

Tischgeräte zur Nukleinsäureamplifikation und -detektion

Kleine Geräte mit großer Leistung

Auch nach über 30 Jahren gibt es im PCR-Labor noch methodische Weiterentwicklungen und Verbesserungen im Bereich der Automation. Alternative isotherme Verfahren vergrößern das Angebot. Wir stellen fünf verschiedene Tischgeräte für die PCR- und LAMP-Technik vor.

Amplifikationsverfahren sind die biochemischen Arbeitspferde des molekular-diagnostischen Labors. Gibt man den Polymerasen ausreichend Futter und sorgt für ein angenehmes Milieu ohne Fremd-DNA, Nukleasen und Inhibitoren, dann sind sie fleißig, und die Reaktion läuft und läuft und läuft...

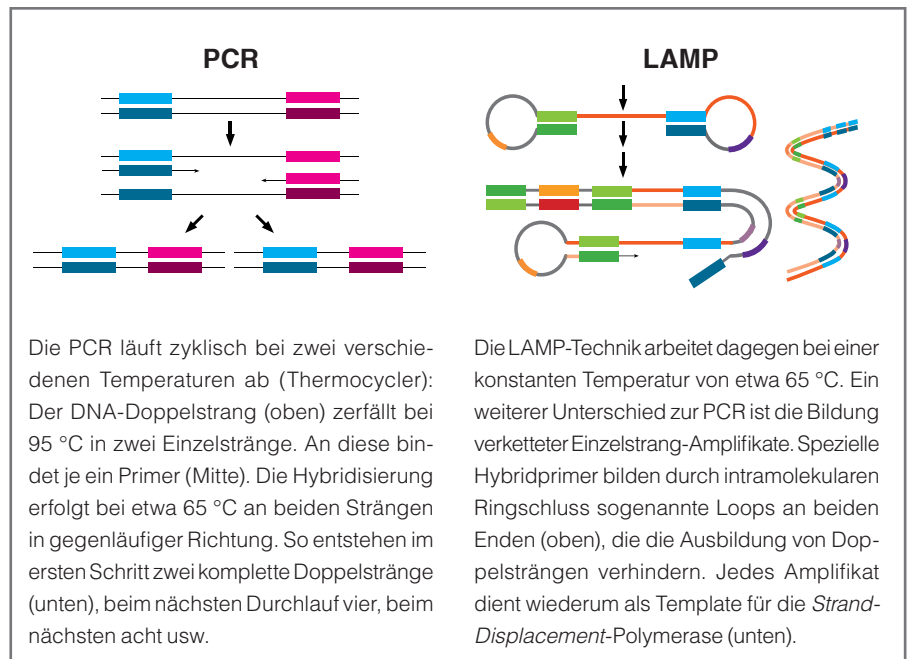
Trotz aller Fortschritte der Nukleinsäure-Analytik – von DNA-Microarrays bis zum *Next Generation Sequencing* – sind PCR¹, LAMP² & Co. durch nichts zu ersetzen. In der medizinischen Diagnostik dienen sie vor allem der Identifikation und Quantifizierung infektiöser Erreger sowie der Erkennung erblicher und erworbener Mutationen. Daneben benötigt man sie als Bestätigungstests für innovative Verfahren und zur Produktion von Ausgangsmaterial für die Sequenzierung.

Realtime-PCR

Durch die Einführung von hitzestabilen Polymerasen aus Archaeobakterien konnte die PCR deutlich vereinfacht und kostengünstiger durchgeführt werden. Und dank der Realtime-PCR wurde die Elektrophorese zur Auswertung der eigentlichen PCR entbehrlich; die Detektion von Fluoreszenzsignalen bei Entstehung spezifischer Amplifikate erlaubt jetzt im Echtzeit-Verfahren eine kontinuierliche Quantifizierung der Messergebnisse. Bei geschickter Wahl der Farbstoffe können mehrere Nach-

¹ Polymerase Chain Reaction

² Loop-Mediated Isothermal Amplification



weise in einem Reaktionsgefäß parallel durchgeführt werden (Multiplex-PCR). Voraussetzung dafür sind ausreichend weit auseinanderliegende Anregungs- und Absorptionswellenlängen, um störende Überlappungen zu vermeiden.

Isotherme Amplifikation

Das hier vorgestellte LAMP-Verfahren (s. Abb.) gehört zu den isothermen Methoden, die bei einer konstanten Temperatur um die 65 °C arbeiten. Der wesentliche Trick besteht im Einsatz sog. Hybridprimer und einer Strand-Displacement-Polymerase, die im Gegensatz zur PCR einsträngige DNA-Amplifikate produziert.

