

Vergleich unterschiedlicher Nukleinsäure-Amplifikationssysteme für SARS-CoV-2

Florian Gruber, MedUni Wien, Peter Hufnagl, AGES

18. März 2020

Im folgenden Bericht werden drei verschiedene Systeme zum Nachweis von SARS-CoV-2 mittels reverser Transkription und anschließender Amplifikation von Virus-spezifischer Nukleinsäure beschrieben.

Das aktuell in der AGES verwendete System erfasst das virale E- und -RdRp-Gen mit interner Kontrolle (EAV, Equine Arteritis Virus) entsprechend der WHO-Empfehlung: Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR (Victor M Corman et al., 2020) und ist ein „homebrew“-System bei dem Primer, Sonden und Kontrollen von TIB-MolBiol (Berlin) und Puffer/Enzym von Invitrogen SuperScript™ III One-Step RT-PCR System (ThermoFischer) zum Einsatz kommen.

Im ersten Ansatz („screening“) wird ein 76 Basenpaar langes Fragment des viralen E-Gens und die interne Kontrolle (EAV, Extraktions- und PCR-Kontrolle) erfasst.

Positive Proben bei der E-Gen-PCR werden zusätzlich mit RdRp (100 Basenpaare) zur Bestätigung getestet.

Das zweite System, ein „Schnelltest“ mit isothermer Amplifikation von MIRAI GENOMICS verwendet den SmartAmp 2nd Kit der Firma RIKEN (Japan).

Der dritte Testkit ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS verwendet das virale N-Gen als Zielsequenz und wird von der Firma Ingenetix (Wien) produziert.

Durchführung

RNA-Extraktion:

500mL AVL (Qiagen) mit Träger-RNA und 10µL der entsprechenden Extraktionskontrolle (EAV-RNA, TIB-MolBiol bzw. Ingenetix) wurden vorgelegt und mit 100µL Probenmaterial vermischt. Zur Inaktivierung und Lyse der Viruspartikel wurden diese Ansätze 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (geschüttelt). Die automatisierte Extraktion der viralen RNA wird in einem MagNA Pure Compact Gerät der Firma Roche durchgeführt (Total Nucleic Acid Isolation Kit, Roche, Ausgangsvolumen 400µL, Elutionsvolumen 50µL).

Die „Reverse Transcriptase real time PCR“ wurde mit einem LightCycler 480 (Roche) durchgeführt mit folgenden Temperaturprofilen und Einstellungen:

WHO: Corman et al. (aktuelles Routineverfahren der AGES)

Reverse Transkription: 10min 55°C, Denaturierung: 95°C 3min, 45 Zyklen: 94°C 15sec, 58°C 30sec

Detektion: E- und RdRp-Gen im 530nm-Kanal (FAM), interne Kontrolle im 670nm-Kanal (CY5)

H₂O, 2x Puffer, Primer-Sonden-Mix, Enzym-Mix, Endvolumen 25µL (inkl. 5µL Probe),

Isotherme Amplifikation: 99 „Zyklen“ je 20sec bei 67°C, Detektion: SARS-CoV-2 im 530nm-Kanal (FAM)

In einer 96-well Mikrotiterplatte (LC480, Roche) wurden pro Ansatz 4µL „reagent P“ (Primer Mix) vorgelegt und mit je 10µL isolierter RNA gemischt – anschließend je 6µL „reagent E“ (buffer, nucleotides and enzymes) zugegeben. Endvolumen 20µL (inkl. 10µL Probe).

Ingenetix:

Reverse Transkription: 15min 50°C, Denaturierung: 95°C 20sec, 45 Zyklen: 95°C 5sec, 60°C 30sec

Detektion: SARS-CoV-2 im 530nm-Kanal (FAM), interne Kontrolle im 670nm-Kanal (CY5)

H₂O, Reaction Mix, SARS-CoV-2 Assay Mix, Internal Control Mix, Endvolumen 20µL (inkl. 5µL Probe)

Die beschriebenen Testsysteme wurden einerseits für die Analyse von 94 Patienten-RNA-Proben, andererseits zur Bestimmung der Nachweisgrenzen (Verdünnungsreihe eines positiven RNA-Extraktes) verwendet.

