

## Anwenderbericht

# Pathogennachweis aus FFPE-Material

**Ein Methodenvergleich zeigt, dass sich die artus-PCR-Assays von QIAGEN zum Nachweis stark fragmentierter Herpesvirus-DNA in FFPE-Proben eignen. Sie stellen somit eine interessante Alternative zu „home-brew“-Protokollen dar.**

Der qualitative und quantitative Pathogennachweis aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem (FFPE-) Material gehört zu den größten Herausforderungen an die molekulare Diagnostik. Er ist in der Regel dem Arbeitsgebiet der Molekularpathologie zuzuordnen, vor allem dann, wenn unfixiertes klinisches Material für weiterführende mikrobiologische und virologische Untersuchungen nicht zur Verfügung steht. Das Spektrum der in der Molekularpathologie untersuchten Pathogene, welche aus FFPE-Material nachgewiesen werden müssen, reicht von Mykoplasmen, Chlamydien und anderen bakteriellen Pathogenen über die komplexe Gruppe der atypischen Mykobakterien (zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis*, MOTT<sup>1</sup>) bis hin zu DNA-Viren wie etwa Adenoviren, humanen Herpes- und Papillomviren, Polyomaviren (vor allem die Polyomaviren JC und BK sowie Merkel-Cell-Polyomaviren). Aus der Gruppe der Herpesviren sind vor allem die Herpes simplex Viren vom Typ 1 und 2 (Herpes labialis und Herpes genitalis, HSV-1 und HSV-2), das Cytomegalovirus (CMV), das Varizella-Zoster-Virus (VZV), sowie das Epstein-Barr Virus (EBV) von Bedeutung.

## Fragmentierte Nukleinsäuren

Die Formalinfixierung und das anschließende Einbetten der Proben in Paraffin führt bekanntermaßen zur Schädigung, insbesondere zu Fragmentierungen der eingebetteten DNA. Durch molekulare Quervernetzungen während der Formalinfixierung, die nur schwer oder unzureichend reversibel gemacht werden können, verringert sich die Ausbeute intakter DNA erheblich; es finden sich überwiegend kurze bis sehr kurze Sequenzen mit ca. 500 bis 1.000 Basenpaaren.

Aus diesem Grund ist es für die Molekulardiagnostik von FFPE-Material von entscheidender Bedeutung, kurze DNA-Abschnitte der gesuchten Pathogene sensitiv amplifizieren und korrekt identifizieren zu können – eine technische Herausforderung,

<sup>1</sup> MOTT = mycobacteria other than tuberculosis

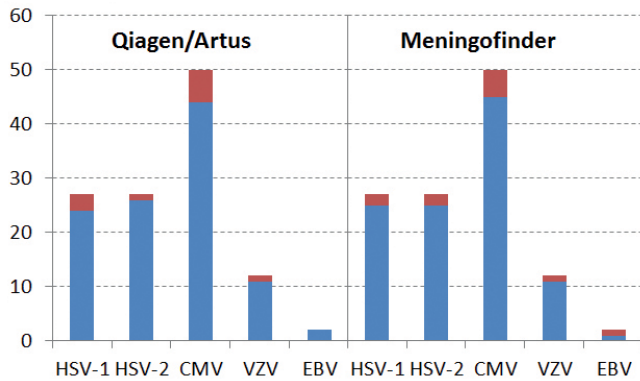


*Workflow-Schema für den Pathogennachweis aus FFPE-Material: Aus entwässerten und in Formalin eingebetteten Gewebeproben lassen sich meist nur DNA-Bruchstücke für die PCR gewinnen. Deshalb müssen Extraktions- und PCR-Kits gut aufeinander abgestimmt sein und sorgfältig evaluiert werden.*

die von aktuellen Methoden der Realtime-PCR durchaus erfüllt werden kann. In unserem Labor haben wir kommerzielle Testsysteme der Firma QIAGEN evaluiert und die QIAGEN/artus Realtime-PCR-Assays zur Detektion humaner Herpesviren (HSV1, HSV2, VZV, CMV, und EBV) aus FFPE-Proben getestet.

