



Virologische Assays im Vergleich CMV ; HBV

MAG. THOMAS MAYERHOFER
UK ST. PÖLTEN

Grundlagen



- DNA wird bei 95°C aufgeschmolzen und liegt dann als Einzelstrang vor
- Abkühlung auf Anlagerungstemperatur (zB 56°C)
- Primer lagern sich an
- Polymerase lagert sich an
- Erwärmung auf 72°C (Optimaltemperatur der Polymerase)
- Polymerase verlängert Primer und stellt Doppelstrang her

Grundlagen



Probleme:

- Primer lagern sich nicht immer gut an (Primerdesign)
- Polymerase findet nicht immer eine Stelle zur Anlagerung (niedriger VL)
- (long range) Polymerase schafft nicht immer die ganze Strecke

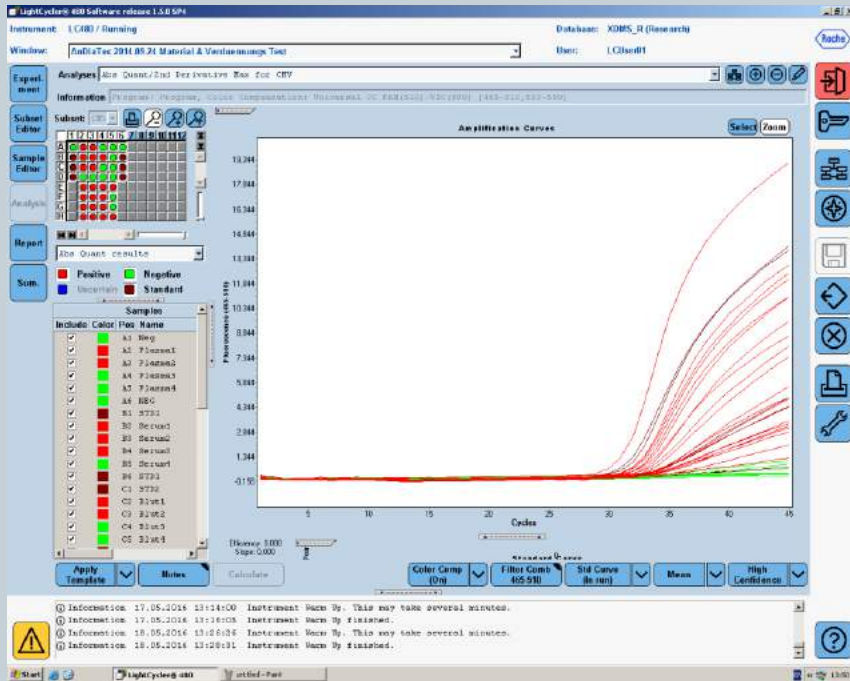
Dies beeinflusst die **Effizienz** der PCR.

- Theoretische Effizienz ist 2 (1, 2, 4, 8, 16, 32, ...)
- Praktische Effizienz ist immer darunter (zB 1,9 (1, 1.9, 3.6, 6.9, 13, 24.7, ...))

