

Methodischer Vergleich der qPCR mit Hochdurchsatzsequenzierung (NGS) für die 6 Markerkeime des iai PadoTest

Inhalt

Stand der Technik.....	3
Quantitative Echtzeit-PCR.....	3
Abbildung 1: Beispiel für die Bestimmung einer Ct-Wert.....	3
NGS.....	3
Vergleichsaufbau.....	4
Proben.....	4
Methode 1 - iai PadoTest (Echtzeit qPCR).....	5
Methode 2 - Shotgun Sequenzierung (NGS).....	5
Auswertung.....	6
Korrelation der Ergebnisdaten beider Methoden.....	6
Abbildung 2: Korrelation zwischen qPCR- und NGS für die 6 iai Markerkeime (separat).....	6
Abbildung 3: Korrelation zwischen qPCR und NGS für die 6 iai Markerkeime.....	7
Zusammenfassung.....	7
Referenzen.....	8

Stand der Technik

Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) ist eine schnelle, zuverlässige und kostengünstige Methode, welche am häufigsten in wissenschaftlichen Analysen zum Nachweis von verursachenden Keimen verwendet wird. Das Prinzip der Realtime PCR ermöglicht eine Amplifikation sowie gleichzeitige Quantifizierung durch Fluoreszenz der gesuchten bakteriellen Zielsequenz. Die Maßeinheit für qPCR's sind Ct-Werte, welche Punkte ermittelt, an denen die Fluoreszenz zum ersten Mal oberhalb der Grundlinie oder des Hintergrunds als statistisch signifikant erkannt wird (Abbildung 1).

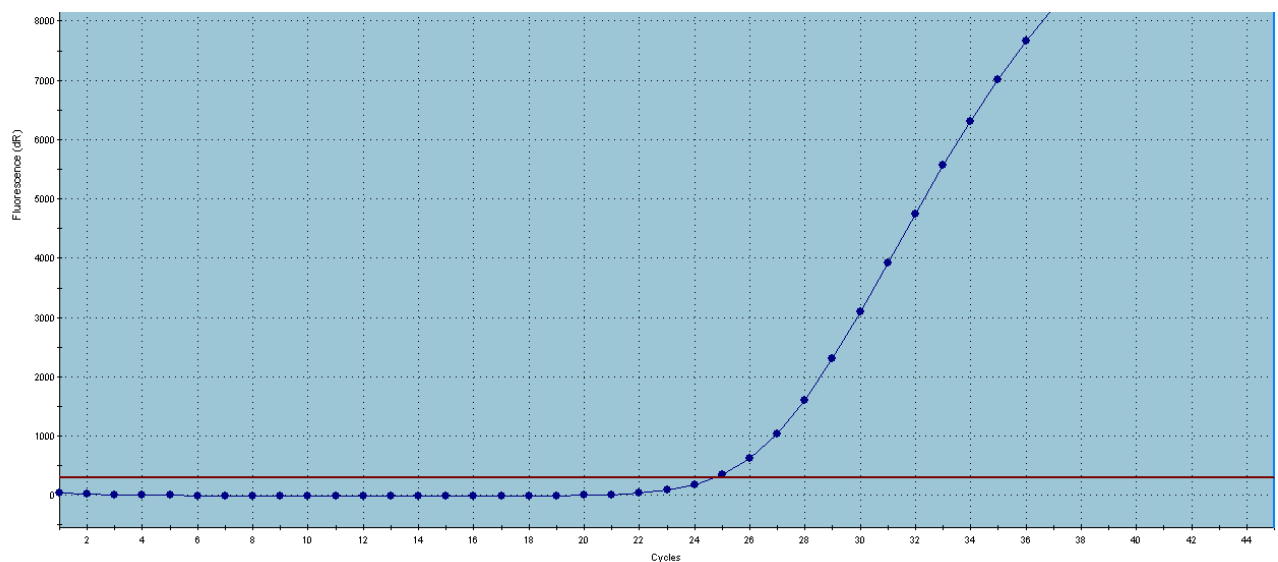


Abbildung 1: Beispiel für die Bestimmung einer Ct-Wert (hier ca. Ct von 25).

NGS

Die Hochdurchsatzsequenzierung (Next-Generation Sequencing – kurz NGS) hat die genetische Diagnostik in den letzten Jahren revolutioniert. Der Vorteil des NGS liegt in der massiven parallelen Sequenzierung von Millionen von unterschiedlichen DNA-Fragmenten (Reads) in einem einzigen Sequenzierlauf. Die Sequenzierung erfolgt je nach Hersteller durch grundlegend unterschiedliche Prinzipien. Die in unserer Studie verwendete Technologie von Illumina detektiert die einzelnen fluoreszenzmarkierten Basen während der Synthese der Sequenz mit Hilfe des komplementären Stranges als Matrize (SBS „sequencing by synthesis“). Der Nachteil des NGS liegt bei relativ hohen Kosten und einer zeitintensiven Bearbeitung von mehreren Tagen (oft 2-3 Tage).

