

Methodensammlung der Bund-/ Länder Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
Quantitativer Nachweis von Lentiviren (HIV1)-RNA mittels Real time RT-PCR	AM024
Erstellt vom <i>Unterausschuss Methodenentwicklung</i> der LAG, April 2009 Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

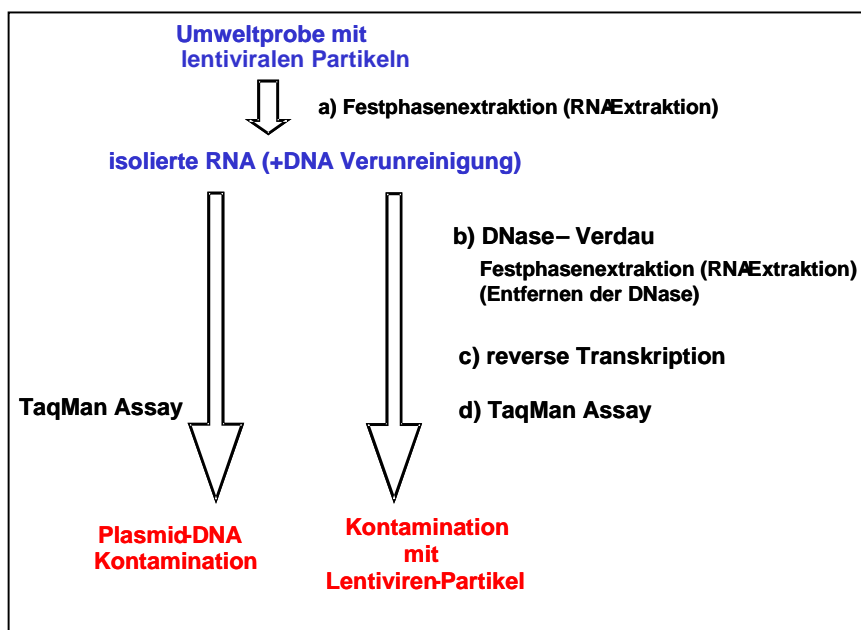
Diese Methode beschreibt ein Verfahren zum quantitativen Nachweis von Lentiviren (HIV1) – RNA mittels reverser Transkription und quantitativer Real time PCR (Polymerase Chain Reaction) aus RNA-Extrakten (z. B. Wischproben).

2. Kurzbeschreibung

RNA-Extrakte von erhobenen Proben (z.B. Wischproben) werden nach einem Verdauungsschritt mit DNase und einer anschliessenden Reinigung der RNA auf das Vorhandensein von Lentivirus-RNA mit HIV1-Hintergrund untersucht. Zu diesem Zweck wird ein kombiniertes Verfahren aus reverser Transkription (RT) und quantitativer „TaqMan“ PCR durchgeführt (siehe rechten Strang der schematischen Darstellung). Dieser Extrakt wird zur Kontrolle des DNA-Verdau auch *ohne* reverse Transkription einer quantitativen PCR unterzogen. Als weitere Kontrolle wird auch mit dem *nicht* DNase-behandelten Extrakt eine quantitative PCR ohne reverse Transkription durchgeführt, um in den Proben mögliche DNA-Kontaminationen der nachzuweisenden Sequenz zu identifizieren (siehe linken Strang der schematischen Darstellung).

Bei diesem Nachweisprozess wird die RNA im Bereich der HIV-Ψ-Sequenz („Packaging Signal Sequence“, Genbank Acc No. AF033819) mit einem spezifischen Primer in cDNA umgeschrieben. In einer PCR-Reaktion wird in diesem Sequenzbereich ein 137 bp grosses Fragment amplifiziert und mit einer TaqMan Sonde fluorimetrisch während jedem PCR-Zyklus (Real time) nachgewiesen. Dabei wird die Nuklease-Aktivität der *Taq* DNA Polymerase ausgenutzt, indem die Sonde während der Polymerisation gespalten und dadurch der fluoreszierende Farbstoff (FAM) vom Quencher (TAMRA) getrennt wird (Holland et al., 1991). Die Zunahme, der für den FAM-Farbstoff spezifischen Fluoreszenz-Signale ist direkt proportional zur Anzahl PCR-amplifizierter DNA-Fragmente der HIV1-Ψ-Sequenz.

