

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 | | | | | | | |

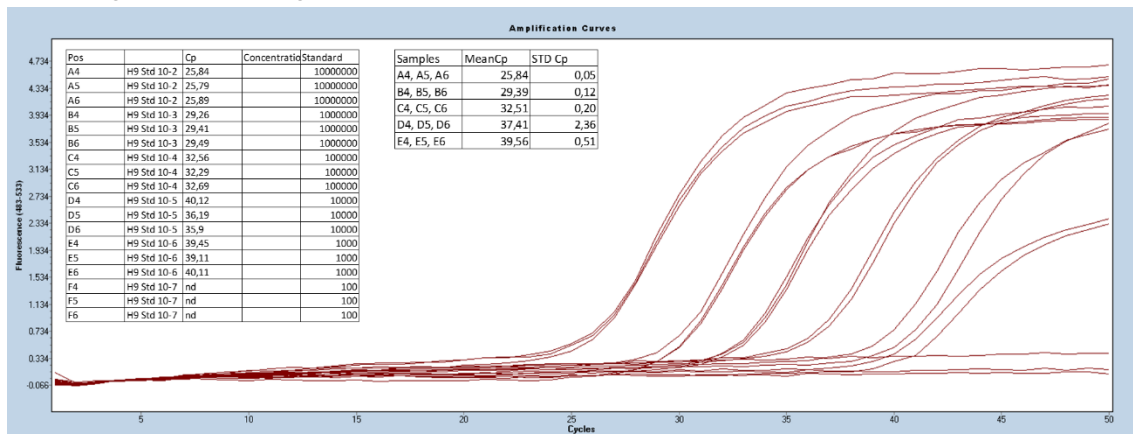
Tabelle 1 (Fortsetzung): Cp-Werte der drei Testsysteme (crossing points)

| 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)

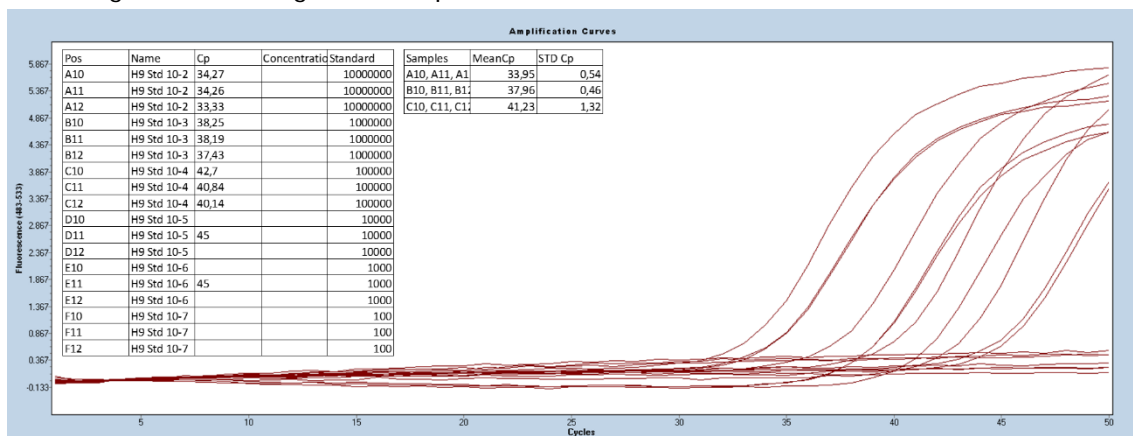
| Pos | Sample | E-gene | | internal ctrl | | RdRp | | MIRAI | | Ingenetix | |
|-----|--------|--------|----------|---------------|--------|-------|----------|-------|----------|-----------|----------|
| | | Cp | Status | Cp | Status | Cp | Status | Cp | Status | Cp | Status |
| H1 | 850533 | 24.54 | 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



