prüft, die Validität der Testergebnisse sichergestellt werden. Bei dem von der Charité Berlin in Zusammenarbeit mit TIB MOLBIOL Berlin entwickelten Verfahren werden beide Genabschnitte, sowohl das E-Gen als auch das RdRP-Gen im FAM-Kanal bei 530 nm sowie die interne Kontrolle EAV im Cy5-Kanal bei 660 nm einzeln (Singleplex-Ansatz) nachgewiesen. Für die Validierung von Tupferproben aus den oberen Atemwegen sowie für Nachweise aus schleimigen Sekreten aus dem tiefen Respirationstrakt (Sputum, Trachealsekret etc.), die nur sicher durch eine Vorbehandlung mit Sputasol bzw. DTT möglich sind, wurde das eben beschriebene Verfahren angewendet. Im Anschluss an die erfolgreiche Validierung und Etablierung der Singleplex-Methode wurde das Verfahren durch das Laborfachpersonal der Abteilung A zu einem Multiplex-Verfahren weiterentwickelt, wobei weiterhin auf die bewährten TIB MOLBIOL Mixe des RdRP-Gen und der EAV-Kontrolle zurückgegriffen und mit folgender Primer- und Sondenkombination zum Nachweis des E-Gen gemeinsam eingesetzt werden:

| E-Gen | Primer/Sonde | Sequenz |
|--------------|--------------|------------------------------------|
| E_Sarbeco_fw | | ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT |
| E_Sarbeco_re | | ATATTGCAGCAGTACGCACACA |
| E_Sarbeco_S | | YAK-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ |

Hierdurch ist es möglich, in einem einzigen PCR-Ansatz sowohl das RdRP-Gen (530 nm), das E-Gen (580 nm) sowie die interne Kontrolle EAV (660 nm) sicher nachzuweisen. Die Abbildung 1 zeigt, dass die Ergebnisse (Cq-Werte) der Singleplex- und Multiplex-Ansätze nahezu identisch sind. Das Fluoreszenzsignal der internen Kontrolle EAV kann bei stark positiven Proben, wie bei Probe 201260, auch ausbleiben. Damit wurde diese Validierung der laborintern weiterentwickelten Multiplex-Methode ebenso erfolgreich abgeschlossen und in das Untersuchungsspektrum der Abteilung A implementiert und kann nun bei erhöhtem Probenaufkommen bedarfsorientiert eingesetzt werden.

Abb. 2: grobzeitlicher Ablauf einer COVID-19 Infektion



Fazit und Ausblick

Während die Einzelansätze in der PCR für ein erstes Screening mittels E-Gen, vor allem bei Routinetestungen von Sanitätspersonal in Sanitätseinrichtungen, vor stationärer Aufnahme (von Patienten) in ein BwKrhs oder zu Beginn von Grundausbildungen, gut eingesetzt werden können, stellt die Multiplex-Methode im Falle eines lokalen Ausbruchsgeschehens oder einer weiteren Infektionswelle mit hohen Zahlen an Neuinfektionen bzw. Testungen eine schnellere und effizientere und Ressourcen-schonendere Methode dar, die wie hier gezeigt werden konnte gleichwertig zum SARS-CoV-2 Nachweis eingesetzt werden kann. Eine Verdrängung der PCR durch Antikörpertests, deren Aussagekraft zumindest nach aktuellem Kenntnisstand bei alleiniger Anwendung nicht ausreichend ist, ist somit unwahrscheinlich, da sich beide Methoden im diagnostischen- und epidemiologischen Informationswert eher ergänzen.