

EVALUIERUNG EINES "LAB-ON-A-CHIP"- NUKLEINSÄURE-NACHWEISSYSTEMS SARS- COV-2: VEREPLEX™-BIOSYSTEM

16.06.2020

J. SCHAEFFER^{1,2*} W. RUPPITSCH¹

¹INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE WIEN, AGES

²EUPHEM FELLOWSHIP, EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL

Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES)

Zusammenfassung

Dieser Bericht beschreibt ein neu verfügbares SARS-CoV-2-Diagnosetool von Veredus (Singapur): den VereCoV™-Chip und das VerePLEX™-Biosystem. Dieses kleine Gerät ermöglicht den Nachweis von SARS-CoV und SARS-CoV-2 RNA auf einem einzigen Chip mittels PCR und Microarray. Das System wurde in Bezug auf Leistung und Handhabung evaluiert.

Ein Testpanel von 21 nasopharyngealen Proben von Patienten mit Verdacht auf COVID-19 (12 positiv und 9 negativ) wurde verwendet, um das System zu testen. Die Ergebnisse des VerePLEX™-Biosystems wurden mit den RT-qPCR-Ergebnissen (Referenzmethode) verglichen. Es wurde kein falsch positives Ergebnis erzielt, aber zwei Proben mit niedriger Viruslast ergaben falsch negative Ergebnisse.

Das VerePLEX™-Biosystem ist einfach zu installieren und zu benutzen, aber die Chips erfordern mehr Erfahrung, um richtig gehandhabt zu werden. Eine falsche Handhabung der Chips kann zu nicht eindeutigen Ergebnissen, aber auch zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Die Laufzeit für die gleichzeitige Analyse von maximal fünf Proben beträgt 2:30 bis 3 Stunden. Der VereCoV™-Chip erkennt nur zwei Viren, aber es sind mehrere andere Chips für dasselbe Gerät erhältlich, wobei jeder Chip den Test auf bis zu 12 Krankheitserreger ermöglicht. Diese Plastizität ist die Hauptstärke des Systems.

Insgesamt ist das VerePLEX™-Biosystem aufgrund seiner Kompaktheit und Plastizität besonders interessant für Labors, die viele verschiedene Krankheitserreger, bei geringen Probenzahlen untersuchen müssen. Der VereCoV™ ist nicht der interessanteste Chip, da er nur die Testung auf zwei Coronaviren erlaubt.

Summary

This report describes a newly available SARS CoV-2 diagnostic tool from Veredus (Singapore): the VereCoV™ chip for the VerePLEX™ biosystem. This small device allows the detection of SARS-CoV and SARS-CoV-2 RNA on a single chip, using PCR and microarray. The system has been evaluated in terms of performance and easy handling.

A test panel of 21 nasopharyngeal swabs from suspected COVID-19 patients (12 positive and 9 negative) was used to test the system. The results obtained with the VerePLEX™ biosystem were compared with RT-qPCR (reference method). No false positive was obtained, but two samples with low virus load gave false negative results.

The VerePLEX™ biosystem is easy to install and use, but the chips require more experience to be handled properly. Incorrect handling can lead to inconclusive results, but also false negative. The running time for the simultaneous analysis of maximum five samples is 2:30 to 3 hours. The VereCoV™ chip detects only two viruses, but several other chips are available for the same device, each chip allowing testing for up to 12 pathogens. This plasticity is the main strength of the system.

Overall, the compactness and plasticity of the VerePLEX™ biosystem makes it particularly interesting for laboratories that need to test many different pathogens in small amounts. The VereCoV™ is not the most interesting chip as it only allows testing for two corona viruses.

Einführung

Der folgende Bericht bewertet den VereCoV™-Chip und das VerePLEX™-Biosystem. Dieses System kombiniert RT-PCR und Microarray auf einem Chip zum Nachweis von SARS-CoV-2.

Das aktuell in der AGES verwendete System erfasst das virale E- Gen mit interner Kontrolle (EAV, Equine Arteritis Virus) entsprechend der WHO-Empfehlung (Corman et al., 2020). Es ist ein „homebrew“-System bei dem Primer, Sonden und Kontrollen von TIB-MolBioI (Berlin) und Puffer/Enzyme vom Invitrogen SuperScript™ III One-Step RT-PCR System (ThermoFischer) zum Einsatz kommen.