Die Anzahl Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt, ergibt den c_T -Wert. Für die Quantifizierung der Menge an HIV1-Ψ-RNA-Sequenzen in der Probe wird der c_T -Wert der Probe mit dem c_T -Wert eines Standards in Beziehung gebracht.



Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Untersuchung von Proben auf Kontaminationen mit lentiviralen Partikeln.

3. Material

(Die Validierung dieser Methode wurde mit den Geräten, Chemikalien und Lösungsmittel der angegebenen Lieferanten bzw. Hersteller durchgeführt. Prinzipiell können auch andere Lieferanten bzw. Hersteller berücksichtigt werden. Bei den Materialien, welche mit einem * markiert sind, sollte in einem solchen Falle eine vorherige Vergleichsvalidierung durchgeführt werden.)

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Kunststoff- und Glasmaterialien müssen vor der Verwendung sterilisiert werden. Die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dient als Schutz vor Kontamination.

- Thermocycler mit Fluoreszenzdetektionseinheit (z.B. Applied Biosystems: Sequence Detection System 7500)*. Für die Einstellungen am Gerät folge man dem Handbuch des Geräteherstellers.
- Mikrozentrifuge
- diverse Kolbenhubpipetten
- Nitril- oder Latexhandschuhe (puderfrei)
- **QuantiTect Probe RT- PCR Kit (QIAGEN)** Artikel Nr. 204443*
- PCR-Verbrauchsmaterial
 - PCR-Platten (z.B. Microamp[®] Optical/96-well Reaction Plate, ABI Art.Nr. N8010560)
 - Klebefolien (z.B. Adhesive Cover mit Adhesive Seal Applicator und Compression Pad Kit, ABI Art.Nr. 4311971)
- aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
- Reaktionsgefäße (diverse)
- Eis

3.2. Reagenzien

Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Zellkultur und die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden.

- steriles deionisiertes Wasser
- **Primer :**

HIV1_PSS_F	5'-cgc agg act cgg ctt gct-3'
HIV1_PSS_R	5'-gac gct ctc gca ccc at-3'

- **Sonde:**

HIV1_PSS_FAM	5'-ccy etc gcc tet tgc ygt gyg crc-3'
---------------------	--

3.3 Lösungen

- **HIV1_PSS_F:** 10 µmol/l Primer-Lösung[§]
- **HIV1_PSS_R:** 10 µmol/l Primer-Lösung[§]
- **HIV1_PSS_FAM:** 10 µmol/l Sonden-Lösung[§]

[§] Primer und Sonden werden im Originalröhrchen durch Zugabe des entsprechenden Volumens an TE-Puffer (1mM Tris, pH 8; 0.01 mM EDTA) auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

- **Referenzlösung für Lentiviren:**

Als Referenzmaterial für die Abschätzung der Menge an Lentiviren-Partikeln dient eine mittels Bioassay titrierte Lentivirenprobe in Konzentrationen zwischen 10⁴ bis 10⁶ TU/µl (transformierende Einheiten). Eine Messreihe von mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen aus dieser Reihe dient zur Bestimmung einer Referenzgeraden. Diese Proben werden durch den ganzen Extraktions- und Analyseprozess mitbearbeitet.

3.4 Referenzmaterial

Dieses ist auf Anfrage vom Unterausschuss Methodenentwicklung erhältlich.

4. Durchführung

Die für ein analytisches PCR-Labor notwendigen Vorsichtsmaßnahmen (räumliche Trennung, DNA-Dekontamination, etc.) sind einzuhalten.

4.1. Herstellung des Mastermixes für den Nachweis von Lentiviren-RNA

Die folgenden Angaben gelten für **25 µl** Ansätze (**5 µl** extrahierte und DNase behandelte RNA + **20 µl** Mastermix). **Alle Reaktionen werden auf Eis pipettiert.**

Folgende Lösungen werden in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert:

- **Mastermix:**

Reagenzien	Endkonzentration	µl für einen Ansatz A mit RT	µl für einen Ansatz B ohne RT*
Primer HIV1_PSS_F [10 µmol/l]	400 nmol/l	1.0	1.0
Primer HIV1_PSS_R [10 µmol/l]	400 nmol/l	1.0	1.0
Sonde HIV1_PSS_FAM [10 µmol/l]	150 nmol/l	0.38	0.38
RNase freies Wasser	-	4.88	5.13
QuantiTect RT Mix	-	0.25	0
QuantiTect Probe RT-PCR Mix (2x)	1x	12.5	12.5

*Zusätzliche Kontrollen, siehe Kapitel 2 und 6

Die Gesamtmenge der einzelnen zu pipettierenden Lösungen ergibt sich aus der Anzahl durchgeführter PCR-Reaktionen und einem Überschuss von mindestens 5%.