Vier der fünf auf der nächsten Doppelseite vorgestellten Geräte nutzen das PCR-Verfahren, sind also Thermocycler.

Bei Zweien handelt es sich um baugleiche Geräte – Hersteller Qiagen und dessen Distributor Vela Diagnostics – die aber jeweils eigene Steuerungs- und Auswertungssoftware und eigene Testkits verwenden. Die exakten Temperaturzyklen für die PCR werden mit Peltier- (Bio-Rad und Hain) oder Heizelementen und Luftkühlung (Airflow; Qiagen und Vela) erzeugt. Die Temperaturgenauigkeit und Uniformität sind – angepasst an die Zielsetzung der Reaktion – unterschiedlich hoch. Hain Lifescience stellt hier eine qualitative, fluoreszenz-basierte Endpunkt-PCR vor, alle anderen Verfahren arbeiten kinetisch. Die zulässigen Temperaturschwankungen sind mit 0,2 bis 0,8 °C durchweg gut.

Das fünfte Gerät verwendet das bereits angesprochene isotherme LAMP-Verfahren.

QIASymphony RGQ and artus assays



Choose QIAGEN
for your molecular diagnostics:

- Detection of STIs
- Blood-borne virus testing
- Women's health diagnostics
- Healthcare-associated infections

Find out more at
www.qiagen.com/goto/qiasymphonyrgq

Trademarks: QIAGEN®, QIASymphony®, artus®, Rotor-Gene® Q, (QIAGEN Group). For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual (available at www.qiagen.com, from QIAGEN Technical Services, or your local distributor). © QIAGEN 2013, all rights reserved.



ren: DiaSorin hat es quantifizierbar und multiplexfähig gemacht (Q-LAMP).

Beide Verfahren basieren auf Fluoreszenzsignalen. Als Anregungslichtquellen dienen ausnahmslos LEDs; für die Detektion sind die Geräte mit Photodioden (Bio-Rad, DiaSorin, Hain Lifescience) oder Photomultipliern (Qiagen, Vela Diagnostics) ausgestattet. Enge Wellenlängenbereiche für Anregung und Detektion werden mit Filtern eingestellt. Die Geräuschemission der Geräte bewegt sich in einem Bereich zwischen 51,5 (DiaSorin) und 57 dB (Bio-Rad). Das entspricht in etwa dem Geräuschpegel in einem Raum, in dem mit normaler Lautstärke gesprochen wird.

Vier Geräte verfügen über mehrere Kanäle, sind also multiplexfähig. Zur Auswertung der Messdaten wird geeignete

Software mitgeliefert, die bei Qiagen und Vela Diagnostics auch High Resolution Melt-Messungen (HRM) unterstützt. Bio-Rad kann bis zu 96 Proben, Vela Diagnostics bis zu 72 und Qiagen bis zu 100 Proben gleichzeitig messen. DiaSorin und Hain Lifescience bieten kleine Batchgrößen an, erreichen aber durch mehrere aneinander gekoppelte Geräte einen Random Access-Modus und eine höhere Probenzahl (DiaSorin bis zu sechs, Hain Lifescience bis zu acht Geräte).

Jede Firma stellt fertige Kits zur Verfügung, die alle benötigten Reagenzien, insbesondere Substrate, Enzyme und Kontrollmaterialien enthalten. Nachfolgend finden Sie eine Auswahl aus dem umfangreichen Portfolio der teilnehmenden Firmen. 🌸

Dr. Gabriele Egert, Mitglied der Redaktion

Auswahl CE-IVD-zertifizierter Testkits

für die auf der nächsten Doppelseite vorgestellten Amplifikationssysteme

Bio-Rad Laboratories

Pathogene: CT, MG, NG; HR-HPV, MTB; Free DNA Fetal Kit RhD

DiaSorin Deutschland

Pathogene: BKV, VZV, Toxoplasma gondii, Parvovirus B19, CMV, HSV1/2

Hain Lifescience

Pathogene: MRSA, MTB, CT, NG, HSV 1/2

Humangenetik: Faktor V, Faktor II, MTHFR C677T, HH C2B2Y, HH H63D, LCT, IL28B, HLA-B27

Qiagen

Pathogene quantitativ: BKV, C. diff., CMV, CT, NG, EBV, HBV, HCV, HIV-1, Influenza, Influenza H1, Malaria, MTB, SARS, Parvovirus B19, VZV; in Vorbereitung: MRSA/SA, VanR. Qualitativ: HSV 1/2 (Quantifizierungsstandards auf Anfrage erhältlich)