Wir haben diese Referenztechnik mit dem VereCoV™ Chip von Veredus (Singapour, in Österreich von HAST vertrieben) verglichen. Der VereCoV™ Diagnosechip wurde für das VerePLEX™ Biosystem entwickelt. Es besteht aus einer "On-Chip"-RT-PCR, gefolgt von einer Microarray-Hybridisierung und einer Detektion durch fluoreszierende Sonden. Zwei Segmente von drei verschiedenen Genen von SARS-CoV und SARS-CoV-2 werden in je zwei Microarrays amplifiziert und detektiert. Sonden, die spezifisch für SARS-CoV oder SARS-CoV-2 sind, differenzieren zwischen den beiden Viren. Jeder Chip enthält eine PCR-Kontrolle, eine Negativkontrolle und eine Hybridisierungskontrolle. Der Startpreis beträgt 60.000 € für die Ausrüstung und 100 € pro Test für die Chips

Durchführung

RNA-Extraktion

Die automatisierte Extraktion der viralen RNA wird in einem KingFisher Instrument (ThermoFischer Scientific) mit dem BioExtract SuperBall (BioSellal) Kit durchgeführt. Ausgangsvolumen waren 200µL und Elutionsvolumen 60µL.

VereCoV™ Chip – Amplifikation

PCR-Reagenzien (3,75µl DEPC-behandeltes Wasser, 12,5µl VeTaq™ Mix, 2µl VereCoV™ Mix A, 1µl CRR, 0,5µl RNase-Inhibitor und 0,25µl Reverse Transkriptase) wurden mit 5µl RNA gemischt und auf den Chip geladen. Der Chip wurde in das VerePLEX-Temperaturkontrollsystem (TCS) für RT-PCR-Zyklen (1h30) platziert. 29µl Hybridisierungspuffer-Mischung wurden dem Chip hinzugefügt. Der Chip wurde wieder in das TCS geladen und 30 Minuten lang inkubiert.

VereCoV™ Chip – Lesung

Die Chips wurden mit dem mitgelieferten Waschpuffer gewaschen und durch Zentrifugation getrocknet und anschließend mit dem optischen Lesegerät VerePLEX™ analysiert. Die Ergebnisse wurden als Chip-Bild (Punkte, die die Amplifizierung und Hybridisierung anzeigten), als Datei mit detaillierten Ergebnissen für jeden Analysepunkt und als globale Schlussfolgerung angezeigt.

Resultate

Handling

Das VerePLEX Biosystem (TCS und Lesegerät) ist kompakt und einfach zu handhaben. Der Arbeitsablauf erfordert aber auch Geräte für die Extraktion von Nucleinsäure und eine Zentrifuge für 50mL-Röhrchen. Die Software ist für den Routineeinsatz benutzerfreundlich. Es stehen mehrere Chips zur Verfügung, wobei ein Chip es ermöglicht, bis zu 12 verschiedene Krankheitserreger auf einmal zu testen.

Der VereCoV-Chip hat nur zwei Targets, SARS-CoV und SARS-CoV-2. Nach Angaben des Unternehmens sind weitere Anpassungen in Vorbereitung, um auch MERS-CoV einzubeziehen. Die Gesamtlaufzeit von der Nukleinsäureextraktion bis zu den Ergebnissen beträgt 2h30 bis 3h für 1 bis 5 Proben. Die Handhabung von Chips erfordert Übung. Die vielen Arbeitsschritte, können bei einer falschen Handhabung zu nicht eindeutigen Ergebnissen führen.

Leistung

Das beschriebene Testsystem wurde für die Analyse von 21 Patienten-Proben verwendet. Dieses Testpanel umfasste 12 positive mit variabler Viruslast und 9 negative Proben.