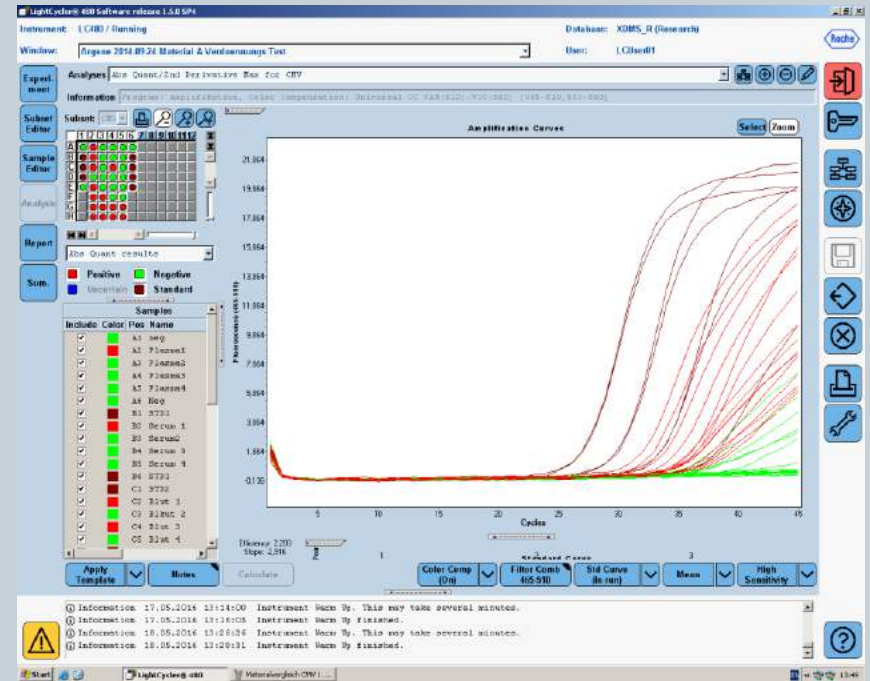
Effizienz

Je steiler der Anstieg, desto Effizienter die PCR

AnDiaTec



Argene



Detektion



In der Real Time PCR gibt es verschieden Reporter Systeme mit unterschiedlichen Eigenschaften.

Taqman: gute Leuchtstärke, aber Sonde wird zerstört

HyProbe: 2 Sonden müssen sich anlagern – sehr gute Schmelzkurven!

Molecular Beacon: linear angelagert leuchtet es.

Scorpion: molecular Beacon an einen Primer ligiert.

Detektion



Ein ganz wesentlicher Punkt in der Detektion ist die **Fluoreszenz!**

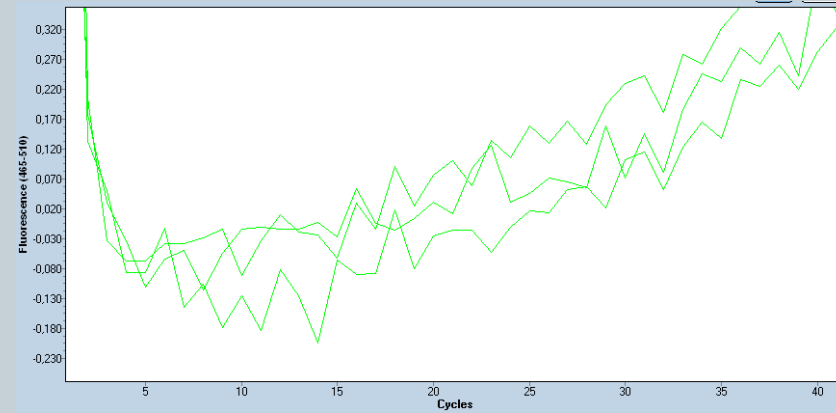
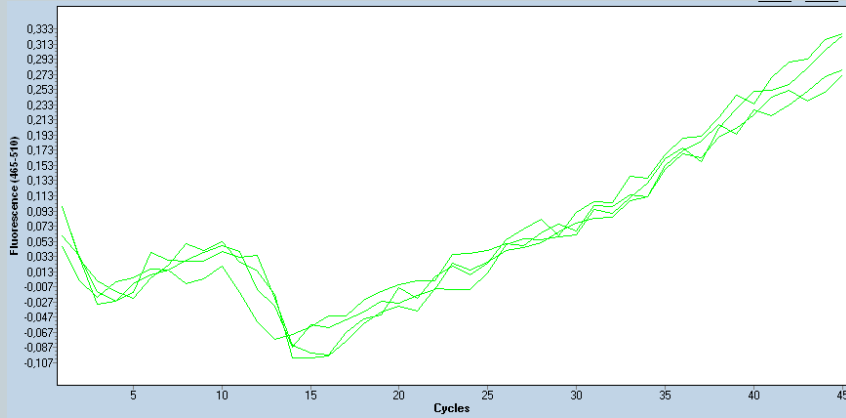
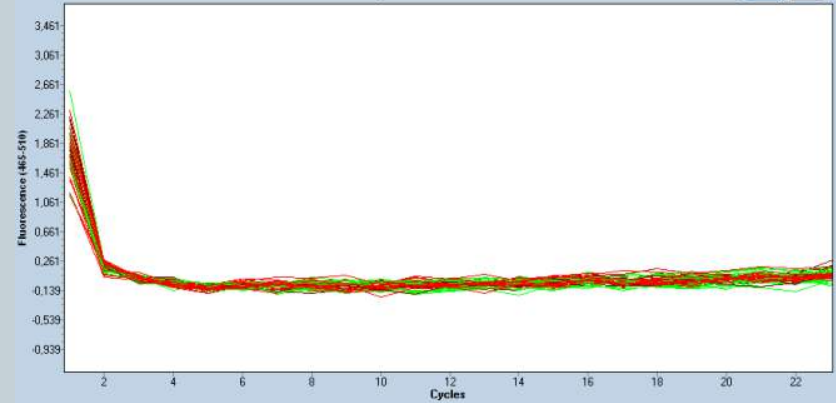
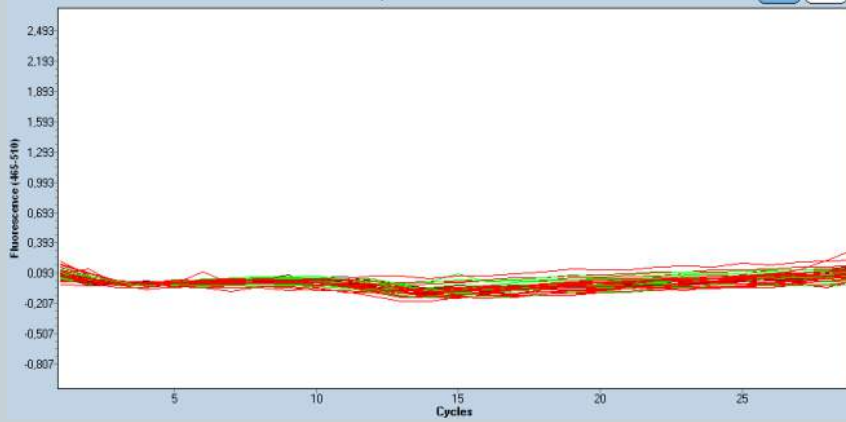
- Liegt das Maximum der Anregung an der Wellenlänge des Geräts?
- Liegt das Maximum der Erregung bei der Wellenlänge der Detektion?
- Wie breit ist der Peak des Fluoreszenz Farbstoffes?
- Gibt es unspezifische Strahlung?
 - Wenn ja, ändert sich diese im Verlauf der PCR?
- Wie ruhig ist die Basislinie?