4.2. Ansetzen und Durchführung der PCR-Reaktionen

Von jeder Probe werden folgende PCR-Analysen im Doppel durchgeführt. (Siehe auch Kapitel 6.)

1. TaqMan PCR **ohne** RT (Ansatz B) der Probe **vor** dem DNase Verdau.
2. TaqMan **RT-PCR** (Ansatz A) der Probe **nach** dem DNase Verdau.
3. TaqMan PCR **ohne** RT (Ansatz B) **nach** dem DNase Verdau.

- Den Mastermix kurz mischen.
- Je 20 µl Mastermix in sterile PCR-Platte (Microamp[®] Optical/96-well Reaction Plate) vorgeben.
- Jeweils 5 µl der zu untersuchenden RNA-Lösungen hinzupipettieren.
- Mit Klebefolie oder Deckel verschließen.
- PCR-Platte gemäß folgendem Temperatur-Zeit-Programm inkubieren:

Schritt	
Reverse Transkription	30 min./ 50 °C
Aktivierung der Taq Polymerase	15 min./ 95°C
Amplifikation (45 Zyklen)	15 sec./ 94°C 60 sec./ 60°C

- Eingabe des Reaktionsvolumens „25 µl“ und Eingabe der Anzahl Zyklen „45“.
- Standort und probenspezifische Angaben der Referenz-, Kontroll-, und Untersuchungsproben in den Eingabevorlagen für den Fluoreszenzmarker FAM eingeben.
- Messung starten.

5. Auswertung

5.1. Quantitative PCR

Die Auswertung der PCR-Reaktion erfolgt gemäß Manual des Herstellers des PCR-Gerätes.

Hinweise:

- Nulllinie in der linearen Darstellung festlegen (in der Regel zwischen dem 5. und 15. Zyklus)
- Wahl eines geeigneten „Thresholds“ in der logarithmischen Darstellung (in der Regel <0,2)
- Die Menge vorhandener Lentiviren-RNA-Partikel wird anhand der c_T -Werte der Referenz-RNA-Proben definiert.
- Falls die Amplifikationskurven unklar sind, müssen die jeweiligen „Multicomponent“ Darstellungen sowie die Rohdaten geöffnet und interpretiert werden.

5.2. Berechnung der Anzahl DNA- bzw. RNA-Genomkopien

Die Berechnung der Anzahl DNA- bzw. RNA-Genomkopien pro Milliliter Wischprobe basiert auf den in der SOP- Extraktion von Virus-RNA und in der vorliegenden SOP vorgegebenen Arbeitsschritten und verwendeten Volumina.

DNA-Genomkopien (vor DNase, ohne RT):

Kopienzahl pro ml Wischprobe = (Mittelwert x 12 : 140) x 1000

RNA-Genomkopien (nach DNase, mit RT)

Kopienzahl pro ml Wischprobe = (Mittelwert x 12 x 3 : 140) x 1000

6. Hinweise zur Qualitätssicherung

Die Qualität der verwendeten Referenzmaterialien und Reagenzien wird bei jeder Untersuchung „ad hoc“ überprüft. Dies erlaubt das Verwenden von Reagenzien über ihr angegebenes Verfalldatum hinaus. Ein möglicher Einfluss auf das Resultat wird damit erkannt.

Zur **Kontrolle des DNase-Verdau**s wird von jedem RNA-Extrakt vor und nach der DNase-Behandlung eine PCR-Reaktion ohne Zugabe des „QuantiTect RT Mix“ (keine reverse Transkription siehe Punkt 4.1. und 4.2.) durchgeführt. Diese zwei Kontrollreaktionen geben einerseits Auskunft über das Funktionieren des DNase-Verdau. Andererseits kann durch die Analyse vorhandener DNA vor dem DNase-Verdau eine allfällige Kontamination der Proben mit DNA gleicher Sequenz festgestellt werden.