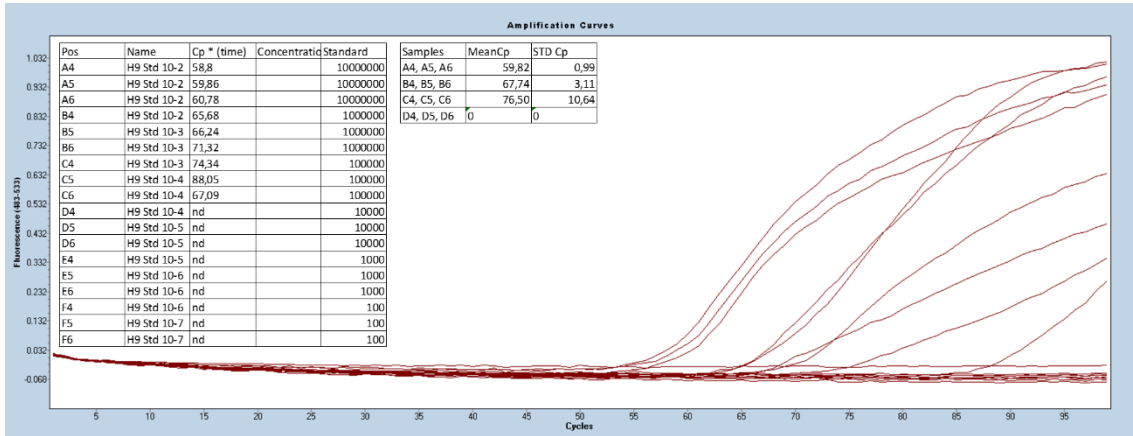
Detektlimit bei Standard 10^{-6}

Abbildung 2: Verdünnungsreihe RdRp



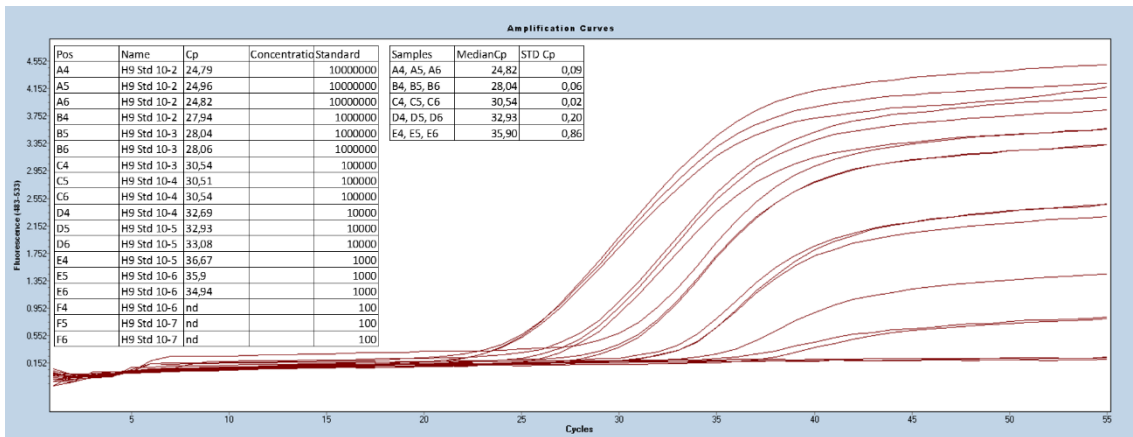
Detektlimit bei Standard 10^{-4}