Tabelle 1: Cp-Werte der drei Testsysteme (crossing points)

Pos	Sample	E-gene		internal ctrl		RdRp		MIRAI		Ingenetix	
		Cp	Status	Cp	Status	Cp	Status	Cp	Status	Cp	Status
A1	850449			32.52							
A2	850450			31.44							
A3	850451	21.92	positive	45.00	pass	33.72	positive	43.56	positive	20.94	positive
A4	850452			31.47							
A5	850453			30.32							
A6	850454			30.26							
A7	850455			32.46							
A8	850456			30.17							
A9	850457			31.89							
A10	850458			30.17							
A11	850459			30.18							
A12	850460	23.92	positive	40.38	pass	32.98	positive	45.96	positive	23.84	positive
B1	850461			30.49				75.70	positive		
B2	850462			30.35							
B3	850463			31.67							
B4	850464			32.26							
B5	850465			30.29							
B6	850466			30.47							
B7	850467			30.33							
B8	850468			32.14							
B9	850469			30.45							
B10	850470			32.28							
B11	850471			30.43							
B12	850472			30.68							
C1	850473	28.92	positive	30.58		41.68	positive	51.85	positive	27.19	positive
C2	850474			32.02							
C3	850475			31.83							
C4	850476			32.19							
C5	850477			30.64							
C6	850478			30.42							
C7	850479			30.21							
C8	850480	19.58	positive	42.72	pass	28.30	positive	41.70	positive	19.14	positive
C9	850481			31.86							
C10	850482			31.28							
C11	850483			31.42							
C12	850484			32.95							
D1	850485			31.48							
D2	850486			30.46							
D3	850487			31.30							
D4	850488			30.42							
D5	850489			30.35							
D6	850490			31.81							

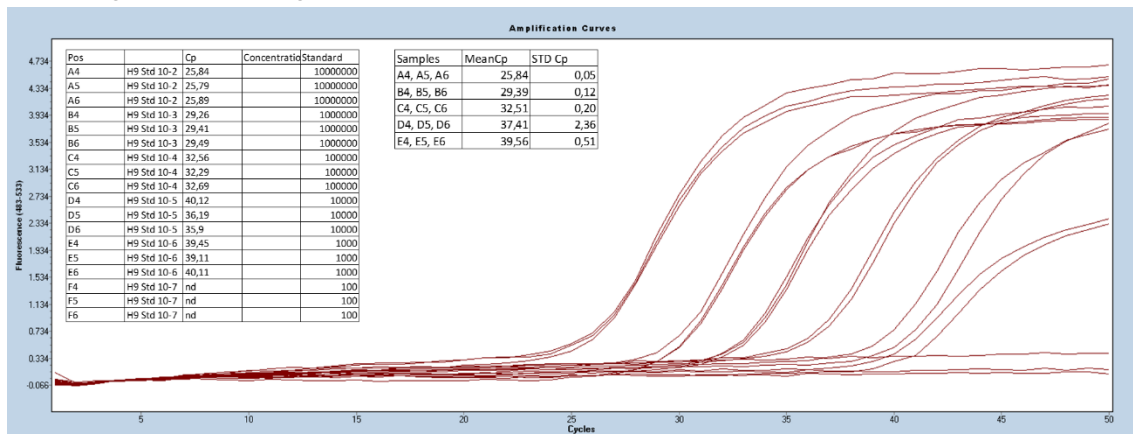
Tabelle 1 (Fortsetzung): Cp-Werte der drei Testsysteme (crossing points)

Pos	Sample	E-gene		internal ctrl		RdRp		MIRAI		Ingenetix	
		Cp	Status	Cp	Status	Cp	Status	Cp	Status	Cp	Status
D7	850491			31.67							
D8	850492			32.03							
D9	850493			30.21							
D10	850494			31.61							
D11	850495			30.27							
D12	850496			31.58							
E1	850497			30.89							
E2	850498			31.71							
E3	850499			31.72							
E4	850500	34.60	positive	30.34				82.32	positive	34.17	positive
E5	850501	32.77	positive	31.71		45.00	positive	67.74	positive	29.10	positive
E6	850502			30.45						35.50	positive
E7	850503			31.73							
E8	850504			31.44							
E9	850505			30.36							
E10	850506			31.33							
E11	850507			30.90							
E12	850508			30.74							
F1	850509			30.31							
F2	850510			30.45							
F3	850511	22.68	positive	41.31	pass	33.60	positive	41.52	positive	22.14	positive
F4	850512			32.01							
F5	850513			30.56							
F6	850514	35.02	positive	31.47				75.25	positive	31.22	positive
F7	850515			31.92							
F8	850516			30.20							
F9	850517			30.16							
F10	850518			31.68							
F11	850519			30.43							
F12	850520	21.64	positive		pass	33.35	positive	37.71	positive	18.90	positive
G1	850521			31.81							
G2	850522			32.02							
G3	850523			31.61							
G4	850524			31.94							
G5	850525			31.78							
G6	850526			32.04							
G7	850527			31.88							
G8	850528			31.32							
G9	850529			31.70							
G10	850530			31.08							
G11	850531	21.85	positive	45.00	pass	33.42	positive	45.97	positive	21.18	positive
G12	850532	29.04	positive	30.94		41.77	positive	49.39	positive	25.13	positive

