

NY DNA-ANALYSEMETODE GIVER MULIGHED FOR BEDRE KVALITETSSIKRING

**TEKST:****CAMILLA PEDERSEN**Bioanalytiker
Molekylærpatologi-
laboratoriet
Patologiafdelingen
Hvidovre Hospital**KATJA JAKOBSEN**Adjunkt, Phd
Bioanalytikeruddannelsen
Institut for Teknologi
Det Sundhedsfaglige og
Teknologiske Fakultet
Professionshøjskolen
Metropol**JESPER BONDE**Seniorforsker
Metropol Professions-
højskolen, København

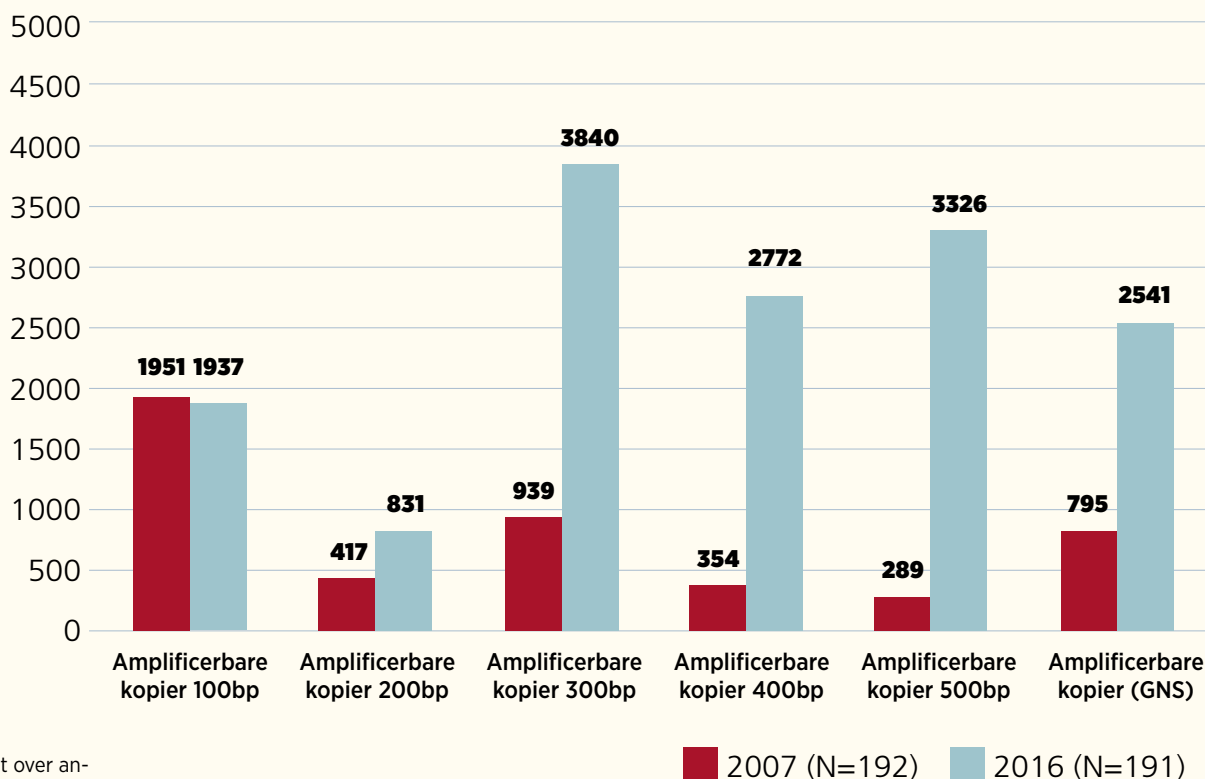
Arbejdet på et bachelorprojekt, som blandt andet havde til hensigt at danne de første rammer til et større forskningsprojekt med formålet at klarlægge human papillomavirus-vaccinens (HPV) "real life"-effekt, blev det klart, at vi stod med nogle udfordringer i form af materialets egnethed til HPV-analyse. Disse udfordringer valgte vi at undersøge nærmere med en ny kvantitativ og kvalitativ DNA-analysemetode, som på sigt kan blive en ny præanalytisk kvalitetssikringsanalyse i vores rutinelaboratorium.

