

Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen den drei Geräten NucliSENS® easyMAG®, MagNA Pure 24 und ELITE InGenius®

Kathrin Reber, BMA 17-20 A

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Institut für Infektionskrankheiten, Molekulare Analytik

1. Zusammenfassung

Im Institut für Infektionskrankheiten stehen mehrere Geräte zur Nukleinsäureextraktion im Einsatz. In dieser Arbeit wurde die Extraktionseffizienz der Geräte NucliSENS® easyMAG® von bioMérieux, MagNA Pure 24 von Roche und ELITE InGenius® der ELITechGroup verglichen. Zum Vergleich dienten die Probenmatrices Liquor mit den klinisch relevanten Erregern Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1), Varizella-Zoster-Virus (VZV) und Enterovirus (ENV) sowie Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BAL) mit Influenza A (IFA), Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) und Cytomegalievirus (CMV).

Es wurden negative Liquor- und BAL-Patientenproben als Probenmatrices gesammelt. Durch die Zugabe von positiven Erregerstocklösungen wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Aus drei der Verdünnungsstufen wurde je ein Triplikat mit tiefer (Ct >35), mittlerer (Ct 27-35) und hoher (Ct <27) Erregerkonzentration synchron auf jedem Gerät extrahiert. Alle Proben wurden gleichzeitig mittels einer Real-Time-Polymerase Chain Reaction (Real-Time-PCR) ausgewertet. Der Methodenvergleich mit Bland-Altman-Plots zeigte, dass alle die über den ELITE InGenius® extrahierten Proben durchschnittlich um einen Ct-Wert von 1 früher detektiert werden als auf den beiden anderen Geräten. Aufgrund des geringeren Probendurchsatzes eignet sich dieses Gerät jedoch weniger gut für die Routine. Der MagNA Pure 24 ist für die Ablösung des NucliSENS® easyMAG® in der Routineanalytik, mit Ausnahme der BAL-Proben, geeignet.

2. Einleitung

Auf dem halbautomatischen System NucliSENS® easyMAG® wird aktuell das grösste Spektrum an Materialien und Erregern extrahiert. Die Patientenproben werden manuell in die Küvetten pipettiert, was bei den beiden anderen Geräten automatisch geschieht. Da der NucliSENS® easyMAG® 2024 firmenseitig vom Markt genommen wird, soll er durch die vollautomatischen Systeme MagNA Pure 24 und ELITE InGenius® ersetzt werden. Das Extraktionsprinzip aller drei Geräte basiert auf der «Magnetic beads-Technologie». Nach der Extraktion werden die Eluate mittels Real-Time-PCR ausgewertet. Die Detektion basiert auf dem «Reporter-Quencher-System». Die Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes kann nach jedem PCR-Zyklus gemessen werden und ist proportional zur Amplifikationsmenge. [1]