In jeder Analysenreihe müssen folgende Kontrollen mitgeführt werden:

- ein **Reagenzien-Blindwert**: Mastermix, der mit Wasser anstatt RNA-Extraktionslösung versetzt wird. Der Reagenzien-Blindwert muss negativ sein, ansonsten ist der Mastermix kontaminiert.
- eine **Negativkontrolle** (eine negative Extraktionskontrolle): eine Probe, die durch den ganzen Extraktionsschritt mitgeführt wurde, die aber mit Sicherheit keine Lentiviren-RNA enthält, z.B. Puffer). Die Negativkontrolle muss negativ sein, ansonsten ist eine Kontamination bei der RNA-Extraktion zu vermuten.
- **Verdünnungsreihe der Referenzlösungen**: die mitbearbeitete Verdünnungsreihe der Referenzlösung für Lentiviren mit mindestens 3 Konzentrationen an Lentiviren transformierenden Einheiten. Sämtliche Extrakte müssen eine sichtbare Amplifikation in der RT-PCR ergeben. Die Steigung der Geraden bei der Auswertung dieser Messreihe muss zwingend zwischen -3.3 und -3.7 liegen.

Wenn die Kontrollen nicht das erwartete Resultat ergeben, müssen die Resultate dieser Versuchsreihe verworfen und die Untersuchung nach einer geeigneten Fehleranalyse und der Beseitigung von Fehlerquellen einer geeigneten Fehleranalyse und der Beseitigung von Fehlerquellen wiederholt werden.

7. Ringversuch

Diese Methode wurde im Jahr 2007 zusammen mit der Methode 'Extraktion von Virus-RNA' durch den Unterausschuss "Methodenentwicklung" der LAG in einem Ringversuch validiert, an dem insgesamt 9 Überwachungslabore teilnahmen. Jeder Teilnehmer erhielt zur Durchführung der PCR Untersuchungen ein QuantiTect Probe RT-PCR Kit (für 200 Reaktionen; Version 01/2008). Nach den RNA- und DNA-

Extraktionen aus 15 codierten Proben (2x 5 Doppelblindproben bestehend aus inaktivierten Viruspartikeln mit 10, 60, 100, 300 und 1.000 Transforming Units/ μ l sowie 5 Negativproben (siehe Tabelle 1) sollte in einer quantitativen PCR und Kalibrierung mit Hilfe eines zur Verfügung gestellten Referenzplasmids (anhand von 4 Verdünnungen) die Anzahl RNA sowie DNA Genomkopien pro Milliliter Wischprobe bestimmt werden.

Tabelle 1: Ringversuchsproben einschließlich der Negativproben (Konz. = 0) und errechnete Genkopienzahlen

Probe	Transforming Units, TU*		Genkopien pro ml [#]	
	pro μ l	pro ml	RNA	DNA
A	1000	1.00E+06	2.98E+06	9.06E+05
B	100	1.00E+05	3.10E+05	1.24E+05
C	0	0	-	-
D	10	1.00E+04	2.90E+04	1.30E+04
E	100	1.00E+05	3.06E+05	1.36E+05
F	0	0	-	-
G	10	1.00E+04	2.67E+04	1.33E+04
H	60	6.00E+04	1.63E+05	7.80E+04
I	0	0	-	-
J	1000	1.00E+06	2.81E+06	1.06E+06
K	60	6.00E+04	1.67E+05	6.59E+04
L	0	0	7.61E+02	2.06E+02
M	300	3.00E+05	1.19E+06	3.96E+05
N	300	3.00E+05	7.88E+05	3.11E+05
O	0	0	-	-

* TU: Anzahl infektiöser Viruspartikel gemäß Titrierung des Herstellerlabors (M. Osinde und K.K. Dev, Novartis)
Gemäß Messung des Durchführungslabors (KL BS)

Alle teilnehmenden Labore gaben Ergebnisse der quantitativen PCR-Untersuchungen ab. Es wurde eine statistische Auswertung der abgegebenen Ergebnisse der PCR-Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Auswertung nach Eliminierung von Ausreißern (Cochran- und Grubbs-Test) sind in der Tabelle 2 dargestellt.