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

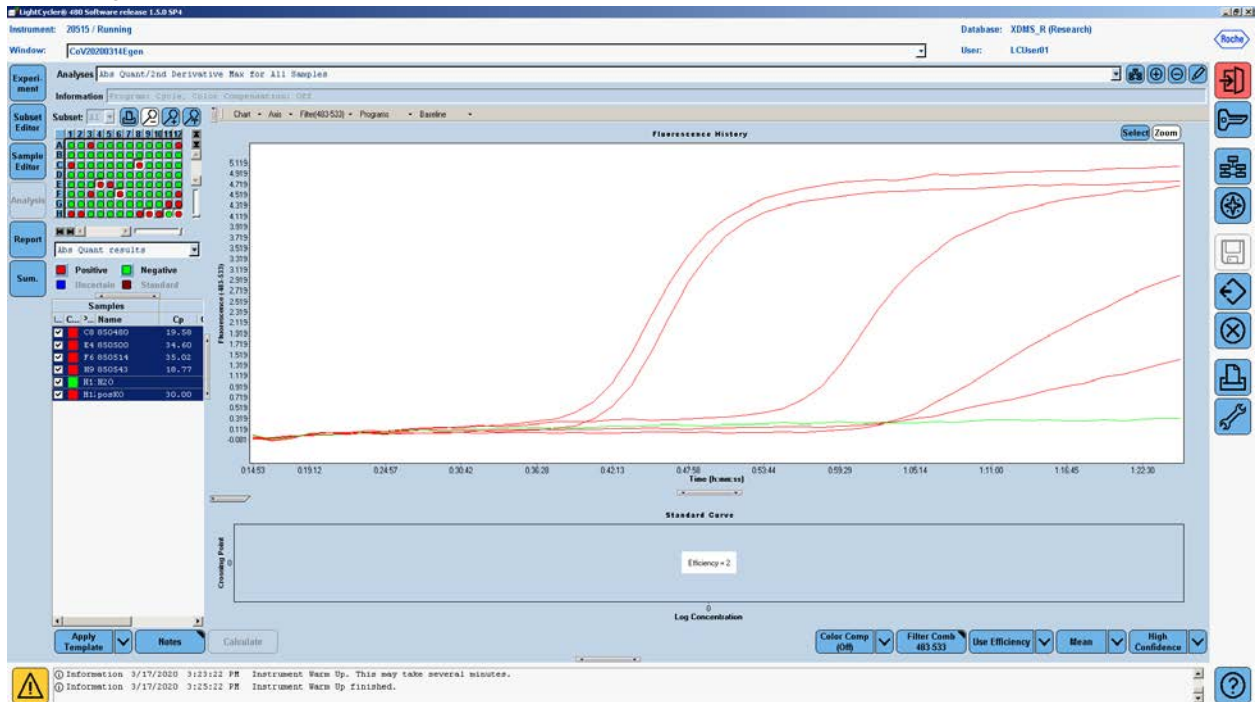


Abbildung 6: Zeitverlauf RdRp-Gen RT-PCR

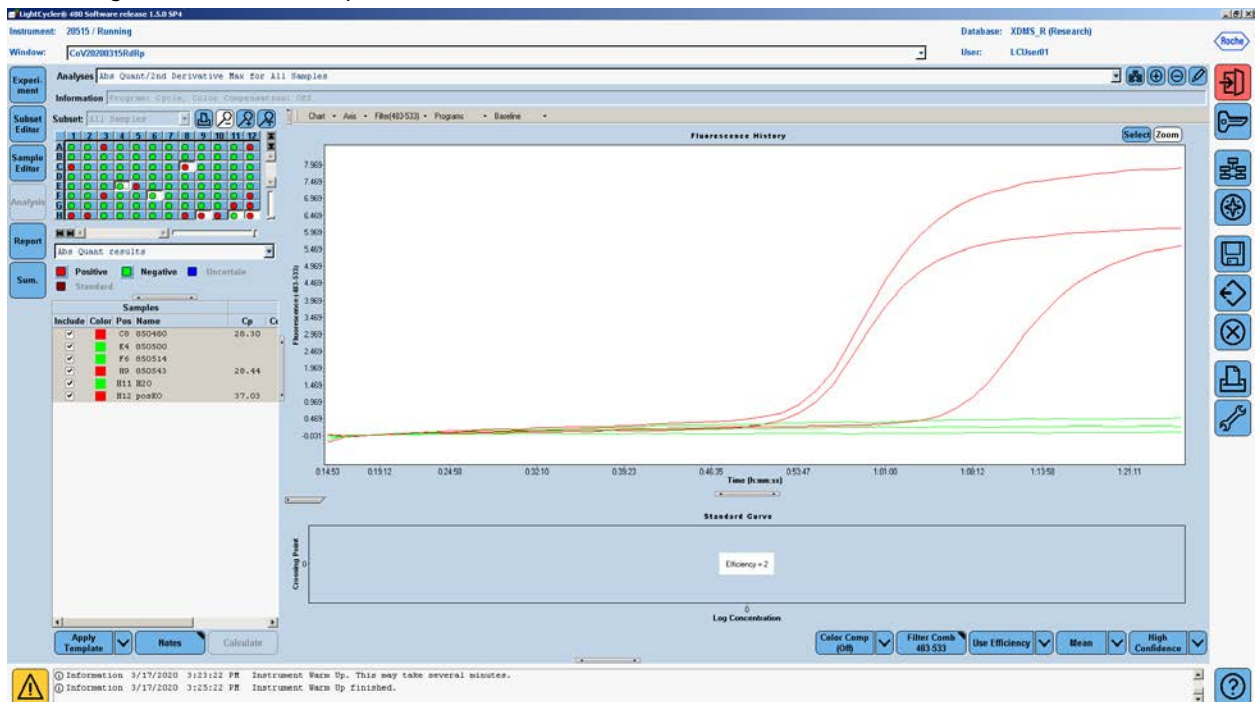


Abbildung 7: Zeitverlauf isotherme RT-PCR (MIRAI)