Basislinien



AnDiaTec

Argene



Was sind die Auswirkungen



- **Die Effizienz beeinflusst das Detektionslimit**
 - Je effizienter die DNA vervielfältigt wird, desto wahrscheinlicher können auch kleinste Menge DNA detektiert werden.
- **Die Fluoreszenz & Basislinie die Auswertbarkeit**
 - Je besser das Detektionssystem und je besser und ruhiger die Basislinie, desto wahrscheinlicher können Anstiege erkannt werden.



Vergleich von zwei CMV Real Time PCR Kits an unterschiedlichen Probenmaterialien von Patienten

Hintergrund der Studie



- CMV ist eine der häufigeren Untersuchungen
- Qualität der Ergebnisse ist äußerst wichtig
- Unsere Tests werden regelmäßig evaluiert
- Zur Sicherung und Hebung der Qualität werden auch neue Kits immer wieder getestet

Hintergrund der Studie



- Als Probenmaterial wird Plasma, Serum, Vollblut, Harn oder Liquor eingeschickt.
- Da wir CMV aus diesen verschiedenen Materialien machen müssen, wollten wir einen Vergleich der Ergebnisse aus diesen Materialien.
- Da zu diesem Zeitpunkt gerade ein neuer Test auf den Markt kam, haben wir diesen in die Studie mit einbezogen

Material



- Wir haben in Zusammenarbeit mit den Stationen über einen längeren Zeitraum von zuvor CMV Positiv getesteten erwachsenen Patienten Neuabnahmen von Vollblut, Plasma, Serum und Harn (kein Liquor) gesammelt.
- Diese 4 Materialien wurden an Hand der zuvor bestimmten Viruslast so verdünnt, dass die letzte Verdünnung an der Nachweisgrenze zu liegen kam.

Material



- Wir erhielten von 8 Patienten die gewünschten 4 Materialien.
- Jedes dieser Materialien wurde in der Original Konzentration sowie in 3 Verdünnungen getestet.
- Insgesamt ergaben sich so 128 Samples, die in den 2 PCR's getestet wurden, so dass sich eine Gesamtzahl von 256 PCR Ansätzen ergab.

Methoden



- Die Verdünnungen wurden auf der Magna Pure LC 2.0 aufgereinigt und die erhaltenen Eluate wurden in der PCR eingesetzt.
- Aus jedem Eluat wurde eine R-Gene und eine AnDiaTec PCR angesetzt und beide wurden am Light Cycler 480 gefahren.
- Die Auswertung erfolgte mittels der Light Cycler 480 Software.