Molekylære analyser til diagnosticering af HPV

Artiklen her er udarbejdet i forlængelse af et bachelorprojekt udført på Hvidovre Hospitals Patologiafdeling under Metropol, København. Molekylære analyser for HPV har i mange år været benyttet diagnostisk som en integreret del af livmoderhalskræftscreeningen på væskebaserede cytologiprøver, men vinder nu også frem i forhold til en lang række andre prøvematerialer, fx histologi præparater. Oftest er der behov for at undersøge biopsimaterialer med forandringer for tilstedeværelse af HPV i forbindelse med at afklare, hvorvidt der er mulighed for onkogen transformation, med andre ord: om der er virus i forandringerne, som kan give kræft. Det er mest gynækologiske histologi prøver, hvor undersøgelse for HPV-virus er relevant, men i de senere år har det også vist sig, at HPV spiller en rolle i en række andre ikkegynækologiske kræftformer som hovedhalskræft og svælgkræft. Projektet var et

forberedende arbejde til et større forskningsprojekt med det formål at klarlægge HPV-vaccinens "real life"-effekt ved at undersøge for HPV-genotyper i histologimaterialer, men de kvalitetssikringsmæssige aspekter er tilsvarende på andre histologimaterialetyper. I artiklen vil vi se på problemstillingen omkring formalinfikseret vævs egnethed som analytisk udgangspunkt for molekylær HPV-analyse med genotypebestemmelse.

Det er alment kendt inden for patologiens verden, at formalinfikseret histologivæv er problematisk at arbejde med i forhold til molekylære analyser. Set i lyset af hvor mange patologidiagnoser der i dag indeholder molekylære analyser, fx mutationsanalyser i kræftpakkeforløb, virus og bakteriel infektionsanalyse og genskader og mutationer ved arvelige kræftformer, er det overraskende lidt videnskabeligt arbejde, der har beskæftiget sig med systematisk vurdering af kvaliteten af DNA ekstraheret fra formalinfikseret paraffinindstøbt (FFPE) materiale. Udfordringen er kemisk! Formaldehyd fragmenterer DNA uspecifikt i fragmenter á ca. 200 basepar (bp), og samtidig introducerer formaldehyd kovalente bindinger mellem DNA, RNA, proteiner og cellematrixmateriale, hvilket umuliggør fx PCR (1). Hvor de kovalente bindinger kan reverseres ved et simpelt præanalytisk trin med tilførsel af varme til prøven, kan DNA-brud ikke reverseres. Effekten af formaldehydet er tidsbetinget. Jo længere arkiveringstid, jo flere DNA-skader, og jo flere kovalente bindinger. Og deri ligger udfordringen. Fragmenteret DNA giver specielt udfor-



FIGUR 1 Oversigt over antal amplificerbare kopier ved 100, 200, 300, 400 og 500 bp samt det samlede antal amplificerbare kopier i 2007- og 2016-grupperne af præparater.

dringer, hvis fragmenterne er kortere end det PCR-amplikon, den valgte molekylære analyse kræver (2), og ofte vil det resultere i enten et invalidd resultat eller et falsk negativt resultat.

Forskningsprojekter, som klarlægger HPV-vaccinens "real life"-effekt målt i reduktionen af livmoderhals HPV16- og HPV18-relateret sygdom, er mere relevante end nogensinde, idet de første fødselsårsgange, der systematisk er tilbudt HPV-vaccine i børnevaccinationsprogrammet, nu er fyldt 23 år og derfor tilbydes livmoderhalskræftscreening. Hvor der allerede i Danmark er igangsat projekter omkring effektiv screening af HPV-vaccinerede kvinder, er der endnu ingen projekter, der har vurderet effekten af vaccine i forhold til de histologiske diagnoser på kvinder, der ikke har deltaget i vaccinstudierne.

Men hvordan gøres det bedst? De to målepunkter, vi gerne på sigt vil vurdere, er HPV-prævalens og HPV-genotypefrekvens i histologimaterialer fra vaccinerede og uvaccinerede kvinder. Hertil er det intentionen at benytte det PCR-microarraybaserede Genomica CLART HPV2-assay, der bestemmer 35 HPV-genotyper inkl. HPV16, HPV18, HPV6 og HPV11 (Genomica, Madrid, Spanien). Foruden Genomica vil vi benytte det Maldi-Toff-baserede AGENA HPV-assay (Agena Bioscience, Hamburg, Tyskland). Hvor Genomica anvender et HPV PCR amplikon på 465 bp, anvender Agena et HPV PCR-amplikon på 200-220 bp. En "dobbeltanalyse"-strategi vil derfor forventeligt nedbringe antallet af invalide prøveresultater, specielt i de ældste materialer, jævnfør problem-

stillingen om DNA-degeneration og amplikonlængder.