Tabelle 1. Resultate mit dem Referenzsystem (E-Gen PCR) und dem VereCoV™ Chip

Probe ID	E-Gen PCR		VereCoV			
	Resultate	Cp	Chip ID	SARS-CoV-2	SARS-CoV	Resultate
850459	-		22009GM8-3-41	-	-	not detected
850460	+	23,92	22009GM8-3-133	+	-	SARS-CoV-2 detected
850473	+	28,92	22009GM8-4-56	+	-	SARS-CoV-2 detected
850474	-		22009GM8-4-112	-	-	not detected
850499	-		22009GM8-3-11	-	-	not detected
850500	+	34,60	22009GM8-3-95	-	-	not detected
850501	+	32,77	22009GM8-3-47	+	-	SARS-CoV-2 detected
850503	-		22009GM8-4-110	-	-	not detected
850505	-		22009GM8-3-99	-	-	not detected
850506	-		22009GM8-3-61	-	-	not detected
850511	+	26,68	22009GM8-4-40	+	-	SARS-CoV-2 detected
850514	+	35,02	22008GJN-6-19	-	-	not detected
850514	+	35,02	22009GM8-3-82	-	-	not detected
850515	-		22009GM8-3-73	-	-	not detected
850516	-		22009GM8-3-24	-	-	not detected
850531	+	21,85	22008GJN-6-20			Inconclusive (hybridation control)
850532	+	29,04	22009GM8-4-104	+	-	SARS-CoV-2 detected
850532	+	29,04	22009GM8-4-97	+	-	SARS-CoV-2 detected
850533	+	24,54	22009GM8-4-112	+	-	SARS-CoV-2 detected
850534	+	30,42	22009GM8-4-26	+	-	SARS-CoV-2 detected
850535	-		22009GM8-4-124	-	-	not detected
850541	+	27,10	22009GM8-4-65	+	-	SARS-CoV-2 detected
850562	+	24,16	22009GM8-4-14	+	-	SARS-CoV-2 detected

Alle negativen Proben waren negativ. Von den positiven Proben waren 9 positiv, 2 waren negativ (850500, 850514) und eine war ungültig (850531). Das ungültige Ergebnis war auf einen Handhabungsfehler zurückzuführen. Eine falsch negative Probe wurde wiederholt, und war immer noch negativ (850514). Die beiden



falschen Negativen Proben entsprachen Proben mit hohen Ct-Werten, also Proben mit niedrigen Viruskonzentrationen.

Abbildung 1. Beispiele für ein Chip-Bild (A), Software-Auswertung (B) und Software-Schlussfolgerung (C) für eine positive Probe (links, 850534) und eine negative Probe (rechts, 850535)

