

Anwenderbericht: Prozessoptimierung durch konsequente Automatisierung

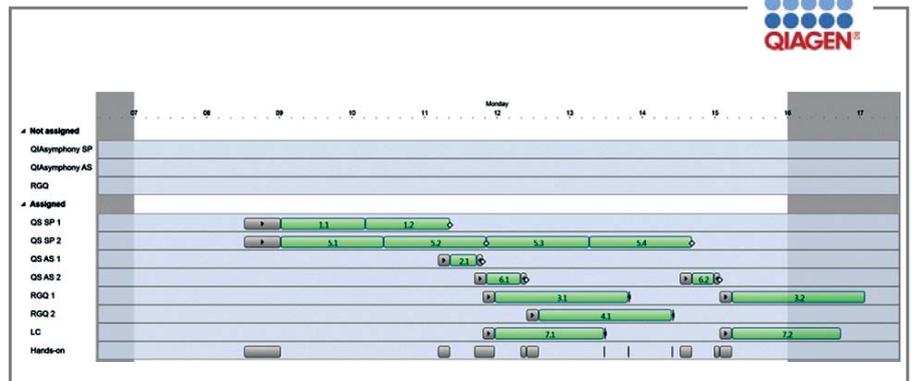
Virologisches Monitoring nach Transplantation

Der Erfolg der Transplantationsmedizin hängt nicht unwesentlich davon ab, wie sicher virale Infektionen erkannt und behandelt werden. Eine weitgehende Standardisierung und Automatisierung der Arbeitsabläufe im molekularbiologischen Labor verhilft Ärzten und Patienten zu schnellen, validen Ergebnissen und reduziert die Personalbindung.

Maligne oder systemische Erkrankungen und Entzündungen können ein Organ-system so gravierend und irreversibel schädigen, dass nur noch eine Transplantation hilft. Im Laufe der letzten Jahre haben sich sowohl Umfang und Spektrum der möglichen Eingriffe als auch die Einschlusskriterien für eine Verpflanzung von Organen bzw. Knochenmark erheblich erweitert.

Wichtige Voraussetzung für eine gelungene Transplantation sind die heute verfügbaren, sehr potenten Immunsuppressiva zur Unterdrückung des Immunsystems im Empfänger. Bei einer soliden Organtransplantation wird so die Abstoßungsreaktion verhindert (*host vs. graft disease*), im Falle einer Knochenmark-Transplantation das körpereigene Gewebe vor den Angriffen der Abwehrzellen des transplantierten Knochenmarks geschützt (*graft vs. host disease*).

Die Kehrseite der Medaille ist, dass jede Reduktion der physiologischen Abwehrfunktionen mit einer wachsenden Anfälligkeit gegenüber Infektionen einhergeht. Transplantierte Patienten haben deshalb ein stark erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen durch Pilze, Bakterien und Viren. Insbesondere virale Infektionen sind für eine erhöhte Morbidität und Letalität unter den Transplantierten verantwortlich. Das gilt sowohl in der akuten Phase während und unmittelbar nach der Transplantation (Induktionsperiode) als auch in den Wochen, Monaten und Jahren danach. Deshalb ist eine rasche und sichere Virusdiagnostik mit ausschlaggebend für den kurz- und langfristigen Therapieerfolg.



Mithilfe der Softwareapplikation QIASymphony® RGQ Schedule kann man den Workflow der beiden QIASymphony-Geräte so aufeinander abstimmen, dass sie entsprechend den konkreten Anforderungen optimal beladen sind.

Virale Infektionen nach Transplantation

Die Palette viraler Erreger, die den Organ- oder Stammzellempfänger bedrohen, ist groß. In erster Linie zählen dazu Cytomegalie- (CMV) und Epstein-Barr-Virus (EBV), weitere Vertreter der Herpesgruppe, etwa Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1), Herpes Simplex Virus-2 (HSV-2), Varizella Zoster Virus (VZV), Humanes Herpes Virus-6 (HHV-6), Humanes Herpes Virus-8 (HHV-8), Polyomaviren (BK- und JC-Virus) sowie Adenoviren.

Da einige dieser Viren unter Immunsuppression aus einer Latenzphase reaktivieren können, gilt ein molekularbiologisches Monitoring als sinnvolle Strategie, um zum frühestmöglichen Zeitpunkt eine Reaktivierung oder Neuinfektion zu erkennen. Spektrum und Frequenz für das Monitoring hängen von der Virusart, dem transplantierten Organsystem, dem Patientenstatus und dem zeitlichen Abstand zur Transplantation ab. Deshalb muss jedes Zentrum hier individuelle Festlegungen

Herstellerkontakt

QIAGEN GmbH • Dr. Antje Plaschke-Schlütter • antje.plaschke-schluetter@qiagen.com • www.qiagen.com

treffen. Generell gilt: Je geringer der Abstand zum Eingriff, desto häufiger erfolgt die entsprechende Diagnostik. In den ersten drei Monaten nach der Transplantation sollte das Screening für CMV und EBV wöchentlich erfolgen. In akuten Infektionsphasen und zur Kontrolle des Therapieerfolges kann die Testfrequenz sogar noch höher sein.