Vergleichsaufbau

Für den Vergleich der beiden vorgestellten Analyseverfahren wurden kontrolliert entnommene Proben verwendet und jeweils mit dem entsprechenden Verfahren ausgewertet.

Proben

Bei den verwendeten Proben handelt es sich um Sulkusflüssigkeit aus der Zahnfleischtasche, gewonnen durch Einführen von sterilen Papierspitzen in eben diese. Die Probenentnahmen fanden zwischen Juni 2018 und April 2019 statt. Insgesamt wurden 124 Proben aus Zahnfleischtaschen von 39 Patienten mit Parodontitis-Diagnose entnommen. Jede Probe bestand aus zwei Papierspitzen (ROEKO Greater Taper Größe 35), die 30 Sekunden lang in die Dentaltasche eingetaucht und in einem Eppendorf-Röhrchen gesammelt wurden. Pro Patient wurden maximal vier Proben in jedem Quadranten entnommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 ° C gelagert.

Alle Proben wurden mit PBS 1X für mindestens 2 Tage bei 4 ° C eluiert, danach für 20 Minuten bei 16.000 rcf zentrifugiert und 800 ml Überstand verworfen. Die anschließende DNA Extraktion wurde mit dem QIAmp PowerFecal Pro DNA Kit (QIAGEN) vorgenommen und die extrahierte DNA als Basis für die jeweilige Methode zur Verfügung gestellt.

Methode 1 - iai PadoTest (Echtzeit qPCR)

Analyse der Proben mit dem iai PadoTest, einer Multiplex PCR, welche auf der Technologie der quantitativen Echtzeit PCR (qPCR) basiert. Mit aus den Proben extrahierter DNA, gewonnen aus der Zahnfleischtasche (Sulkusflüssigkeit), werden die folgenden 6 Parodontitis- Markerkeime, ausgewählt nach neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen (siehe Referenzen am Ende des Dokuments), quantitativ nachgewiesen:

- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- *Filifactor alocis*
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Prevotella intermedia*
- *Tannerella forsythia*
- *Treponema denticola*

Mehr Informationen über diesen kommerziell verfügbaren Test befindet sich auf der Website <https://www.padotest.ch>.

Methode 2 - Shotgun Sequenzierung (NGS)

Analyse der Proben mit einer Shotgun-Sequenzierung - ein besonderer Ansatz von Hochdurchsatzsequenzierung (NGS). Shotgun-Sequenzierung ermöglicht die umfassende Sequenzierung aller Gene in allen Organismen (hier menschliche und mikrobielle DNA) für eine hohe Anzahl von Proben pro Durchgang. Die erhaltene DNA wurde mit dem TruQuant DNA Library Preparation Kit 48 Rx (GenXPro) vorbereitet und für jeden Pool mit jeweils 46, 43 und 34 Proben normalisiert. Schließlich sind die drei Pools über das High Output Kit Reagent Cartridges v2 300 Zyklen (Illumina) geladen und mit dem NextSeq 500 (Illumina) sequenziert worden. Die genomischen Informationen standen nun als Anzahl von NGS-Reads pro Bakterium zur Verfügung und wurden für die sechs Markerkeime des iai PadoTest gefiltert.

Auswertung

Korrelation der Ergebnisdaten beider Methoden

Die Gegenüberstellung der beiden Methoden basiert auf der Spearman Korrelation der Quantifizierungsparameter der Markerkeime: Ct-Werte der qPCR und Anzahl an Reads („Coverage“) der Hochdurchsatzsequenzierung. Es konnten 450 Datenpunkte verglichen werden, welche Werte für beide Parameter aufwiesen. Beide Parameter wurden logarithmisch transformiert, um den Skew der Anzahl an NGS Reads (Daten nicht gezeigt) darzustellen. Zur Erinnerung, der Korrelationskoeffizient kann zwischen -1 (perfekt negative Korrelation) und 1 (perfekt positive Korrelation) variieren. Alle Korrelationskoeffizienten (r) zwischen 0,39 und 0,91 weisen auf Parameter hin, die positiv korrelieren (Abbildung 2). Das Ergebnis zeigt eine hohe und eindeutig positive Korrelation von 0,58 zwischen diesen beiden Methoden für alle Markerkeime der 124 Proben von 39 Patienten (Abbildung 3). Das bedeutet, qPCR und NGS liefern unabhängig voneinander vergleichbare Ergebnisse.

