

Gerätevergleich der VRE Screening PCR vom Cobas 4800 und dem STARlet

Christina Lovric, BMA20-23

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Institut für Infektionskrankheiten, Molekulare Analytik

1. Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit geht es um die PCR-Analytik von Vancomycin resistenten Enterokokken (VRE). Es soll die Frage beantwortet werden, ob die in-House VRE-PCR zukünftig vom Gerät STARlet durchgeführt werden kann und somit das Gerät c4800 ersetzen kann. Beide Geräte bereiten die PCR-Platte für die Real-Time PCR vor. Es wurden drei Experimente durchgeführt: Vergleich der Extraktion, die Reduktion des PCR-Volumens und Parallelmessungen der Routineanalytik. Als Material wurden bereits identifizierte Keime aus der Bakteriologie zur Verfügung gestellt sowie Rektalabstriche aus der Routineanalytik. Für die Auswertung wurden die Mittelwerte der Ct-Differenzen, übereinstimmende und nicht-übereinstimmende Resultate verglichen. Dabei wurden Tabellenformate, Bland-Altman-Diagramme sowie eine Übersichtstabelle erstellt. Die Ergebnisse sind mit wenigen Ausnahmen, welche begründbar sind, übereinstimmend. D.h. die Extraktion zwischen den Geräten ist vergleichbar, das PCR-Volumen kann reduziert werden und der STARlet hat in den Routinemessungen keine falsch negativen Ergebnisse generiert. Somit kann die VRE-PCR-Analytik zukünftig vom STARlet ersetzt werden.

2. Einleitung

Im Dezember 2017 gab es im Inselspital Bern eine Enterokokken-Ausbreitung [1], weshalb monatlich die Suche nach VRE durchgeführt wird, um Ausbrüche schnell zu erkennen. [2] Ziel dieser Diplomarbeit ist es zu überprüfen, ob der Test auf die STARlet Plattform gewechselt werden kann, bei gleichbleibender oder gesteigerter analytischer Qualität. Der verwendete PCR Thermocycler (Cobas z480) für die Amplifikation und Detektion bleibt identisch. [3] Für die VRE-Analyse braucht es die Extraktion, die Real-Time PCR sowie die Auswertung. Die Extraktion erfolgt bei beiden Geräten vollautomatisiert sowie das anschliessende Pipettieren des Master Mixes (MM), welcher für die PCR benötigt wird. Bei der Extraktion werden die Nukleinsäuren durch Zugabe von Proteinase und Lyseagens zur Probe freigesetzt. Die freigesetzten Nukleinsäuren binden an die Siliziumdioxid-Oberfläche der hinzugefügten magnetischen Glaspartikel. Nicht gebundene Substanzen und Verunreinigungen wie denaturierte Proteine, Zelltrümmer und potenzielle PCR-Inhibitoren werden durch anschliessende Waschschriffe entfernt. Die aufgereinigten Nukleinsäuren werden danach mit einem Elutionspuffer bei erhöhter Temperatur von den magnetischen Glasparkeln gelöst. Nach der Extraktion pipettiert das Gerät den MM hinzu. Anschliessend kann die Mikrotiterplatte in den Cobas z480 transferiert werden wo die Amplifikation und Detektion mittels Echtzeit-PCR statt findet. [4] Bei der PCR geschieht die Amplifikation durch ein keimspezifisches Temperaturprogramm, welches 40-50 mal wiederholt wird. Zuerst wird die doppelsträngige DNS in Einzelstränge denaturiert was bei 96°C erfolgt. Danach folgt das Annealing. Dabei werden die zielequenz-spezifischen Startnukleotide (genannt Primer) angelagert bei einer Temperatur von 55-65°C, welche als Startpunkt für den nächsten Schritt dienen. Anschliessend findet bei ca. 72°C die Elongation statt. Die DNS-Polymerase bindet an die Primer und lagert nacheinander einzelne Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) an, welche an den komplementären Einzelstrang passen. Dadurch entsteht wieder eine doppelsträngige DNS. Der Vorgang wird wiederholt bis eine exponentielle Zunahme detektiert wird. [5] Dies geschieht mittels Fluoreszenzstrahlung, welche freigegeben wird wenn der Reporter vom Quencher getrennt wird, welcher als gebundene Gensonde vorkommt. Vier Kanäle werden gemessen: vanB, vanA, E.faecium sowie die interne Kontrolle (IC). Das sind drei verschiedene Genotypen sowie die Kontrolle, dass die PCR funktioniert hat. [6]

3. Ziele und Fragestellungen

Die Fragestellung des übergeordneten Ziels lautet wie folgt:

→ Kann die in-House VRE-PCR zukünftig vom Gerät STARlet extrahiert und vorbereitet werden und daher das Gerät c4800 ersetzen?