Natürlich müssen neben den genannten opportunistischen Erregern – bei entsprechender Symptomatik - auch immer akute virale Infektionen in die differenzialdiagnostischen Überlegungen eingeschlossen werden, zum Beispiel saisonale Influenzaviren, *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) oder Noroviren.

Anforderungen an das Labor

Das diagnostische Labor steht in diesem Zusammenhang vor der methodischen und organisatorischen Herausforderung, aus einer Vielzahl unterschiedlicher Matrices ein sehr breites Spektrum an Viren mit hoher Sensitivität und Spezifität sicher detektieren zu müssen. Für das Monitoring sollten zudem bestimmte virale Targets quantitativ bestimmt werden, um eine Aussage über die Dynamik – zum Beispiel einer Virämie – treffen zu können.

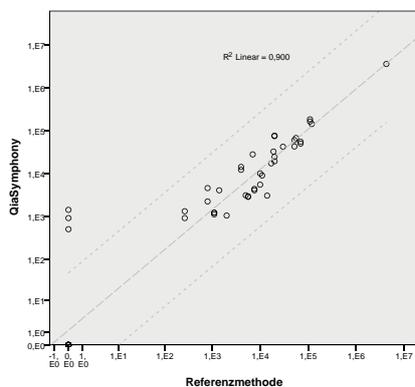
Die Aufgabe besteht dabei nicht nur in der Beantwortung der individuellen Fragestellungen für jeden einzelnen Patienten, sondern auch darin, die erforderliche Effizienz und Wirtschaftlichkeit des Laborbetriebes im Auge zu behalten. Außerdem gilt es, die Vorgaben und Rahmenbedingungen des Qualitätsmanagements zu erfüllen. Wertvolles Personal sollte nicht für einfache, repetitive Tätigkeiten eingesetzt werden, wenn es dafür technische Lösungen gibt. Alle relevanten Informationen zum Patienten, zum diagnostischen Prozess oder zu den Testergebnissen müssen außerdem ohne fehleranfällige Transformations- und Übertragungsprozeduren sowohl innerhalb des Labors, als auch zwischen Labor und behandelndem Arzt rasch ausgetauscht werden können. Nur so ist ein adäquates, unmittelbares Fallmanagement gewährleistet.

Umsetzung

Vor diesem Hintergrund sind Methoden und Plattformen wünschenswert, die möglichst in einem gemeinsamen Arbeitsgang sowohl die RNA/DNA-Extraktion aus diversen Untersuchungsmaterialien als auch das PCR-Setup automatisiert durchführen. Die Amplifikation und Detektion mit einem universellen Protokoll sollte sich möglichst lückenlos anschließen. Das gilt besonders für die Schlüsselparameter mit hohem Durchsatz. Außerdem sollte das System an jeder der genannten Schnittstellen offen

für das Aus- und Einschleusen von Probenmaterial in den Prozess sein, um auch bei komplexen Anforderungen schnell und flexibel handeln zu können.

Im Zuge der Umstellung von gelbasierter Detektion auf Real-time-PCR haben wir im Jahr 2013 zwei *QIASymphony*-Systeme installiert, die Extraktions-(SP)- und PCR-Setup-(AS)-Module der Firma Qiagen miteinander kombinieren. Sie wurden nach umfangreicher Validierung für die quantitative BKV- und EBV-PCR in Betrieb genommen. Gegenwärtig laufen weitere Validierungsserien für HSV, VZV und CMV. Wir führen zwei ver-



Die Ergebnisse der Validierungsläufe zur EBV-Viruslast zeigen eine gute Reproduzierbarkeit über einen weiten Messbereich. Die mit *QiaSymphony* gemessenen Werte (y-Achse) wurden gegen die Referenzmethode aufgetragen.

schiedene Extraktionsprotokolle durch (*VirusBlood200* und *Complex200*), mit denen die Nukleinsäure-Extraktion aus fast allen eingehenden Probenmaterialien gelingt. Das Eluat wird in der Regel in barcodierte Deepwell-Platten und bei Bedarf auch in andere Röhrchenformate aliquotiert. An die Extraktion schließt sich das PCR-Setup je nach Workflowdefinition nahtlos an. Proben, die manuell mittels Kartusche (z. B. EZ-1) separat eluiert wurden, können in die PCR-Setup-Prozeduren problemlos eingeschleust werden.

Die Detektion und Amplifikation mit einem universellen Protokoll übernehmen unter anderem zwei *RotorGene*-Plattformen, die ihre Proben- und Testspezifikationen von der SP/AS-Einheit elektronisch erhalten. Über eine Schnittstelle zum Laborinformationssystem soll auch die Übertragung der Anforderungen, der qualitativen und quantitativen Messwerte, der Kontrollen und ggf. der CT-Werte sofort und fehlerfrei möglich werden. Mit dem Programm *QIASymphony RGQ Schedule* wird der Prozess optimal an die konkreten Anforderungen adaptiert. Das System ist offen für Fremdtests. Jedes Modul kann separat verwendet werden. Dadurch lassen sich auch größere Probenserien – etwa im Rahmen wissenschaftlicher Studien – gut bewältigen.

Autorenkontakt

Dr. Michael Baier • Universitätsklinikum Jena • Michael.Baier@med.uni-jena.de