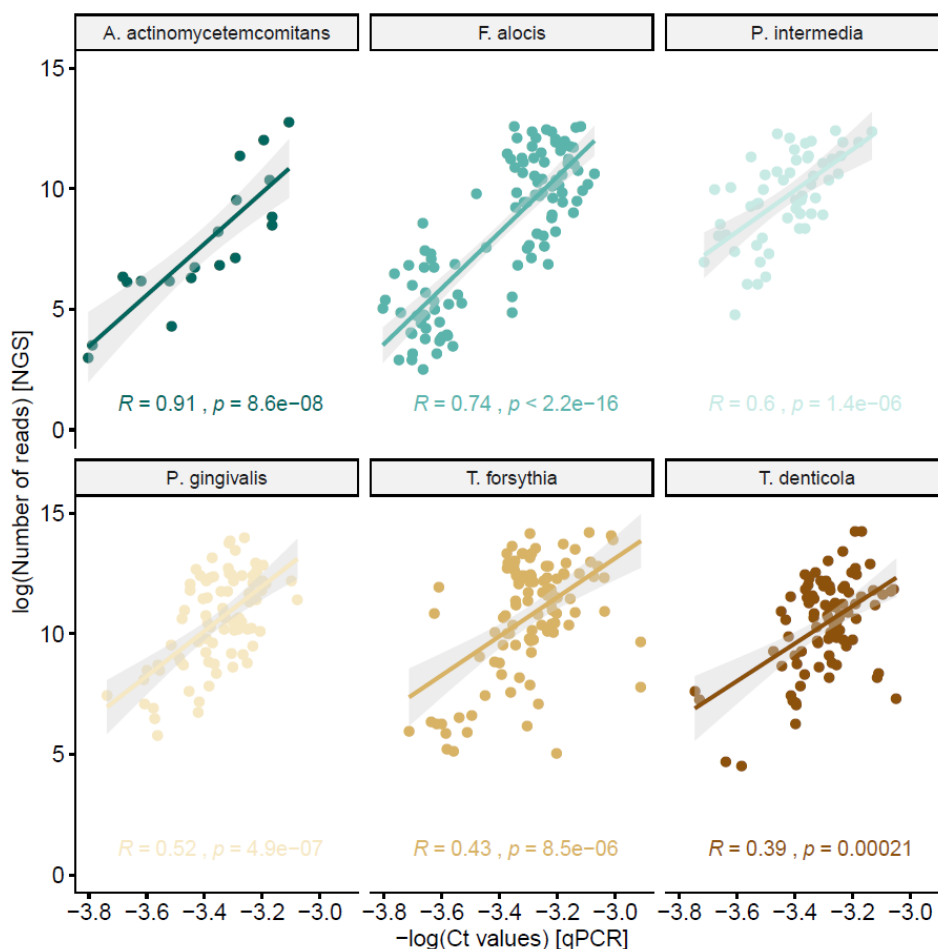


Abbildung 2: Korrelation zwischen qPCR- und NGS für die 6 *iai* Padotest Markerkeime (separat)