Projektets første fase – bachelorprojektet – var at definere en metode til at kvalitetsvurdere den analytiske validitet af materialet i en uvaccineret referencegruppe fra 2007 sammenlignet med en ny gruppe af materialer fra 2016 fra vaccinerede kvinder. Fokus var på DNA-fragmentering som følge af vævspræparering og lang arkiveringstid, idet de ældste materialer er næsten 10 år gamle. Med vores viden om, hvad lang fikseringstid med formaldehyd gør ved vævets arvemateriale, satte vi os for at kvalificere materialet fra begge grupper med en helt ny kvantitativ og kvalitativ DNA-analysemetode baseret på samme Maldi-Toff-teknologi som Agena HPV-analysen. Kvalitetssikringsanalysen (Agena Exome QC) afrapporterer et (relativt) tal for den gennemsnitlige mængde amplificerbart DNA i en prøve. Men ikke nok med det, analysen viser også fordelingen mellem amplificerbare fragmenter i størrelserne 100, 200, 300, 400 og 500 bp. Ved at anvende Exome QC kan vi derved beskrive eventuelle forskelle i kvalitet og kvantitet af det amplificerbare DNA mellem de to grupper, som har været fikseret i henholdsvis 10 og 1 år. Det er væsentligt at kende materialets begrænsninger i forhold til fx at kunne vælge den rigtige metode til HPV-analyse.

Invalide analyseresultater, materialets alder og mængden af amplificerbart materiale

Som udgangspunkt testede vi de to grupper af

materialer med henblik på at vurdere, hvor mange materialer der ville være invalide. Ikke overraskende var der flere 2007-materialer (N=192), der gav invalide resultater, når vi anvendte Genomica sammenlignet med Agena. Tilsvarende gjorde sig gældende for 2016-materialerne (N=191). Samlet set var invalid-raten på 33 % ved brug af Genomica uanset materialets alder, mens Agena lå på 1,2 % for 2007-gruppen og 6,1 % for 2016-gruppen. Det sidste kan virke "omvendt" af det forventede, men kan skyldes simpel stokasticitet.

Alle materialerne blev parallelt analyseret med Exome QC med henblik på at måle det gennemsnitlige antal DNA-enheder samt den relative fordeling på fragmenter af 100-500 bp størrelse.

Figur 1 viser, hvordan lang arkiverings- samt fikseringstid har betydning for både kvaliteten og kvantiteten af amplificerbart DNA. Det gennemsnitlige antal amplificerbare kopier ligger på 795 (relative enheder) i 2007-kohorten og på 2.541 i 2016-kohorten. Antallet af amplificerbare kopier i størrelsen 100 bp er tilnærmelsesvis det samme i de to kohorter, men så sker der noget: Fra størrelsen 200 bp og op er andelen af amplificerbare kopier mange gange større i 2016-kohorten end i 2007-kohorten, altså mere materiale tilgængeligt for analyse, og effekten af lang arkiverings- og fikseringstid ses tydeligt. Denne er mest markant målt på antallet af de største amplificerbare DNA-kopier, dvs. fragmentlængder på 400 og 500 bp, der i 2016-materialet er henholdsvis 8 og 11 gange større end i 2007-materialet. Analyser, der benytter lange PCR-amplikoner, kan derfor være udfordrede på ældre histologimaterialer.

For de fleste typer molekylære analyser kan man med denne viden vælge at kompensere på to måder i forhold til FFPE-materialets brugbarhed: 1) Man kan øge mængden af inputmateriale i DNA-ekstraktionen, hvorved DNA-udbyttet bli-

ver større, alternativt 2) kan man tilsætte en større mængde DNA-template til PCR-reaktionen, hvis denne tillader dette, fx dobbelt volume, for at bringe mængden af validt template i PCR-reaktionsmikset op. Specifikt for vores to HPV-analyser ses det, at Agena, der benytter kortere HPV-amplikoner, er mindre følsom over for omfanget af DNA-degeneration som set i antallet af invalide prøveresultater i de to grupper af materialer.

Konklusion

Med dette nye kvalitetssikringsassay kommer der en lang række nye muligheder for kvalitetssikring af molekylære analyser i både forskning og rutinelaboratoriearbejdet. Mange af de molekylære analyser, som udføres rutinemæssigt, er baseret på PCR og betinget af amplifikation af DNA. For FFPE-materiale kan man med fordel overveje, om man helt generelt bør benytte en præanalytisk kvalitetssikringsanalyse som Exome QC med henblik på at have det bedst mulige grundlag for diagnostisk kvalitet. Hvor mange FFPE-væv analyseres molekylært i dag landet over, hvor et invalide resultat afslutter den diagnostiske proces med et "Materialet uegnet til diagnostik" eventuelt fulgt op af "Ny prøve udbedes"? Fra et patientsikkerhedsmæssigt perspektiv vil det også give en diagnostisk sikkerhed at kunne kvalificere, hvorfor en vævsprøve ikke giver et validt resultat. ■

Referencer

- 1 Efficient DNA extraction for HPV genotyping in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.
- 2 Steinau, Martin, Sonya S. Patel, and Elizabeth R. Unger. "Efficient DNA extraction for HPV genotyping in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues." *The Journal of molecular diagnostics* 13.4 (2011): 377-381.