

COMPARE-Ringversuch für NGS-basierte Diagnostik von FFPE-Material

Dirk Höper und Claudia Wylezich

FLI, Institut für Virusdiagnostik, Labor für NGS und Microarray-Diagnostik

Im Rahmen des COMPARE-Projekts wurden erstmals Ringversuche für die NGS-basierte Diagnostik durchgeführt, um Standards dafür zu erarbeiten und den routinemäßigen Einsatz dieser Methode zur Pathogendetektion zu ermöglichen. Im LabLoeffler 18 haben wir bereits über zwei dieser Ringversuche berichtet (Höper und Wylezich, 2019, Heft 1) und möchten nun die wichtigsten Ergebnisse des dritten COMPARE-Ringtestes (FFPE Ring Trial) vorstellen. Dieser wurde 2019 vom Labor für NGS am FLI mit Unterstützung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover organisiert. Der Ringversuch bestand aus einem Labor- und einem bioinformatischen Analyse-Teil.

Den elf teilnehmenden Arbeitsgruppen wurde Formalinfixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE-) Probenmaterial von zwei Fallstudien zugeschickt: 1. Leber eines Wildkaninchens, infiziert mit einem einzelsträngigen RNA-Virus (Rabbit haemorrhagic disease virus 2, RHDV-2) und 2. Leberprobe eines Fohlens, infiziert mit einem doppelsträngigen DNA-Virus (Equine herpesvirus 1, EHV-1). Abgefragt wurde anschließend neben der Zusammenfassung und diagnostischen Einschätzung der Ergebnisse auch die Vorerfahrung mit der Bearbeitung von FFPE-Material sowie exakte Angaben zu Prozessierung und Analyse der Proben.

Alle Teilnehmer gaben an, NGS-Methoden routinemäßig anzuwenden, aber nur drei von ihnen hatten in diesem Kontext bereits Erfahrung mit FFPE-Material. Zehn Teilnehmer waren erfolgreich in der Bearbeitung und Sequenzierung des Testmaterials und detektierten mindestens eines der Targetviren. Demnach kamen die Teilnehmer mehrheitlich gut zurecht mit dem besonderen Ausgangsmaterial. Die kommerziell verfügbaren Extraktions-Kits zeigten tendenziell eine gute Performance. Der für Erfolg und Qualität der Extraktion entscheidende Schritt besteht in der Art der anfänglichen Deparaffinisierung und dem de-crosslinking der Probe (Abb.).

Die größten Unterschiede in den Ergebnissen wurden allerdings nicht durch die Wahl des Extraktionskits hervorgeru-

fen, sondern durch die Wahl der verwendeten Nukleinsäure und die weitere NGS-Prozessierung. Hinsichtlich der Nukleinsäure ergab eine Gesamtanalyse aller eingereichten Datensätze, dass im Fall eines RNA-Virus in der Probe die gemischte Weiterbearbeitung von RNA und DNA zum Verlust des Virus-Signals im Datensatz führt (Abb. links). Im Gegensatz dazu führte die Bearbeitung der reinen RNA-Fraktion mit einer Ausnahme (Teilnehmer 4, hier war der erzeugte Datensatz zu klein, um angesichts des Virusgehaltes der Probe das Virus zu detektieren) immer zur Detektion des RNA-Virus. Und auch ein replizierendes DNA Virus kann im RNA-basierten Datensatz detektiert werden (Abb. rechts).

Bezüglich der NGS-Prozessierung zeigte sich, dass die Addition eines rRNA-Depletion-Schrittes im NGS-Workflow zur Verstärkung des Virus-Signals führen kann (Teilnehmer 2). Hingegen führte der Einsatz eines modifizierten SISPA-Protokolls (Reyes GR, Kim JP (1991). Mol Cell Probes 5: 473-481) für die cDNA-Herstellung zwar zu einer Anreicherung des Virus-Signals aber zu einer verzerrten Genom-Abdeckung und Verschlechterung der Datenqualität (Teilnehmer 3).

Insgesamt konnten wichtige Erkenntnisse aus dem FFPE-Ringversuch gezogen werden (Höper et al., in Vorbereitung). Darauf basierend wurden am FLI weitere Kit-Vergleiche zur Nukleinsäure-Extraktion aus diesem speziellen Material durchgeführt (mittels truXTRAC FFPE total NA Kit, Covaris; Agencourt RNAdvance Tissue Kit, Beckman Coulter; Formapure Total DNA & RNA Extraction Kit, Beckman Coulter; miRNAeasy FFPR Kit, Qiagen). Die Optimierung und Validierung des besten Extraktions-Protokolls ist derzeit in Bearbeitung. Anschließend kann das optimierte Protokoll für älteres und archiviertes Probenmaterial angewendet werden, um die Phylogenie und Evolution viraler Erreger zu studieren.

Noch ein Hinweis in eigener Sache: das Labor für NGS am FLI (Labor für NGS-basierte Pathogencharakterisierung und Tierseuchendiagnostik) hat ein neues Formular für die Ein-sendung von Probenmaterial entwickelt (F 14-3), welches für zukünftige Einsendungen genutzt werden muss und zur Verfügung gestellt werden kann (Anfragen und Einsendungen an: NGS.Riems@fli.de).

Link zum COMPARE-Projekt: www.compare-europe.eu

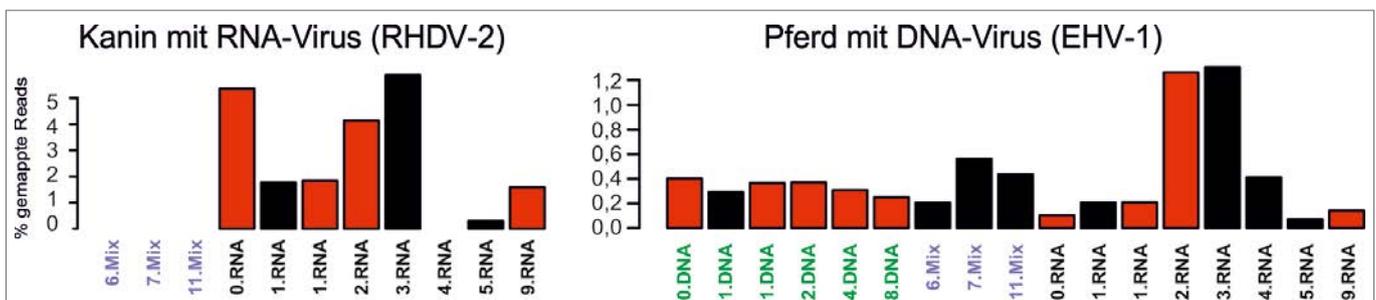


Abb.: Ergebnisse des FFPE-Ringtestes für 11 Teilnehmer (s. Nummerierung a. d. X-Achse; dort auch die genutzte Nukleinsäure, DNA, RNA oder ein Mix aus DNA und RNA; P0 = Pilotstudie, P8 bearbeitete nur DNA, P10 hat kein Ergebnis eingereicht). Angegeben ist die prozentuale Readanzahl des Targetvirus (RHDV-2 oder EHV-1) erhalten mittels Mapping-Analyse gegen die Referenzsequenz (erstellt aus nativem Material). Für die Rot-markierten Datensätze wurde Deparaffinisierung und de-crosslinking mittels spezieller Deparaffinisierungslösung (Qiagen) durchgeführt, während für die Schwarz-markierten Datensätze mit anderen Substanzen (meist Xylo) deparaffiniert wurde.