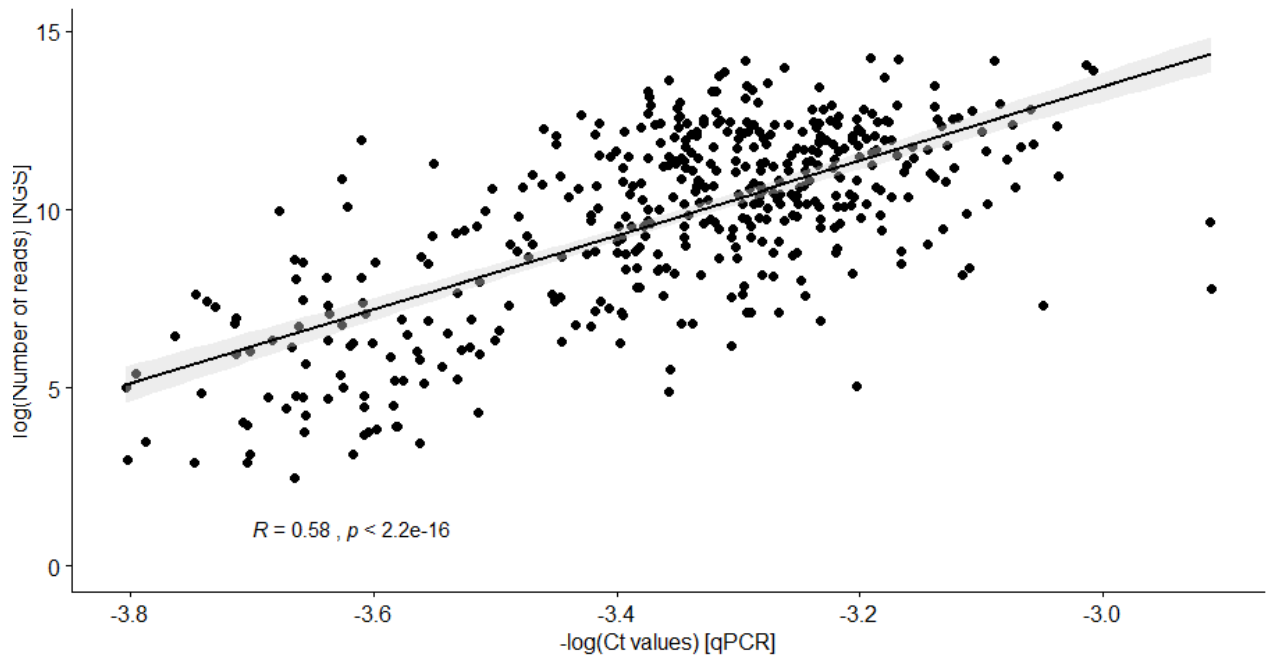


Abbildung 3: Korrelation zwischen qPCR und NGS für die 6 **iai PadoTest** Markerkeime

Zusammenfassung

Die positiven Korrelationskoeffizienten für die 6 **iai PadoTest** Markerkeime dokumentieren, dass die qPCR und die Hochdurchsatzsequenzierung (NGS) für die selben Proben vergleichbare Ergebnisse liefern.

Der **iai PadoTest** basiert auf der quantitativen Realtime PCR, ist jedoch aufgrund vergleichbarer Ergebnisse aber geringerer Kosten und geringerem Zeitaufwand die momentan bevorzugte Untersuchungsmethode.

Ein Nachweis der 6 Parodontitis-Markerkeime mit dem **iai PadoTest** ist essentiell für eine patientenorientierte Therapie und ein wesentlicher Begleiter für Zahnärzte/ärztinnen und Dentalhygieniker/innen zur Abklärung Parodontitis- oder Periimplantitis- abhängiger Behandlungsschwerpunkte.

Weitere Informationen zur Anwendung des **iai PadoTest** befindet sich auf der Homepage <https://www.padotest.ch>.

Referenzen

- »»» Aberg, C.H., Kelk, P. and Johannsson, A., 2015. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis. *Virulence*, 6 (3), 188-195.
- »»» Aruni, W., Chioma, O. and Fletcher, H.M., 2014. *Filifactor alocis*: The Newly Discovered Kid on the Block with Special Talents. *Journal of Dental Research*, 93 (8), 725-732.
- »»» Aruni, W., Mishra, A., Dou, Y., Chioma, O., Hamilton, B.N. and Fletcher, H.M., 2015. *Filifactor alocis*- a new emerging periodontal pathogen. *Microbes and Infection*, 17 (7), 517-530.
- »»» Dashper, S.G., Seers, C.A., Tan, K.H. and Reynolds, E.C., 2011. Virulence Factors of the Oral Spirochete *Treponema denticola*. *Journal Dent. Research*, 90 (6), 691-703.
- »»» How, K.Y., Song, K.P. and Chan, K.G., 2016. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology*, 7 (53).
- »»» Ksiazek, M., Mizgalska, D., Eick, S., Thorgersen, I.B., Enghild, J.J. and Potempa, J. 2015. KLIKK proteases of *Tannerella forsythia*: putative virulence factors with a unique domain structure. *Frontiers in Microbiology*, 6, 312.
- »»» Malik, R., Changela, R., Krishan, P., Gugnani, S. and Bali, D., 2015. Virulence factors of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – A status update. *Journal of ICDRO*, 7 (2), 137-145.
- »»» Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Prochazkova, J. and Duskova, Jana, 2014. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research*, ID 476068, 8.
- »»» Pandit, N., Gugnani, S., Sushil, D. and Bali, D., 2016. *Treponema denticola*: A teammate in periodontal progression. *Journal of ICDRO*, 8 (1), 58-62.
- »»» Potempa, M., Potempa, J., Kantyka, T., Nguyen, KA., Wawrzonek, K., Manadhar, S.P., Popadiak, K., Riesbeck, K., Eick, S. and Blom, A.M., 2009. Interpain A, a Cysteine Protease from *Prevotella intermedia*, Inhibits Complement by Degrading Complement Factor 3. *PLoS Pathogens*, 5 (2), e1000316.
- »»» Sela, M.N., 2001. Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12 (5), 399-413.
- »»» Sharma, A., 2000. Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*. *Periodontology*, 54 (1), 106-116.