## Herstellerkontakt

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



**Methodenvergleich:** Mit beiden Verfahren wurden nahezu identische Zahlen positiver (rot) und negativer (blau) Testergebnisse erhalten. Weitere Erläuterungen im Text.

## Methoden

Zwischen April 2010 und September 2012 erhielten wir 91 Anfragen zur Untersuchung klinischer FFPE-Materialien auf humane Herpesviren 1 bis 5. Die Proben waren nach Routine-Protokollen mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet und wurden zunächst mikroskopisch untersucht. Ein erfahrener Pathologe beurteilte alle Schnitte und veranlasste bei histologischem Verdacht weitere molekularpathologische Untersuchungen.

Die Extraktion viraler Nukleinsäuren aus dem FFPE-Material erfolgte mit dem FFPE-Kit von QIAGEN, Hilden. PCR-Tests wurden mit den QIAGEN/artus-Assays für HSV-1/2, CMV, VZV und EBV nach Herstellerangaben auf der *LightCycler-1.5*-Plattform durchgeführt.

Zur Bestätigung der Ergebnisse testeten wir alle PCR-positiven Proben mit dem *Meningofinder*-Assay (*Pathofinder*, Maastricht, NL) laut Herstellerangaben nach. Er basiert auf einer Prä-Amplifikation, gefolgt von einer ligationsabhängigen Sonden-Amplifikation (MLPA), die sich in unserem Labor bereits früher als geeignete Methode zum Mutations- und Gennachweis aus FFPE-Material bewährt hatte.

## Ergebnisse

Von den 91 Proben erwiesen sich bei Anwendung unterschiedlicher Methoden insgesamt 79 als virusfrei. Die positiven Resultate sind in Abb. 2 zusammengefasst. 27 Proben wurden auf HSV-1 und HSV-2 getestet; davon waren drei positiv für **HSV-1** (11 Prozent) und eine positiv für **HSV-2** (4 Prozent).

50 Proben wurden auf **CMV** getestet, wobei sechs Mal CMV-DNA nachzuweisen war (12 Prozent). Weitere 12 Proben wurden auf **VZV**-DNA getestet; in einer Probe konnten wir VZV-DNA nachweisen (8 Prozent). **EBV**-DNA war in keiner der beiden auf EBV untersuchten Proben nachweisbar.

Alle für herpesvirale DNA positiven Ergebnisse konnten wir mit der *Meningofinder*-Methode verifizieren; in einem Fall detektierte der *Meningofinder*-Assay HSV-2 anstelle von HSV-1, allerdings bei einem sehr niedrigen CT-Wert. Darüber hinaus fand der *Meningofinder* in einer zuvor HSV-1-positiv getesteten Probe EBV, welches vorher mangels Anforderung nicht untersucht worden war.

## Schlussfolgerung

Unsere Pilotstudie belegt erstmals, dass die QIAGEN/artus-Assays zum Nachweis herpesviraler DNA aus FFPE-Proben geeignet sind. Obwohl das von uns vorgeschlagene Verfahren noch nicht für FFPE-Material CE-IVD-markiert ist, funktioniert es reproduzierbar und stellt daher eine interessante Alternative zum Einsatz sogenannter „home-brew“ Protokolle dar.

Die Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen zudem, dass unterschiedliche PCR-Plattformen, vor allem auch der RotorGene Q, zum Einsatz kommen können und somit das Portfolio der molekularpathologischen Diagnostik sinnvoll ergänzen. Die Bestätigung der Resultate durch eine weitere, ebenfalls kommerziell erhältliche Methode unterstreicht dieses positive Fazit.



Der Autor dieses Anwenderberichts, Prof. Dr. Oliver Schildgen (Kontakt s. u.), mit seiner Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie.

## Autorenkontakt

Prof. Dr. rer. nat. Oliver Schildgen • Kliniken der Stadt Köln gGmbH, Krankenhaus Merheim • schildgeno@kliniken-koeln.de