

「SARS-CoV-2 核酸検出」PCR 反応系の比較検討

京都大学医学部附属病院 検査部・感染制御部

京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学

2020 年 3 月 24 日

1. 目的

SARS-CoV-2 (新型コロナウイルス) 核酸検出検査 (以下、PCR 検査) の各種反応系の性能を比較する。

2. 結果

2.1. マスターミックスおよびプログラムの違いによる positive control RNA の反応性検討

A) LightCycler, 感染研 N/N2 アッセイ, 3 回測定 of 平均 Ct 値 (範囲)

RNA copies/reaction	感染研 N2			感染研/German N		
	TaqPath	LC 2-step	LC 3-step	TaqPath	LC 2-step	LC 3-step
5×10^4	24.5 (24.5-24.5)	26.3 (26.2-26.5)	28.3 (28.2-28.3)	27.3 (27.2-27.3)	28.9 (28.9-29.0)	29.4 (29.0-29.8)
5×10^3	27.9 (27.8-28.0)	29.9 (29.5-30.2)	31.8 (31.6-32.0)	30.7 (30.7-30.8)	32.3 (32.1-32.5)	33.0 (32.7-33.2)
5×10^2	31.2 (31.2-31.3)	33.8 (33.3-34.0)	35.1 (34.6-35.5)	34.0 (34.0-34.1)	35.6 (35.4-35.8)	36.4 (36.0-36.7)
5×10^1	34.3 (34.2-34.5)	37.7 (37.5-37.9)	NC (38.5->40)	37.6 (37.4-37.8)	38.2 (37.5-38.9)	NC (>40)
5×10^0	38.1 (36.9-39.6)	NC (>40)	NC (>40)	NC (38.5, >40, negative)	NC (>40 or negative)	NC (>40 or negative)

NC, not calculated.

B) StepOnePlus, 感染研 N/N2 アッセイ, 3 回測定 of 平均 Ct 値 (範囲)

RNA copies/reaction	感染研 N2	感染研/German N
	TaqPath	TaqPath
5×10^4	25.7 (25.3-25.9)	30.2 (29.3-31.4)
5×10^3	28.4 (27.9-28.8)	33.6 (33.1-34.3)
5×10^2	31.1 (30.4-32.0)	36.7 (35.9-37.6)
5×10^1	33.7 (32.7-34.4)	38.5 (37.5-40.2)
5×10^0	36.9 (35.8-38.3)	NC (negative)

2.2.アッセイ、マスターミックスおよびプログラムの違いによる臨床検体の反応性検討

A) 全て EAV control あり、LightCycler, Ct 値

Sample	感染研 N2		感染研/German N		German E			Roche E	Roche N	Roche RdRP	RNaseP
	TaqPath	LC 2-step	TaqPath	LC 2-step	TaqPath	TaqPath, 58°C	LC 2-step	LC 3-step	LC 3-step	LC 3-step	TaqPath
スワブ 6	34.7	35.4	37.3	-	33.7	34.9	34.0	34.4	-	-	35.2
スワブ 2	35.6	35.7	-	-	36.1	36.2	35.5	35.8	-	-	28.3
スワブ 3	32.4	35.1	-	-	34.0	34.5	34.2	34.8	-	-	26.7
スワブ 7	23.4	24.7	27.9	29.6	23.7	26.8	23.8	23.1	30.6	35.9	29.0
スワブ 8	27.9	29.7	32.4	33.0	28.7	28.9	29.1	28.7	36.1	-	30.4
スワブ 9	-	-	-	-	-		-	-	-	-	25.9
スワブ 10	-	-	-	-	-		-	-	-	-	22.3
スワブ 11	-	-	-	-	-		-	-	-	-	27.5
スワブ 12	-	-	-	-	-		-	-	-	-	24.9
スワブ 13	-	-	-	-	-		-	-	-	-	25.0

B) EAV に対するプライマー・プローブなしで反応させた場合の Ct 値の差(プラスの値は EAV 検出反応追加により Ct 値が増大したことを示す)

Sample	感染研 N2		感染研/German N		German E	
	TaqPath	LC 2-step	TaqPath	LC 2-step	TaqPath	LC 2-step
スワブ 6	0	-0.3	0.1	-	-1.1	0.1
スワブ 2	0.4	0	-	-	0.1	-0.1
スワブ 3	-0.6	0.2		-	-0.1	0.5
スワブ 7	-0.5	0.1	-0.4	-0.5	0.3	0.3
スワブ 8	-1.2	-0.2	-1.2	-0.3	-0.1	0.3