Die qualitative Auswertung der Ringversuchsergebnisse zeigte, dass abgesehen von einem Labor, keinerlei falsch-positive Befunde auftraten. In diesem Labor traten in allen Negativproben falsch-positive Befunde für DNA auf. Diese Daten wurden nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Ohne Berücksichtigung der Angaben dieses Labore ergeben sich sowohl für die Untersuchung der RNA als auch der DNA dieselben Raten, d.h. die falsch-positiv Rate liegt bei 0% und die falsch-negativ Rate bei 1%. Eine verallgemeinernde Aussage kann allerdings hierauf basierend nicht getroffen werden, da die Zahl der teilnehmenden Labore zu gering war. Gleichwohl ist davon auszugehen, dass die Spezifität als auch die Sensitivität im Bereich der untersuchten Konzentrationen als hoch einzustufen ist.

Tabelle 2 Mittelwerte sowie relative Wiederhol-, Zwischen- und Vergleichstandardabweichungen (STD)

	Proben	Anzahl Einzelwerte	Genkopien pro ml (Mittelwert)	Rel. Wiederhol-STD*	Rel. Zwischen-STD*	Rel. Vergleich-STD*
RNA	A + J	28	3,45E+06	15,20%	22,36%	41,23%
	B + E	28	3,00E+05	17,73%	37,09%	43,72%
	D + G	23	3,10E+04	12,18%	13,26%	33,55%
	H + K	28	1,73E+05	18,13%	33,47%	39,21%
	M + N	28	8,77E+05	16,11%	22,56%	40,06%
DNA	A + J	28	1,20E+06	9,49%	22,88%	43,97%
	B + E	28	1,23E+05	13,40%	13,40%	34,15%
	D + G	28	1,30E+04	15,88%	23,34%	43,98%
	H + K	28	7,44E+04	10,56%	13,25%	32,90%
	M + N	26	3,67E+05	9,30%	12,85%	35,50%

***Zwischenstandardabweichung:** beschreibt die Variabilität der Messwerte zwischen zusammengehörenden Doppelblindproben.

Vergleichstandardabweichung: charakterisiert die Variabilität von Messwerten zwischen verschiedenen Laboratorien für ein Paar von Doppelblindproben,

Wiederholstandardabweichung: beschreibt die Variabilität innerhalb eines Labors unter konstanten Bedingungen, also für jeweils eine der beiden Doppelblindproben,

Die detaillierte Bewertung der Ringversuchsergebnisse ist dem Statistikbericht „RV Lentiviren“, der auf Anfrage beim Bundesamt für Verbraucherschutz (BVL) erhältlich ist, zu entnehmen.

Zusammenfassend können folgende Aussagen über die Leistungsfähigkeit und Eignung der Methode gemacht werden:

- Die Methode eignet sich zur Quantifizierung der Größenordnung von DNA- bzw. RNA-Genkopienzahlen in Untersuchungsproben; aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen, insbesondere der Vergleich-STD ist jedoch die Bestimmung eines exakten Wertes nicht möglich.
- Das Messverfahren ist über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (ca. 10^4 bis 10^6 Genkopien/Wischprobe, 1ml) in der ermittelten Varianzfunktion sowohl für die RNA- als auch für die DNA-Untersuchung konstant.
- Die Bestimmungsgrenze dieses Verfahrens liegt für RNA bei 2600 Kopien/Wischprobe, für DNA bei 900 Kopien/Wischprobe (gemäß Validierung des Durchführungslabor). Bezogen auf den PCR- bzw. RT-PCR Ansatz zeigte der Ringversuch eine Nachweis- und Bestimmungsgrenze von mindestens 100 Genkopien.

8. Anmerkung

Diese Methode beruht auf einer Standard-Arbeitsanweisung (SOP347) des Kantonalen Laboratoriums Basel-Stadt, deren Entwicklung finanziell durch das Schweizer Bundesamt für Umwelt (BAFU) unterstützt wurde. Die Ringversuchsmaterialien wurden vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) zur Verfügung gestellt, die statistische Auswertung wurde im Auftrag des BVL durchgeführt.

9. Literatur

Handbuch des QuantiTect Probe RT- PCR Kits der Firma QIAGEN

Holland P.M., Abramson R.D., Watson R. and Gelfand D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 357-362.

Zufferey R., et al. (1998) Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery. Journal of Virology, Dec 1998, Vol. 72, No.12, p.9873-9880

quo data - Gesellschaft für Qualitätsmanagement und Statistik mbH, Dresden. (März 2009) **Ergebnisbericht zur statistischen Auswertung des Ringversuches**