Die daraus entwickelte Fragestellung lautet wie folgt:

→ Kann das bisherige PCR-Volumen, welches auf dem c4800 eingesetzt wurde, beim STARlet von 50µl auf 20µl reduziert werden?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Beim Experiment 1 wird die Extraktion verglichen. Es werden je nach Verfügbarkeit bis zu drei Isolate von den folgenden sieben verschiedenen Enterokokken-Genotypen im Triplikate untersucht: *Enterococcus faecium* (efam), efam vanB, *Enterococcus faecium* mit Genotyp vanA (efam vanA), *Enterococcus faecalis* (efal), *Enterococcus faecalis* mit Genotyp vanB (efal vanB), *Enterococcus faecalis* mit Genotyp vanA (efal vanA) sowie efam vanB/ vanA. Beim Experiment 2 werden drei unterschiedlichen PCR-Volumen ausschliesslich auf dem STARlet verglichen: 1. 25µl MM plus 25µl Extrakt, 2. 10µl MM plus 10µl Extrakt, 3. 15µl MM plus 5µl Extrakt. Es werden Extrakte von allen 7 Stämmen dreimal 1/10 verdünnt und jeweils im Triplikate getestet, um zu evaluieren, ob eine Reduktion des Volumens möglich ist bei gleichbleibender PCR-Effizienz. Beim Experiment 3 werden Parallelläufe zwecks Verifizierung gestartet. Patientenproben aus der Routine werden mit der neu optimierten Variante gemessen (Variante 2.) und mit der bestehenden PCR verglichen. Die Ct-Werte dürfen nicht mehr als drei Zyklen zum bestehenden Gerät abweichen. Der STARlet darf keine falsch negativen Resultate generieren.

5. Ergebnisse/ Resultate

Ergebnis anhand des van-B-Kanals im Experiment 1, ergibt den Mittelwert der Ct-Differenz zwischen beiden Geräten -0.21.

Beim Experiment 2 ergeben die Mittelwerte der Ct-Differenz zwischen Variante 1 und 2 beim vanB-Kanal -0.01.

Zwischen Variante 1 und 3 ergibt die Differenz -1.02 im vanB-Kanal. Beim Experiment 3 sind neun Messungen richtig positiv. Drei Messungen sind richtig unklar. 87 Messungen sind richtig negativ. Zwei Messungen sind falsch negativ bezüglich der unklaren Ergebnisse. D.h. der c4800 hat ein unklares Ergebnis generiert jedoch der STARlet ein negatives. Zwei Messungen sind falsch unklar. D.h. der c4800 hat ein negatives Ergebnis generiert, der STARlet jedoch ein unklares.

6. Diskussion

Der Extraktionsvergleich in Experiment 1 zwischen den beiden Geräten ist sehr gut. Mit einem Differenzwert von -0.21 im vanB-Kanal, liegt das Ergebnis fast bei 0, was darauf hinweist das sehr ähnlich gemessen wird. In Experiment 2 kann die Variante 2 mit der Variante 1 abgetauscht werden. Diese misst mit einer Verminderung des PCR-Volumens sehr ähnlich bei einem Ct-Differenzwert von -0.01. Da die Variante 2 besser abschneidet als die Variante 3, wird diese zukünftig eingesetzt. Beim Experiment 3 sind alle positiven Ergebnisse beider Geräte übereinstimmend und keine falsch negativen Ergebnisse wurden generiert. Vier nicht-übereinstimmende Ergebnisse hat es im E. faecium-Kanal gegeben, aufgrund von schwach positiven Proben. Bei schwach positiven Proben ist es üblich, dass sie negativ oder schwach positiv ausfallen können. Somit handelt es sich in diesem Falle um Proben mit einer Konzentration unterhalb des Detektionslimits. Somit ist dies begründbar und die Kriterien wurden erfüllt. Der STARlet hat alle drei Experimente erfolgreich bestanden.

Referenzen

- [1] Insel Gruppe. (2018). *Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) am Inselspital*. Insel Gruppe. <https://www.inselgruppe.ch/de/aktuell/details/news/vancomycin-resistente-enterokokken-vre-am-inselspital>
- [2] L. Furrer & R. Koller, persönliche Kommunikation, 19. Januar 2023, siehe Anhang 3
- [3] L. Furrer & R. Koller, persönliche Kommunikation, 24. März 2023, siehe Anhang 3
- [4] Suter, 2020, S.1
- [5] Antwerpes, F. (2020), Güney, O., & Plamer, L. (2019), No, D., Wulf, J., Ostendorf, N., & Nguyen, H. (2018), Schwert, S. (2016), Zimmermann, K. (2014), Jahn, F., & Paulussen, U. (2013), Graf von Westphalen, G., & No, D. (2012), No, D. (2007), Nicolay, N. (2004). *Polymerase-Kettenreaktion* [Blog]. DocCheck Flexikon. Abgerufen am 28. Februar 2023 von <https://flexikon.doccheck.com/de/Polymerase-Kettenreaktion>
- [6] Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft. (Jahr der Veröffentlichung nicht bekannt). *Schaderregernachweis mittels Real-time PCR*. Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (StMELF)

Abbildungen

Abb. 1 Lovric, C. (2023). *Bland-Altman-Diagramm des ersten Experimentes von vanB-Kanal mit Extraktionsvergleich mit gewonnenen Daten durch Triplikationsmessungen*. medi.

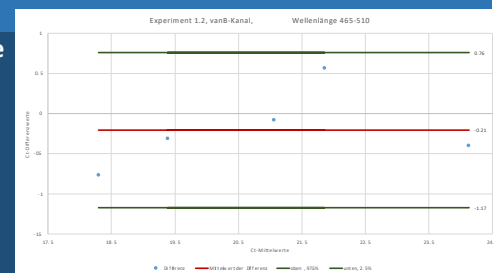


Abb. 1: Bland-Altman-Diagramm des ersten Experimentes von vanB-Kanal mit Extraktionsvergleich mit gewonnenen Daten durch Triplikationsmessungen (Lovric, 2023)