Tabelle 1 (Fortsetzung): Cp-Werte der drei Testsysteme (crossing points)

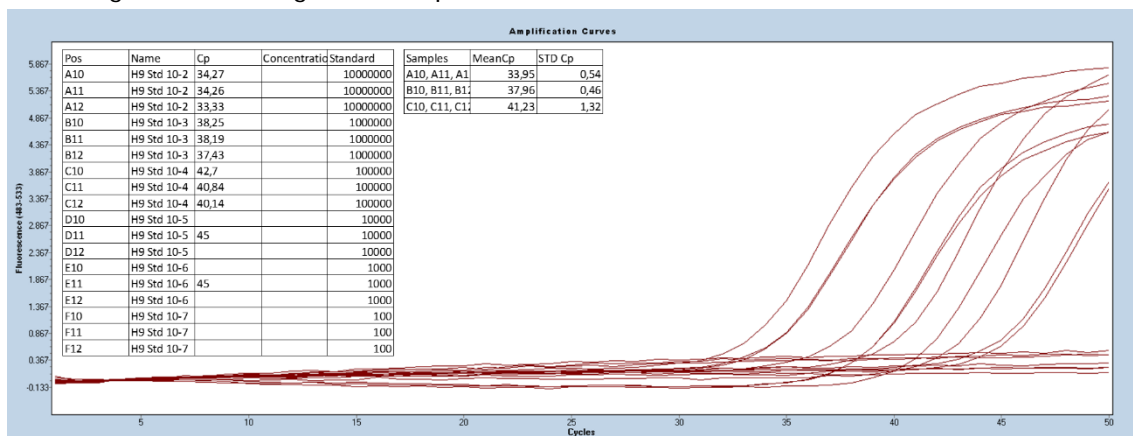
Pos	Sample	E-gene		internal ctrl		RdRp		MIRAI		Ingenetix	
		Cp	Status	Cp	Status	Cp	Status	Cp	Status	Cp	Status
H1	850533	24.54	positive	42.08	pass	37.09	positive	43.63	positive	20.87	positive
H2	850534	30.42	positive	31.66		41.88	positive	60.81	positive	26.57	positive
H3	850535			30.19							
H4	850536			30.77							
H5	850537			31.68							
H6	850538			30.16							
H7	850539			30.83							
H8	850541	27.10	positive	29.72		38.57	positive	49.10	positive	24.66	positive
H9	850543	18.77	positive	45.00	pass	28.44	positive	40.02	positive	18.07	positive
H10	850562	24.16	positive	42.73	pass	35.95	positive	43.03	positive	23.12	positive
H11	H2O		pass	30.51	pass		pass		pass		pass
H12	posKO	30.00	pass	29.86	pass	37.03	pass	72.81	pass	26.96	pass