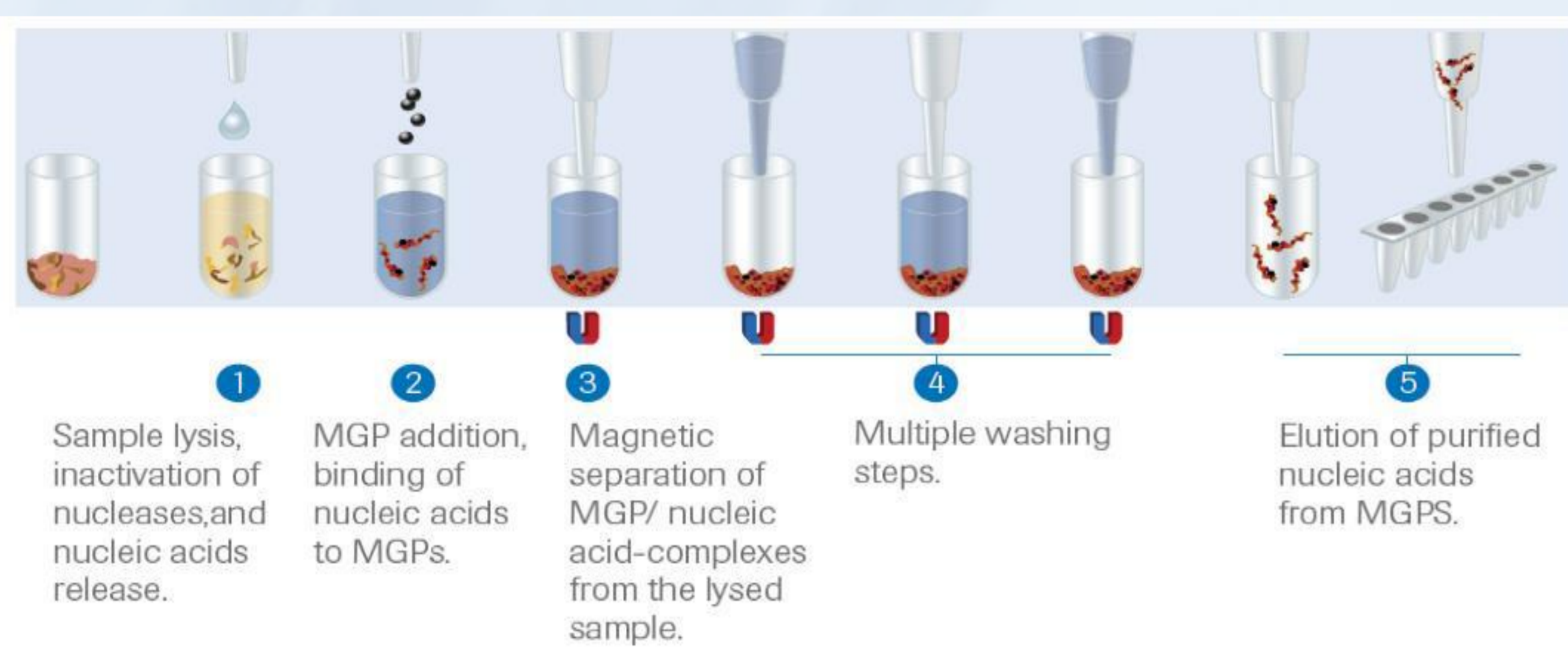


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Nukleinsäureextraktion auf dem MagNA Pure 24 System. Die Nukleinsäuren binden an die magnetischen Glaspartikel (MGP) und werden während mehrerer Waschschriffe, bis hin zur Elution, festgehalten.

3. Ziele und Fragestellungen

- Ist die Extraktionseffizienz der drei Geräte NucliSENS® easyMAG®, MagNA Pure 24 und ELITE InGenius® statistisch gleichwertig?
- Variiert die Extraktionseffizienz abhängig vom untersuchten Probenmaterial für die Erreger HSV-1, VZV, ENV, IFA, RSV und CMV?