陰性陽性判定は変わらなかった。

C) 表 A における EAV control の平均 Ct 値 (範囲)

感染研 N2		感染研/German N		German E			Roche E	Roche N	Roche RdRP
TaqPath	LC 2-step	TaqPath	LC 2-step	TaqPath	TaqPath, 58°C	LC 2-step	LC 3-step	LC 3-step	LC 3-step
26.5 (26.1-27.0)	26.8 (26.4-27.2)	26.6 (26.2-27.7)	26.7 (26.3-27.1)	26.4 (26.2-26.8)	27.1 (26.8-27.5)	26.6 (26.3-26.9)	27.6 (27.1-28.0)	28.5 (27.9-29.0)	27.9 (27.6-28.2)

全てのサンプルで EAV control は陽性と判定された。

3. 考察

陽性コントロールを用いた検討では、N2 アッセイでは TaqPath, LC 2-step, LC 3-step 全てで5コピー/反応の検出が可能だったが、N アッセイでは50コピー/反応であり、N アッセイの感度が低いと考えられた。マスターミックス・プログラムの比較では、その増幅効率 は TaqPath>LC 2-step > LC 3-step である可能性が示唆された。

臨床検体を用いた検討では、感染研 N2, German E, Roche E アッセイでは5サンプルが陽性と判定された。しかし、感染研/German N, Roche N, Roche RdRP では、それぞれ2~3, 3, 4 サンプルが陰性と判定され、感度が低いことが示唆された。上記と異なる5サンプルは全てのアッセイで陰性と判定され、偽陽性はないと考えられた。

German E アッセイでは Roche E アッセイと異なり40 サイクル付近から非特異的蛍光増幅が認められることがあり、注意が必要と考えられた。なお、German アッセイではすべて58度で増幅を行うが、60度でも同等の性能であることが示唆された。同じプライマー・プローブを用いる Roche N, RdRP アッセイもアニーリングは60度に設定されている。

EAV control 反応の追加による Ct 値の変動や偽陽は認められず、今回検討したアッセイとの同時使用が可能であると考えられた。EAV control の説明書では、3-step プログラムが示されているが、LC 2-step、TaqPath (2-step)ともに陽性判定が可能であり、2-step の反応でも問題はないと考えられた。

RNaseP 遺伝子は全てのサンプルで陽性と判定され、外部 RNA コントロールがない場合のコントロール反応として使用可能であると考えられた。

結論

TaqPath または LC (2-step)マスターミックスと EAV control を用いて実施する感染研 N2,N アッセイコントロールなしの反応と同様の臨床的反応性が見込まれ、臨床検査室での実施にふさわしい系であると考えられた。また、EAV control を用いて実施する Roche 社の E および N アッセイも同等であると考えられた。一方、感度の面からは感染研 N2, German/Roche E が優れており、これらのうち2つと EAV control を用いる反応系も有用であろう。また、EAV control などの外部コントロールがない場合は RNaseP 遺伝子の検出反応が代替として考慮される。

4. 方法

RNA抽出

QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

- ・スピンプロトコール
- ・検体：140 μ l
- ・ Buffer AVL にキャリア RNA と別途記載のコントロール RNA を添加

- ・ 溶出：AVE 50 μ l 1 回

LightMix Modular EAV RNA Extract. Control (Roche)

- ・ 抽出時に 10 μ l 添加

サーマルサイクラー

- ・ LightCycler® 480 System II (Roche Diagnostics)
- Filter: 465-510, Max Integration time 1 sec; 618-660, Max Integration time 3 sec
- Ct 値は Second Derivative Maximum method により算出
- ・ StepOnePlus (Applied Biosystems)

マスターミックス

TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG (Thermo Fisher Scientific)

LightCycler® Multiplex RNA Virus Master (Roche Life Science)

反応系

トータル 20 μ l, template RNA 5 μ l

感染研 N(=German N), N2 : FAM-TAMRA プローブ (国立感染症研究所より配布)。プライマー・プローブ濃度は国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」に従った。