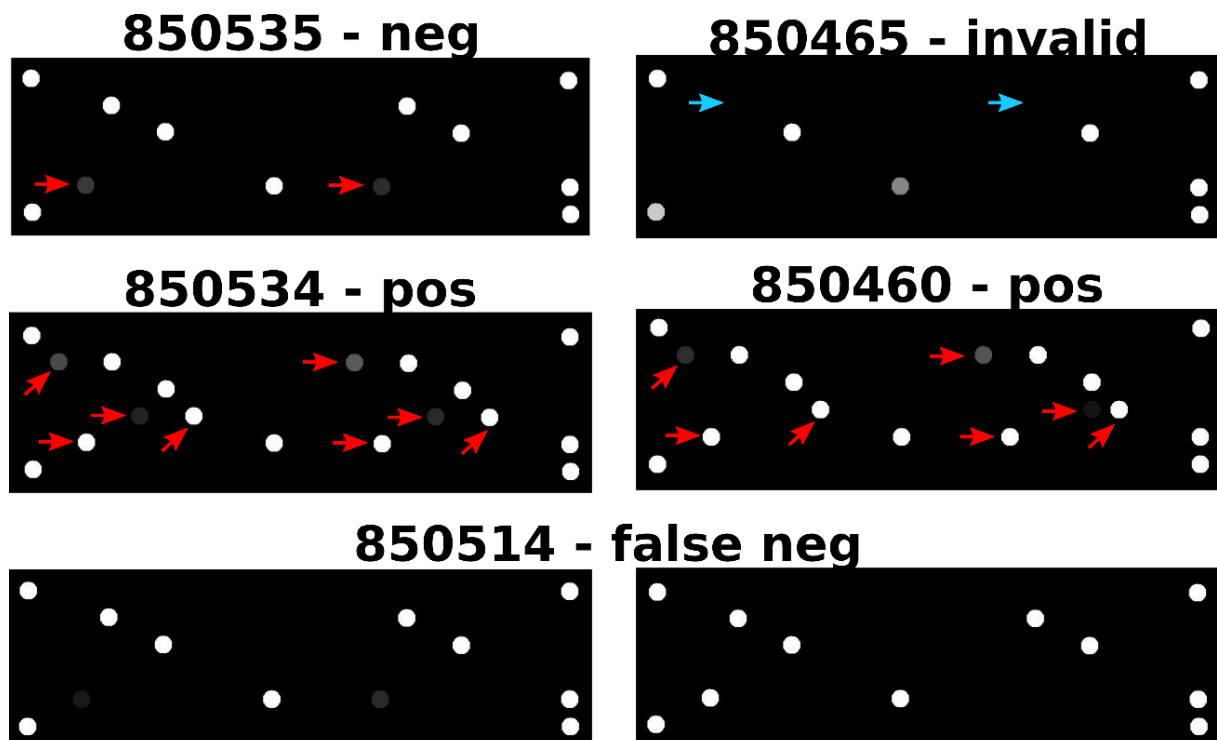


Abbildung 2. Beispiele für das Lesen von Software-Chips für eine echt negative Probe (850535), eine ungültige probe (850465), zwei positiven Proben (850534 und 850460) und eine falsch negative Probe (850514, zwei Durchläufe). Blaue Pfeile zeigen Punkte an, die der PCR-Kontrolle entsprechen. Rote Pfeile zeigen Punkte an, die dem SARS-CoV-2-Ziel entsprechen

Abbildung 3. Bild des VerePlex™ Biosystem (<https://vereduslabs.com/system-and-software/vereplex-biosystem/>)



Diskussion

Das VerePlex™ Biosystem ist ein kompaktes Gerät für den "on-chip"-Nachweis von Nukleinsäuren. Es kombiniert PCR-Amplifikation, Chip-Hybridisierung und den Nachweis von Fluoreszenzsonden. Es sind verschiedene Chips für den gleichzeitigen Nachweis und die Differenzierung von bis zu 12 Krankheitserregern erhältlich. Die auf jedem Chip verfügbaren Krankheitserreger sind intelligent konzipiert, wobei ein syndromischer Ansatz verfolgt wird (lebensmittelbedingtes, reisebedingtes Fieber, Grippe usw.). Die Software ist benutzerfreundlich, und das Testergebnis wird in einfachem Englisch angegeben. Auch detailliertere Ergebnisse stehen bei Bedarf zur Verfügung.

Hier haben wir den neu entwickelten VereCoV™ Chip getestet, der SARS-CoV und SARS-CoV-2 erkennt. Der gesamte Prozess, vom Laden des Chips mit Nukleinsäure bis zu den Ergebnissen, ist komplex und langwierig (2h30 bis 3h, mit mehreren Schritten). Auch der Probendurchsatz ist gering, da maximal fünf Proben gleichzeitig bearbeitet werden können. Die Handhabung der Chips erfordert Übung oder spezielle Schulung. Dieser Aspekt ist besonders wichtig, da eine falsche Handhabung nicht nur zu unschlüssigen Ergebnissen, sondern auch zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Sobald solche Erfahrungen gesammelt wurden, waren die Ergebnisse kohärent, aber mit einer Empfindlichkeit, die niedriger als die RT-qPCR ist.

Insgesamt ist das VerePLEX™ Biosystem ein gut durchdachtes Gerät. Hinsichtlich der Tests pro Stunde ist die Leistung gering, so dass es sich nicht um ein System handelt, das für große Probenmengen geeignet ist. Andererseits ist das System aufgrund seiner Kompaktheit und Plastizität besonders interessant für Labors, die viele verschiedene Krankheitserreger, bei geringen Probenzahlen untersuchen müssen. Der VereCoV™ ist

nicht der interessanteste Chip, da er es nur erlaubt, auf zwei Coronaviren zu testen. Dieser Chip wurde jedoch erst kürzlich entwickelt, um auf den SARS-CoV-2-Notfall zu reagieren, so dass für die Zukunft weitere Verbesserungen zu erwarten sind.

Literaturverzeichnis

CORMAN V. M., LANDT O., KAISER M., MOLENKAMP R., MEIJER A., CHU D.K.W., BLEICKER T., BEÜNINK S., SCHNEIDER J., SCHMIDT M. L., MULDER D. G. J. C., HAAGMANS B. L., VAN DER VEER B., VAN DEN BRINK S., WIJSMAN L., GODERSKI G., ROMETTE J.-L., ELLIS J., ZAMBON M., PEIRIS M., GOOSSENS H., REUSKEN C., KOOPMANS M. P. G., DROSTEN C. 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>