4. Material und Methodik

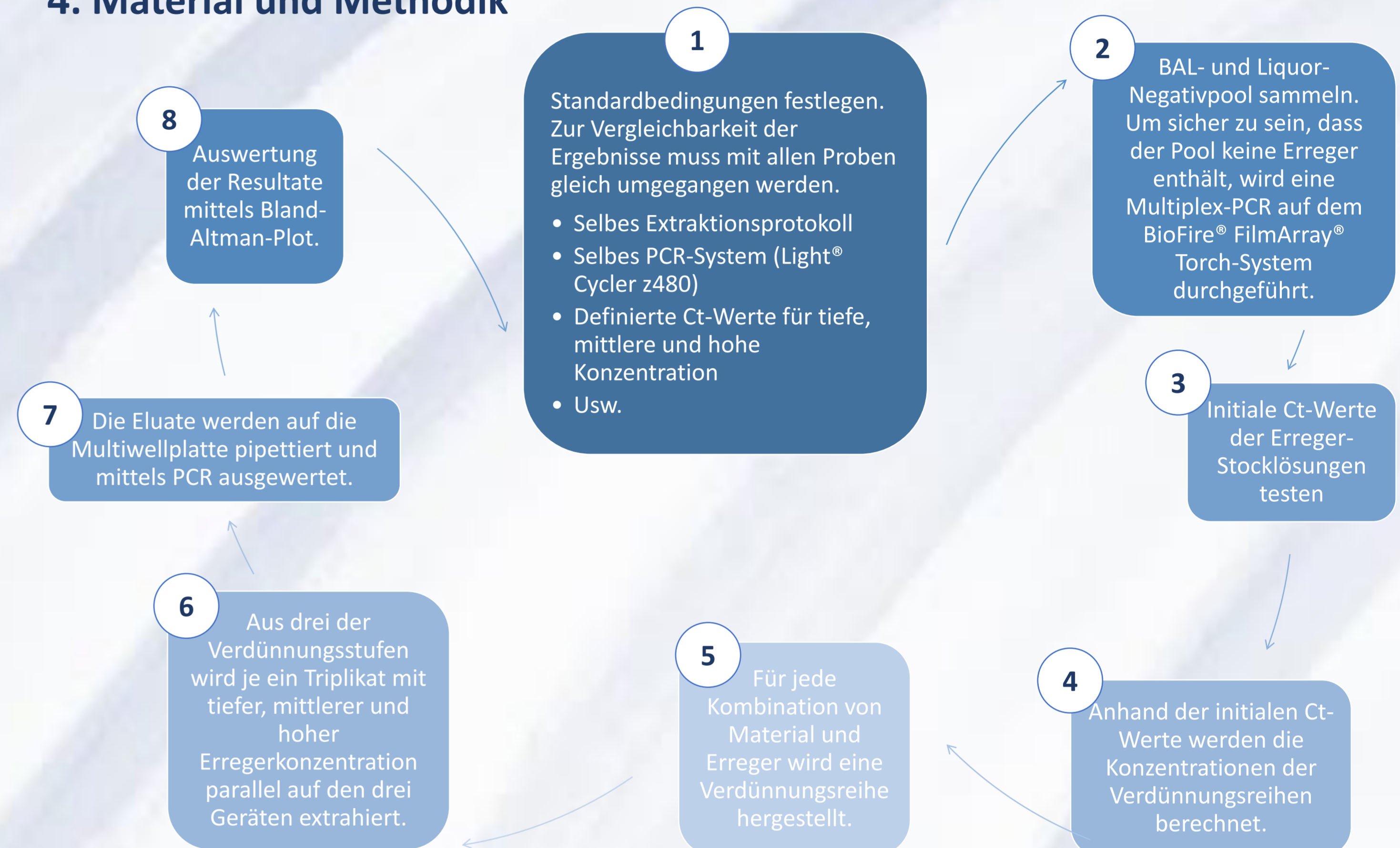


Abb. 4.1 Vorgehensweise der praktischen Durchführung

5. Ergebnisse und Resultate

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in einem Bland-Altman-Plot. Erwünscht ist, dass sich 95 Prozent der Resultate im $\pm 2s$ -Bereich befinden. Zusätzlich wird die Standardabweichung (s) angegeben und der Korrelationskoeffizient (r) berechnet. Als Goldstandard wird der EasyMAG verwendet. Zu beachten gilt, dass ein hoher Ct-Wert mit einer tiefen Konzentration einhergeht und umgekehrt. Als Beispiel ist in der Abbildung 5.1 der Methodenvergleich von HSV-1 zwischen dem NucliSENS® easyMAG und dem MagNA Pure 24 aufgeführt.