Abbildung 1: Verdünnungsreihe E-Gen



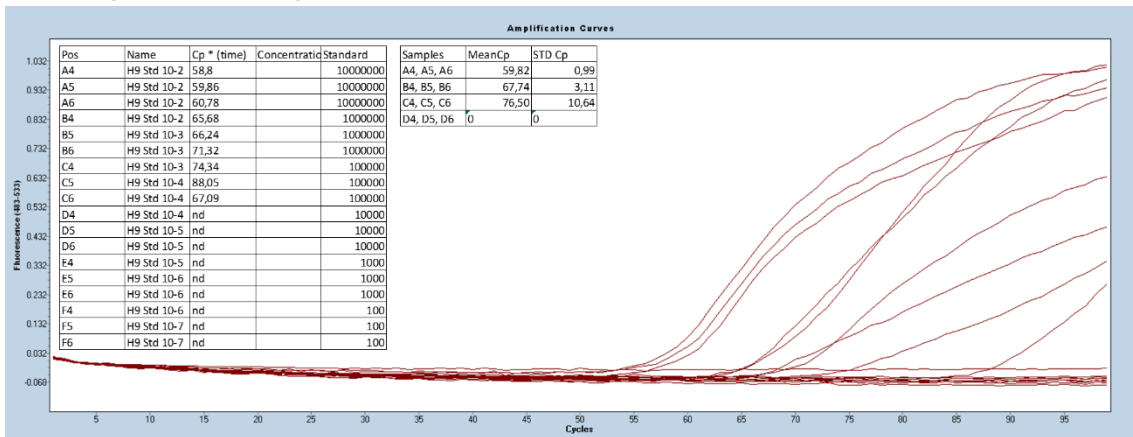
Detektionslimit bei Standard 10^{-6}

Abbildung 2: Verdünnungsreihe RdRp



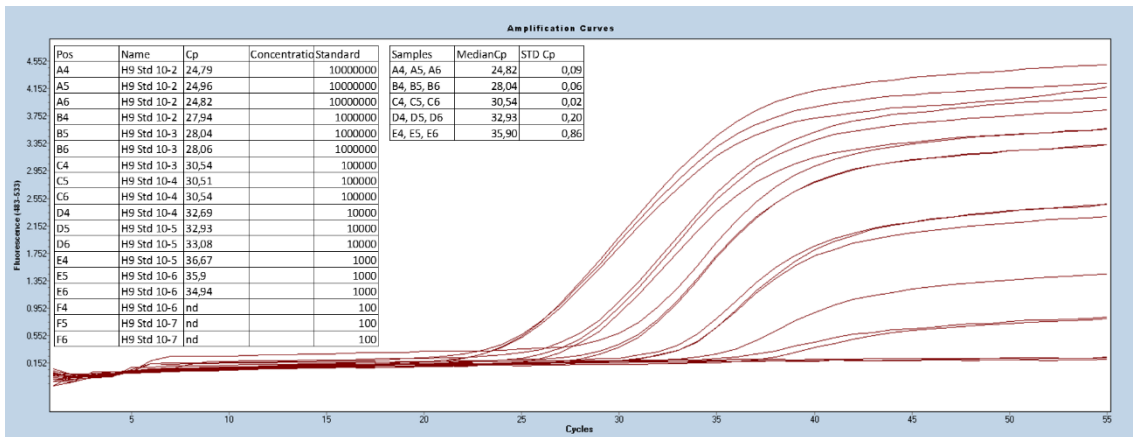
Detektionslimit bei Standard 10^{-4}

Abbildung 3: Verdünnungsreihe MIRAI (isotherme Amplifikation)



Detektionslimit bei Standard 10^{-4}

Abbildung 4: Verdünnungsreihe Ingenetix (N-Gen)