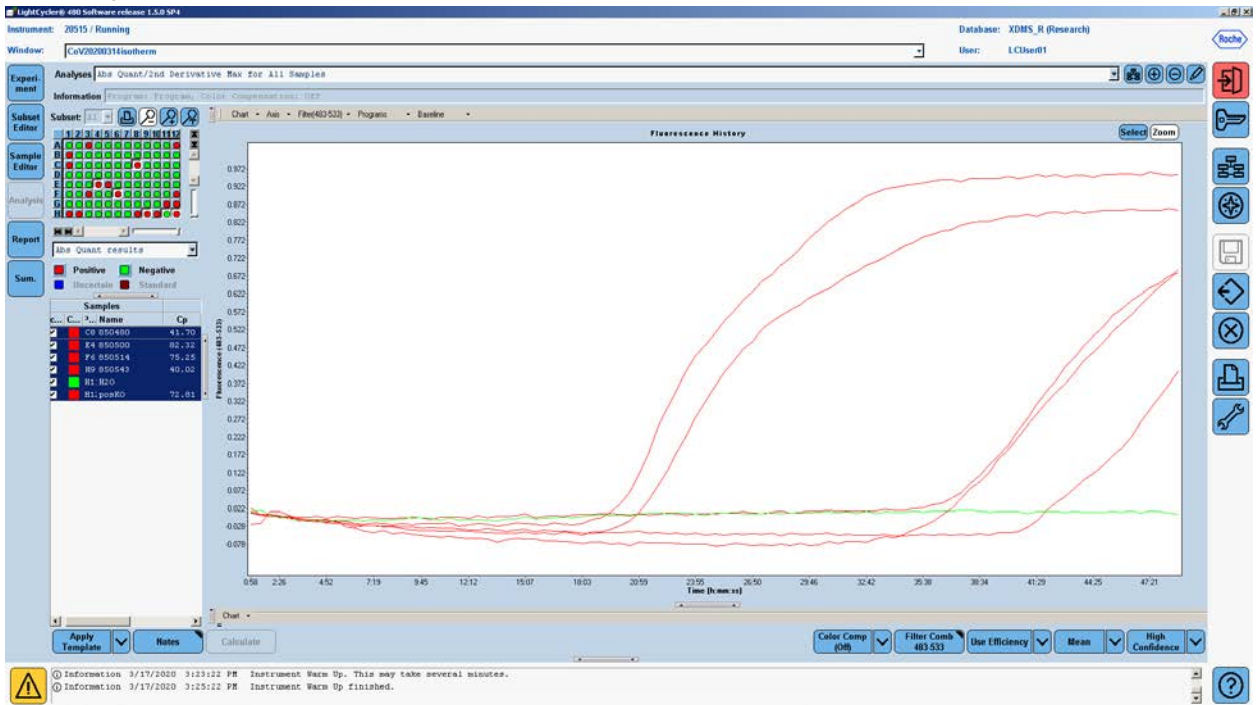
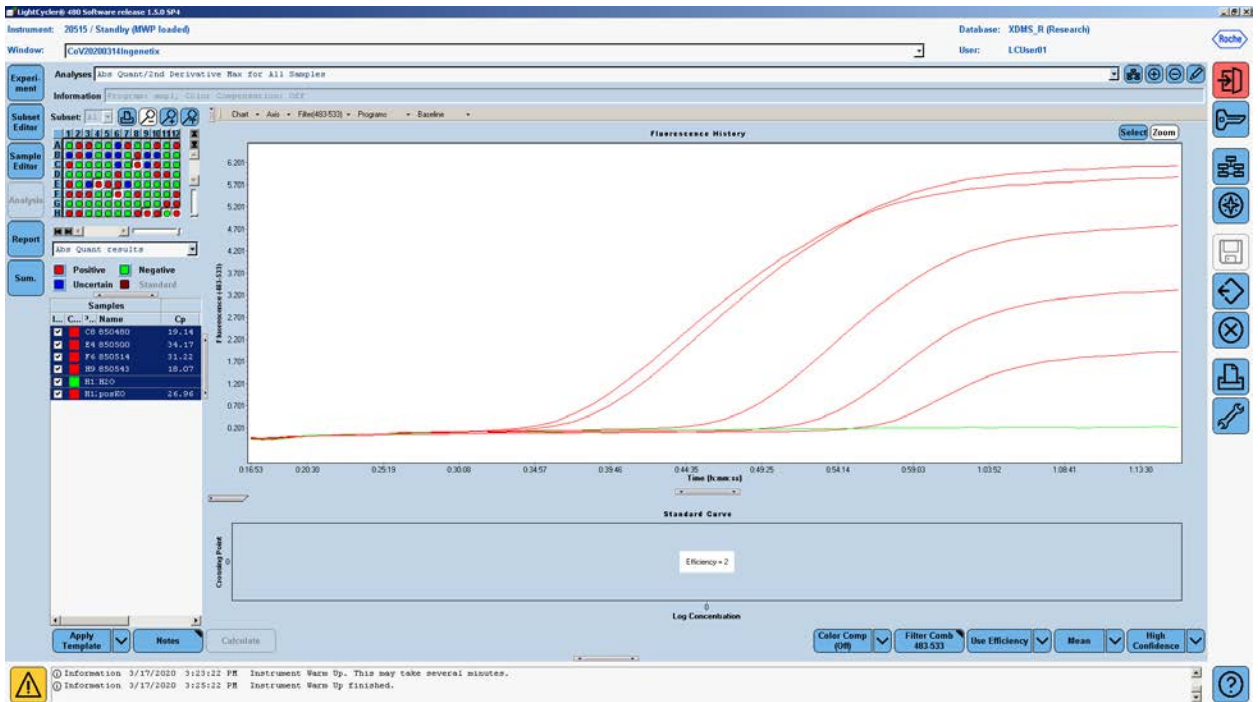


Abbildung 8: Zeitverlauf Ingenetix RT-PCR



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 erfolversprechend.

Ein großer Nachteil des MIRAI-Systems ist das Fehlen einer internen Kontrolle zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse (bedeutet für den Patienten ein unnötiges Fortführen der Quarantänemaßnahmen). Da sich dieses System in den Programmparametern so sehr von den herkömmlichen Bedingungen der RT-PCR unterscheidet, ist es nicht möglich, ein bestehendes internes Kontrollsystem (z.B. EAV, Equine Arteritis Virus) mit diesem Testverfahren zu kombinieren.

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>