German E : FAM-BHQ1 プローブ。プライマー・プローブ濃度は元論文¹⁾に従った。

Roche E, N, RdRP (LightMix® Modular SARS and Wuhan CoV N-gene, E-gene; LightMix® Modular Wuhan CoV RdRP-gene) : メーカーの添付文書に従った。

Roche EAV control (LightMix® Modular EAV RNA Extraction Control 660) : メーカーの添付文書に従った。

CDC RNaseP : CDC (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>)、ただし RP-F, RP-R : 1 μ M、RP-P : 0.25 μ M、Cy5-BHQ2 プローブへ変更

PCRプログラム

TaqPath

UNG incubation ¹	25°C	2 minutes
Reverse Transcription	50°C	15 minutes
Taq Enzyme Activation	95°C	2 minutes
Amplification 45 cycles	95°C	3 seconds
	60°C ²	30 seconds

¹ LightCycler では設定できないため実験台上で行う

² 58°Cで実施した場合、「TaqPath, 58°C」と記載

StepOnePlus では fast モード

LightCycler での反応時間は 1h12m29s

LC 2-step: Multiplex RNA Virus Master, 2-step

Reverse Transcription	50°C	10 minutes
Taq Enzyme Activation	95°C	30 seconds
Amplification	95°C	5 seconds
45 cycles	60°C	30 seconds

LightCycler での反応時間は 1h10m47s

LC 3-step: Multiplex RNA Virus Master, 3-step

Reverse Transcription	50°C	10 minutes
Taq Enzyme Activation	95°C	30 seconds
Amplification	95°C	5 seconds
45 cycles	60°C	15 seconds
	72°C	15 seconds

LightCycler での反応時間は 1h20m40s

結果判定

・陽性判定基準

感染研N/N2：サンプルの Ct 値が 40 サイクル未満であること。感染研マニュアルでは、反応時間内に増幅曲線の立ち上がりが見られれば良く、また自動判定による Ct 値が陰性と判定されていても。ここではより厳しい基準を設定している。

German E：サンプルの Ct 値が 40 サイクル未満であること。

Roche E, N, RdRP：サンプルの Ct 値がメーカーの規定レンジに入っていること。

Roche EAV control：サンプルの Ct 値が 25~33 であること。

RNaseP：サンプルの Ct 値が 40 サイクル未満であること。

精度管理

・抽出/PCR 阻害

外部コントロールなし：内部コントロールであるサンプルの RNaseP 遺伝子が陽性判定されること。ただし、ターゲットが陽性判定されている場合は、内部コントロールの判定は陰性でもよい。

外部コントロールあり：サンプルの外部コントロール検出反応において陽性判定されること。ただし、ターゲットが陽性判定されている場合は、内部コントロールの判定は陰性で

もよい。

・陽性コントロール

感染研N/N2：50 copies/reaction が陽性と判定されること。

※定量実験を行う場合は、5, 50, 500, 5000, 50000 copies/reaction の陽性コントロールを用いて検量線を作成し、直線性が確認された範囲のみで定量を行う。定量が目的でなければ、希釈系列の作成は必須ではない。

German E：Roche E キット付属の陽性コントロールの Ct 値がメーカーの規定レンジに入っていること。

Roche E, N, RdRP：キット付属の陽性コントロールの Ct 値がメーカーの規定レンジに入っていること。

Roche EAV control：外部コントロール用 RNA を 5 倍希釈した反応において陽性判定されること。希釈率は、抽出の際の添加量と、溶出液量とサンプル液量から理想的な 1 反応あたりのコピー数を計算し設定した。

RNaseP：陽性コントロールが陽性と判定されること。

・陰性コントロール

Water control の反応ウェルで、各ターゲットが陰性判定されること。

Roche 社キットの規定レンジ

Target gene/assay	サンプルの陽性判定を行う Ct 値	陽性コントロールの Ct 値
Roche E	<36	28-31
Roche N	<37	28-32
Roche RdRP	<39	28-32
EAV control	>25 (27-33) ^a	-

^a 27-33 となるよう抽出時の投入量を調節することが望ましい。

文献

1. Corman VM et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 Jan;25(3). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.

連絡先

追加・修正等のご提案がありましたら下記までメールいただけますようお願いいたします。

yazblood@kuhp.kyoto-u.ac.jp