Detektionslimit bei Standard 10^{-6}

Abbildung 5: Zeitverlauf E-Gen RT-PCR

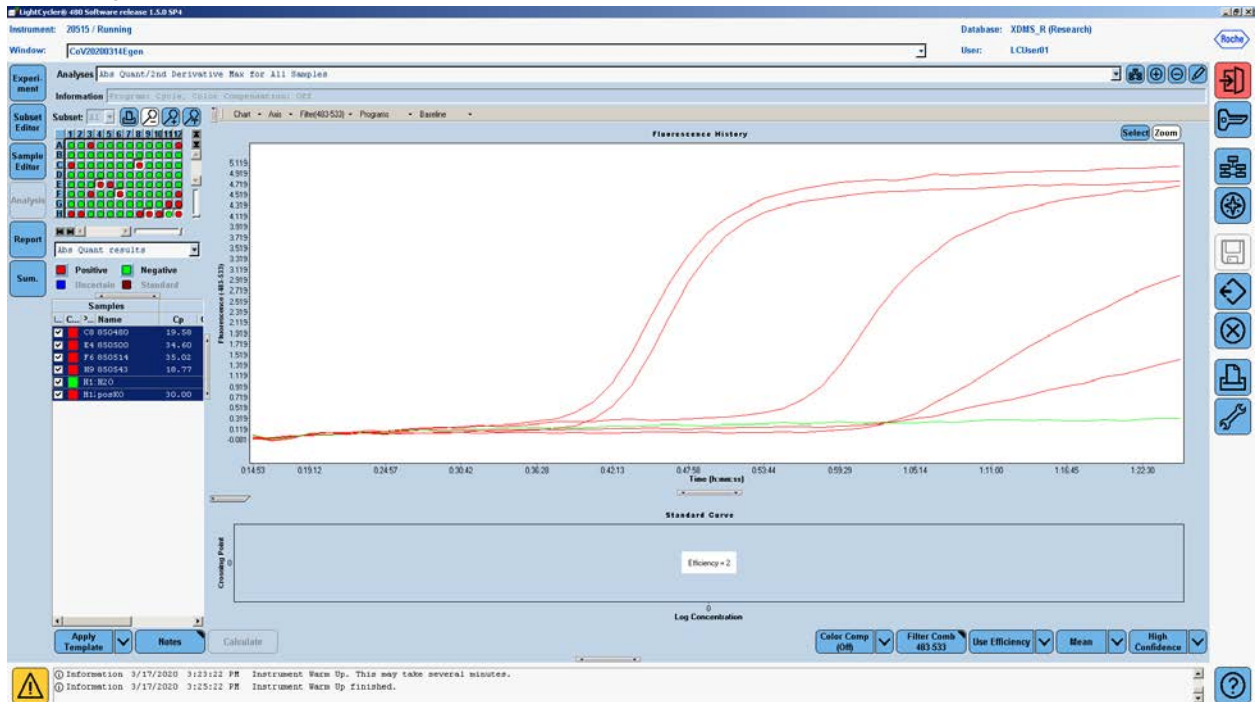


Abbildung 6: Zeitverlauf RdRp-Gen RT-PCR

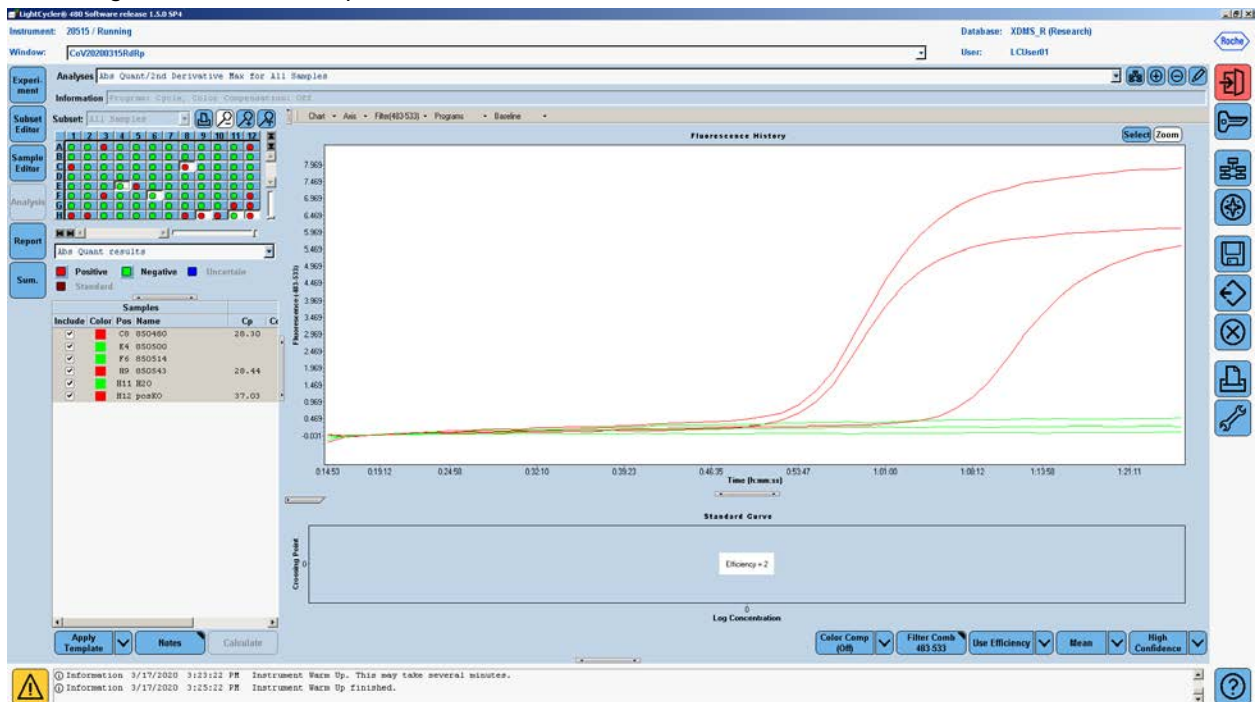


Abbildung 7: Zeitverlauf isotherme RT-PCR (MIRAI)