Ergebnisse



- 3 der Urinproben waren in allen Ansätzen negativ und wurden daher aus den weiteren Berechnungen ausgeschieden.
- Alle anderen Proben waren in zumindest einem Ansatz einer der beiden PCR Kits positiv.

Ergebnisse



Rohdaten der Patienten 1-4

	Pat	Verd	Argene	CP Argene	AnDiaTec	CP AnDiaTec
Plasma	1	1	pos	35,37	pos	32,7
Plasma	1	2	pos	36,5	pos	33,9
Plasma	1	3	neg	0	pos	35
Plasma	1	4	pos	38	neg	0
Plasma	2	1	pos	34,8	pos	32,7
Plasma	2	2	pos	36	pos	33,3
Plasma	2	3	neg	0	pos	34
Plasma	2	4	neg	0	pos	34,4
Serum	1	1	pos	36	pos	32,3
Serum	1	2	pos	38	pos	34
Serum	1	3	neg	0	pos	34
Serum	1	4	neg	0	neg	0
Serum	2	1	pos	35,23	pos	32,3
Serum	2	2	pos	37,8	pos	33,2
Serum	2	3	neg	0	pos	34
Serum	2	4	neg	0	neg	0
Blut	1	1	pos	35,3	pos	33,7
Blut	1	2	pos	38	pos	33,6
Blut	1	3	pos	38	neg	0
Blut	1	4	neg	0	neg	0
Blut	2	1	pos	32,24	pos	32,1
Blut	2	2	pos	34,4	pos	32,9
Blut	2	3	pos	36,5	pos	34
Blut	2	4	pos	37	pos	35
Harn	1	1	neg	0	neg	0
Harn	1	2	neg	0	neg	0
Harn	1	3	neg	0	neg	0
Harn	1	4	neg	0	neg	0
Harn	2	1	pos	31,7	pos	30,8
Harn	2	2	pos	33,4	pos	32,1
Harn	2	3	pos	35,9	pos	33,8
Harn	2	4	pos	35,9	pos	33,8

Plasma	3	1	pos	35,9	pos	33
Plasma	3	2	neg		pos	33,8
Plasma	3	3	neg		pos	35
Plasma	3	4	neg		neg	
Plasma	4	1	pos	37,2	pos	33,6
Plasma	4	2	pos	38,5	pos	33,6
Plasma	4	3	neg		pos	33,3
Plasma	4	4	neg		neg	
Serum	3	1	pos	38,1	pos	33,5
Serum	3	2	neg		pos	33,8
Serum	3	3	neg		neg	
Serum	3	4	pos	41	neg	
Serum	4	1	pos	39	pos	33,4
Serum	4	2	neg		pos	33,7
Serum	4	3	neg		neg	
Serum	4	4	neg		neg	
Blut	3	1	pos	34,7	pos	33,3
Blut	3	2	pos	37	pos	33,5
Blut	3	3	neg		neg	
Blut	3	4	neg		neg	
Blut	4	1	neg		pos	33,9
Blut	4	2	pos	39	neg	
Blut	4	3	neg		neg	
Blut	4	4	neg		neg	
Harn	3	1	pos	33,3	pos	31,9
Harn	3	2	pos	35,6	pos	33,4
Harn	3	3	pos	40	neg	
Harn	3	4	pos	39	neg	
Harn	4	1	neg		neg	
Harn	4	2	neg		neg	
Harn	4	3	neg		neg	
Harn	4	4	neg		neg	

Ergebnisse



- Mit dem R-Gene Kit erhielten wir 72 positive und 44 negative Ergebnisse
- Der AnDiatec Kit ergab 85 positive und 31 negative Ergebnisse.
- Der R-Gene Kit detektierte 8 Positive, die der AnDiaTec Kit als negativ erkannt hatte.
- Der AnDiTec Kit Detektierte 21 positiv, welche der R-Gene Kit als negativ ausgegeben hatte.

Zusammenfassung



- Unsere Untersuchung ergab, dass sich Plasma, Serum und Vollblut nicht signifikant unterscheiden, so dass alle 3 Materialien verwendet werden können.
- Harn ist als Material nicht geeignet, da CMV nicht von allen Patienten in den Harn ausgeschieden wurde.