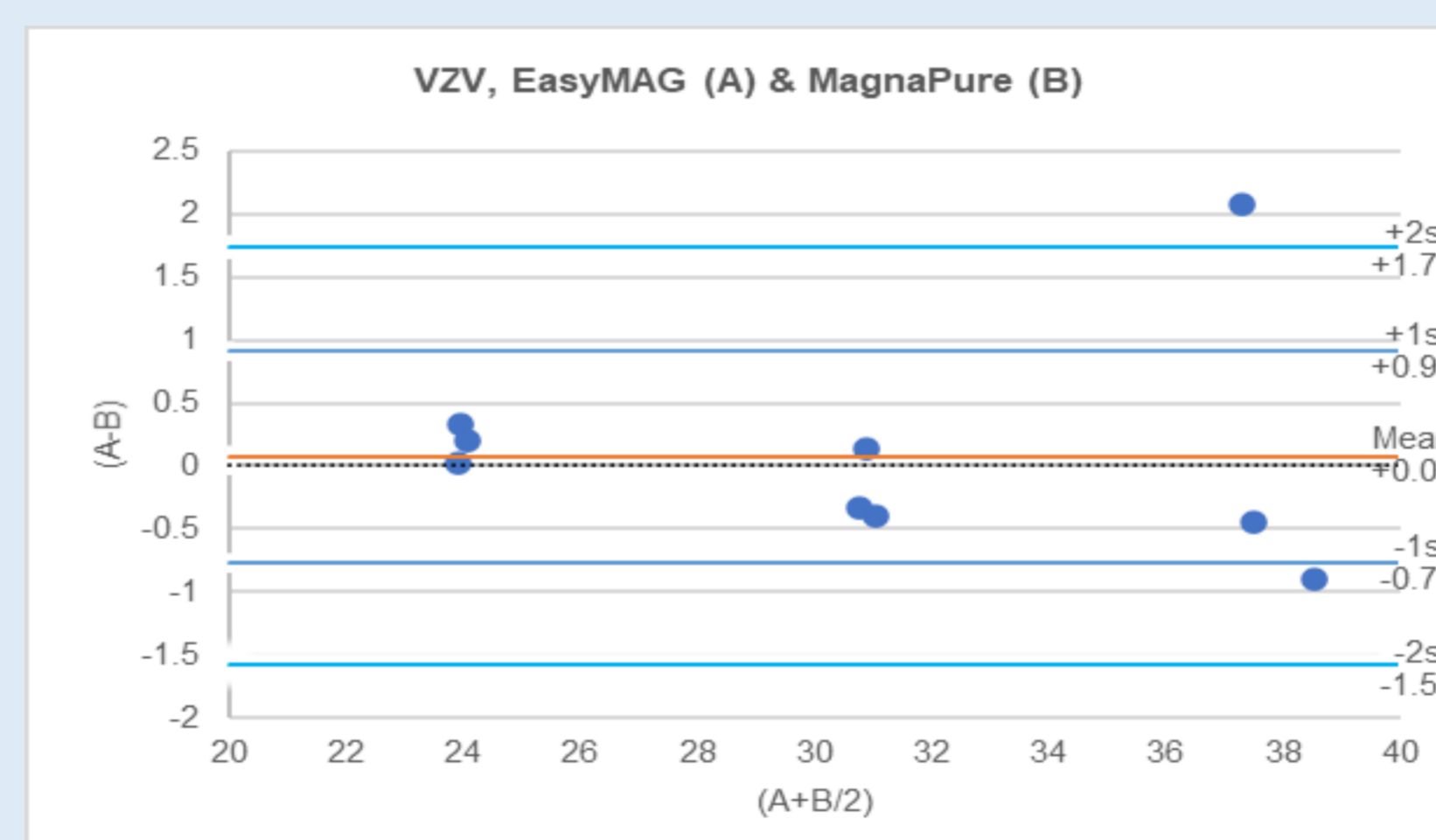


Abb. 5.1: Der Mean befindet sich nahezu bei 0. Die Standardabweichung ergibt 0,84. Die Punkte im tiefen und mittleren Bereich liegen nahe beieinander sowie innerhalb des $\pm 1s$ -Bereichs. Im hohen Bereich ist ein Punkt ausserhalb des $+2s$ -Bereichs. Der Korrelationskoeffizient ergibt mit 0,990 einen Wert, welcher nahe bei +1,0 liegt.

6. Diskussion

Durch die zu Beginn festgelegten Standardbedingungen können die Ergebnisse eins zu eins miteinander verglichen werden. Der Korrelationskoeffizient liegt bei allen Tests, mit Ausnahme der BAL-Messungen, sehr nahe beim Idealwert von +1,0. Der Methodenvergleich mit Bland-Altman-Plots zeigte, dass alle die über den ELITE InGenius® extrahierten Proben durchschnittlich um einen Ct-Wert von 1 früher detektiert werden als auf dem NucliSENS® easyMAG® und dem MagNA Pure 24. Mit Ausnahme von wenigen Ausreissern liegen die Resultate von Liquor, welche vom MagNA Pure 24 extrahiert wurden, alle innerhalb des $\pm 2s$ -Bereichs. Somit kann der MagNA Pure 24 den NucliSENS® easyMAG® zur Extraktion von HSV-1, VZV und ENV aus Liquorproben in der Routineanalytik ablösen. Aufgrund invalider Resultate der Erreger IFA, RSV und CMV konnte jedoch auch gezeigt werden, dass sich der MagNA Pure 24 nicht für die Extraktion von BAL-Proben eignet. Es ist zu empfehlen, im hohen Ct-Bereich noch weitere Testungen durchzuführen, um eine noch bessere Aussagekraft über die Extraktionseffizienz der Geräte machen zu können.

Referenzen

[1] Thermo Fisher Scientific Inc. (2020). *Real-Time PCR: Understanding Ct*. Abgerufen von <https://www.thermofisher.com/ch/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>

Abbildungen

Abb. 2.1 Life Science Roche. (2017). *MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit* (Version 1). Mannheim: Roche Diagnostics GmbH

Abb. 4.1 Reber, K. (2020). *Vorgehensweise der praktischen Durchführung*. Bern: IFIK

Abb. 5.1 Reber, K. (2020). *Bland-Altman-Plot des Vergleichs von VZV zwischen EasyMAG und MagNA Pure*. Bern: IFIK