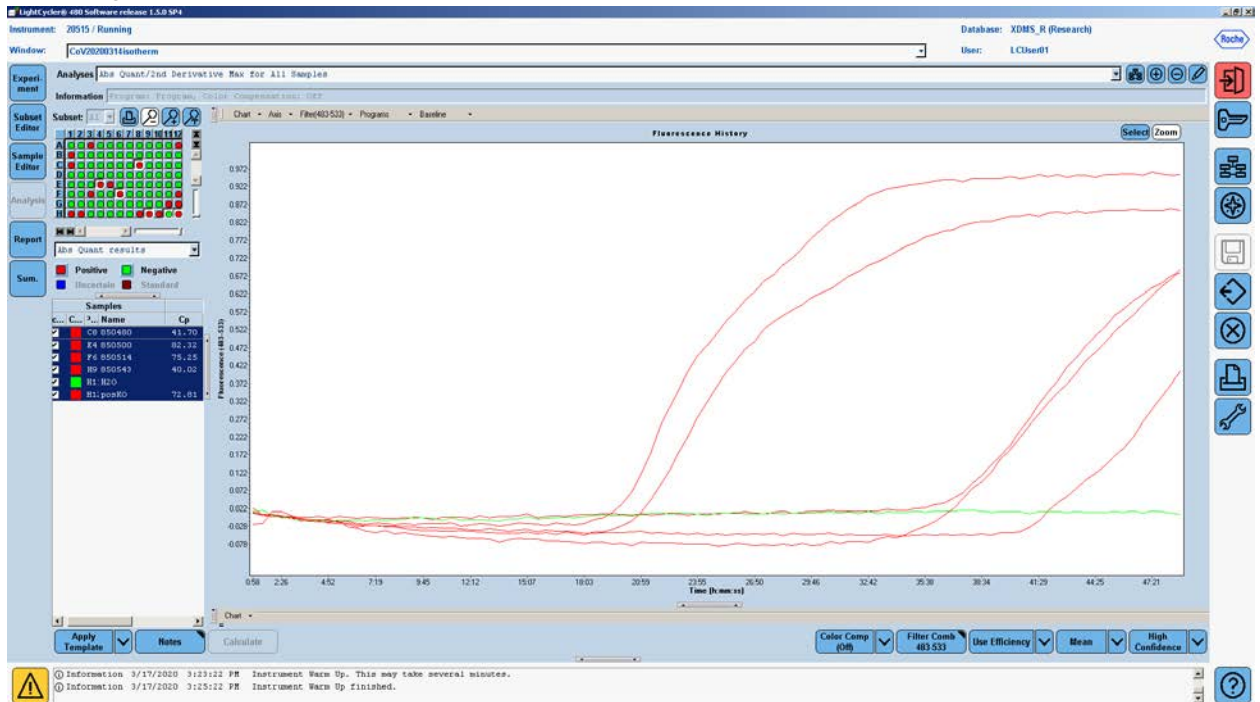
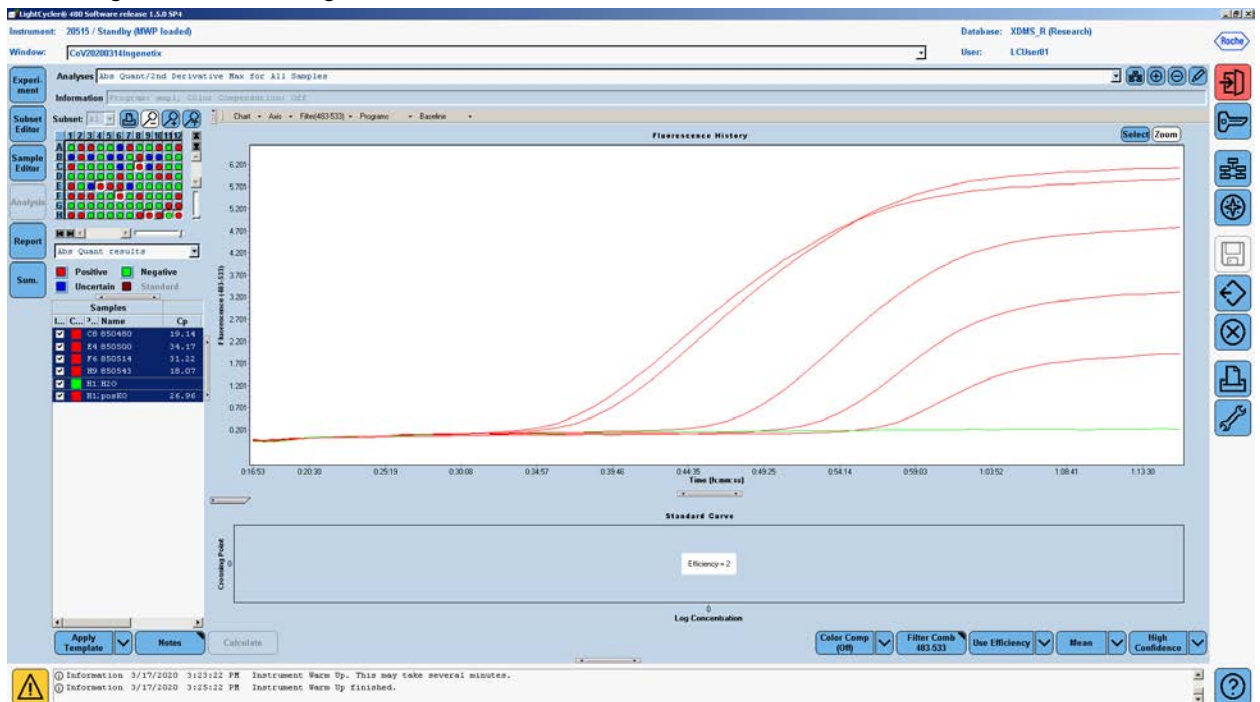