Zusammenfassung



In Bezug auf die beiden Real Time PCR Kits von AnDiaTec und R-Gene ergaben unsere Untersuchungen, dass die beiden Tests ungefähr gleich gut abschneiden, wobei der Test von AnDiaTec auf Grund der saubereren Basislinie von der Software schwach signifikant (0,07) besser ausgewertet werden konnte.



Vergleich von zwei HBV Real Time PCR Kits an Patientenproben

Hintergrund der Studie



- Diese Arbeit wurde als Diplomarbeit von Frau Kathrin Roth durchgeführt.
- In der Therapie ist eine genaue und sensitive Detektion des Virusloads unbedingt erforderlich
- Als Probenmaterial wird Plasma verwendet.

Material



- Es sollte ein neuer Test mit den Routine Ergebnissen des Cobas Ampliprep/Cobas Taqman HBV 2.0 (Roche) verglichen werden.
- Aus den Ergebnissen des Routinetests wurden schwach positive Patientenproben ausgewählt, von denen eingelagerte, tiefgefrorene Aliquotes wieder aufgetaut und danach mit einem neuen Test nachgetestet werden sollten.

Methoden



- Die Proben wurden auf der Magna Pure LC 2.0 aufgereinigt und am Light Cycler 480 analysiert.
- Als Vergleichs Kit sollte zuerst ein anderer Kit verwendet werden. Da dieser aber mit unseren Geräten nicht funktionierte, wurde der Eligen HBV RT Kit verwendet, welcher sowohl auf dem Light Cycler 2.0 als auch dem Light Cycler 480 funktioniert.

Methoden



- Auf Grund unserer Geräteausstattung stand dem Eligen Kit weniger als $\frac{1}{4}$ der Ausgangsmenge an Plasma zur Verfügung, wodurch sich die zu erwartende Nachweisgrenze auch entsprechend verschob.
- Da wir über einen längeren Zeitraum tiefgefrorene Aliquotes verwendeten, war ein gewisses absinken der Virusload zu erwarten.

Ergebnisse



- Wie ich bereits in einer anderen Arbeit zeigen konnte, hat die Aufreinigungsmethode großen Einfluss auf die PCR, da das Eluat einen nicht zu unterschätzenden Anteil des PCR Ansatzes stellt und somit das Puffersystem maßgeblich beeinflusst.
- In dieser Arbeit erlebten wir einen Extremfall, der die Effizienz der PCR auf unter 1,4 senkte und damit das ursprünglich geplante Testkit unbrauchbar machte.

Ergebnisse



- Dankenswerter Weise bekamen wir sehr schnell ein Testkit von Eligen zur Verfügung gestellt, so dass wir die Diplomarbeit fortsetzen konnten.
- Unsere Überlegungen zum Versuchsansatz:
 - ✦ Es kann nur weniger als $\frac{1}{4}$ an Probenmaterial eingesetzt werden, daher ist die zu erwartende Nachweisgrenze ungefähr 4-5 mal so hoch wie bei Roche.
 - ✦ Es wurden wiederaufgetaute Aliquotes welche über einen längeren Zeitraum eingefroren waren, wodurch die darin enthaltene HBV DNA abgenommen hat, so dass wir insgesamt mit einer unteren Nachweisgrenze vom 5-6 fachen im Vergleich zum Roche Test rechnen haben.

Ergebnisse



- Von den 40 ausgewählten Proben waren 22 unter der zu erwartenden Nachweisgrenze von 120 IU/ml und wir erwarteten somit, dass der Eligen Kit mindestens 18 Proben detektieren sollte.
- Es stellte sich heraus, dass der Eligen Kit 23 Proben erfolgreich detektieren konnte.
- Der Eligen Kit zeigte eine schöne Korrelation der Werte (mit 3 Ausreißern) und entsprach in unserem Test allen Erwartungen.

Anmerkung



- Nach Ende der Diplomarbeit bekamen wir ein Aufreinigungsgerät, das auch für größere Volumina geeignet war zum Test.
- Wir testeten den ursprünglichen Kit und auch den Eligen Kit noch mal mit diesen Eluaten.
- Da sich die Eluate dieses Geräts mit dem Puffersystem des ursprünglichen Kits vertrugen, funktionierte es diesmal einwandfrei.
- Und auch der Eligen Kit erreichte auf Grund des größeren Ausgangsvolumens von 1 ml eine deutlich niedrigere Nachweisgrenze, die mit der von Roche zu vergleichen war.

Danke für ihre Aufmerksamkeit