Abbildung 8: Zeitverlauf Ingenetix RT-PCR



Diskussion und Zusammenfassung:

Die drei getesteten Systeme stimmten in 90 der 94 getesteten Patientenproben überein. In zwei Fällen (Proben 850500 und 850514) fiel der Bestätigungstest nach positivem E-Gen mit RdRp negativ aus (Routinesystem AGES), aber sowohl MIRAI als auch Ingenetix waren positiv. Dabei waren die „Cp-Werte“ bei der isothermen Amplifikation sehr hoch (75,25 und 82,32). Sowohl MIRAI (850461) als auch Ingenetix (850502) ergaben jeweils ein positives Ergebnis bei negativem E- und RdRp-Gen (Tabelle 1).

Bei den Testungen der Verdünnungsreihe (Probe 850543, 1:10 Schritte) ergaben die Systeme E-Gen und Ingenetix ein Detektionslimit bei Standard 10^{-6} - RdRp und MIRAI waren um einen Faktor 100 weniger sensitiv (Standard 10^{-4}). Die geringsten Standardabweichungen zeigte das RT-PCR-System von Ingenetix, was eine sehr hohe Stabilität dieses Tests anzeigt (Abbildungen 1 bis 4).

Der Zeitaufwand für den gesamten Workflow (48 Proben, Probenerfassung und Eingabe, Probenvorbereitung, Extraktion, Vorbereitung für die PCR, RT-PCR und Auswertung/Befundung) ist mit Ausnahme der eigentlichen RT-PCR bei allen drei Verfahren etwa gleich. Bei der isothermen Amplifikation (MIRAI) ist eine Zeitreduktion von etwa 25 Minuten zu erreichen. Der gesamte Workflow würde damit von ca. 6 Stunden auf ca. 5,5 Stunden reduziert. Die Zeitverläufe der Amplifikation der zwei Proben mit der höchsten und der niedrigsten Konzentration an viraler RNA sind in Abbildung 5 bis 8 dargestellt. Zusätzlich zur isothermen Amplifikation wurde auch ein System (im Prototyp-Stadium) zur raschen Nukleinsäureisolierung angeboten und vorgeführt. Dieses ermöglicht eine Isolierung in etwa 5 Minuten, kann aber nur jeweils eine Probe abarbeiten und ist somit für den mittleren Durchsatz (AGES) nicht geeignet. Eine Weiterentwicklung zum Paralleldurchsatz von mehreren Proben wäre sehr wünschenswert und erfolgsversprechend.

References:

Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>