CDx: EGFR, KRAS, BRAF

Blutkrebs: BCR-ABL1 Mbcf alle Fusionstranskripte, CBFB-MYH11A, JAK2, MLL, MPL, W515 L/K, PML-RARA bcr1, PML-RARA bcr2, PML-RARA bcr3, Wilms Tumor WT1



Vela Diagnostics

Pathogene: Strep A (Group A Streptococcus), MTC, Norovirus, C. diff., vanA/vanB, MRSA/SA; quantitativ: VZV, EBV, HSV 1/2

CDx: BRAF


Abkürzungen (Pathogene):

BKV = Humanes Polyomavirus, C. diff. = Clostridium difficile, CMV = Cytomegalie-Virus, CT = Chlamydia trachomatis, EBV = Epstein Barr-Virus, HBC = Hepatitis B-Virus, HCV = Hepatitis C-Virus, HIV = Humanes Immundefizienz-Virus, HR-HPV = High-Risk Humanes Papillomavirus, HSV 1/2 = Herpes simplex-Virus 1 & 2, MG = Mycoplasma genitalium, MRSA/SA = Methicillin-resistente Staphylococcus aureus, MTB = Mycobacterium tuberculosis, MTC = Mycobacterium tuberculosis Complex, NG = Neisseria gonorrhoeae, SARS = Schweres akutes respiratorisches Syndrom, vanA/vanB = Vancomycin-Resistenz, VZV = Varizella Zoster Virus

| | Bio-Rad Laboratories GmbH | DiaSorin Deutschland GmbH |
|---|--|---|
| Tischgeräte zur Nukleinsäureamplifikation und -detektion |  |  |
| Kontaktangaben | Dr. Johannes Köller Tel. 089/31884-280 johannes_koeller@bio-rad.com www.bio-rad.com | Dr. Annette Tietze Tel. 06074/401-490 atietze@diasorin.de www.diasorin.com |
| Systembezeichnung | Dx Real-Time System | LIAISON Iam Detektionsgerät |
| Breite x Höhe x Tiefe (cm) | 33 x 36 x 46, Gewicht 22 kg | 19 x 30 x 37, Gewicht 9 kg |
| Assaysetup | Auf barcodierten PCR-Platten | Auf LIAISON Ixt |
| Amplifikationsmethode | Realtime-PCR (quantitativ) | Q-LAMP (quantitativ und qualitativ) |
| Anregungsfilter (Absorption, nm) | 450 bis 684, vom verwendeten Kanal abhängig | 496, 529, 573 |
| Detektionsfilter (Emission, nm) | 515 bis 730, vom verwendeten Kanal abhängig | 506, 561, 612 |
| Detektor | Photodioden | 3 motorisch bewegliche Photodioden |
| Dynamischer Messbereich | < 10 log Stufen | 10 ³ –10 ¹⁰ (abhängig vom Assay) |
| Multiplexfähigkeit (Anzahl Kanäle) | 5 plus 1 (FRET) | 3 |
| Schmelzkurvenanalyse | Nein | Ja |
| Bearbeitungsmodus | Batch | Bei 1–6 parallel geschalteten Geräten Random Access |
| Proben- und Kontaminationskontrolle | Ja | Extraktions- und Amplifikationskontrolle im Kit enthalten |
| Einwegmaterial/Zusatzreagenzien | Verbrauchsmaterialien PCR Platten oder Streifen | 8er Streifen, Adaptoren, Schraubverschlüsse enthalten |
| Reagenzoffen | Ja | Nein |
| Individuelle Protokolle | Homebrew-Protokolle | Kommerzielle IVD-Kits |
| Heiz- und Kühltechnik: | Peltier | Luftkühlung durch Ventilator |
| Temperaturbereich und -genauigkeit (°C) | 0–100 Block, bis zu 105 Deckel, ±0,2 nach Erreichen der Zieltemperatur von 90 | 45–100 |
| Temperaturuniformität (°C) | ±0,4 innerhalb von 10 Sek. | 55–70: ±0,25 |
| Heiz-/Kühlrate (°C/Sek.) | Bis zu 5 | Isotherm: 1/Sek. und 0,6/Min. |
| Probenvolumen (µl) | Assay-abhängig | 20–30 |
| Reaktionsvolumen (µl) | 1–50 (empfohlen 10–25) | 50 |
| Anzahl Proben pro Lauf: | Max. 96, flexible Batchgröße | 5 (quantitativ) oder 6 Proben (qualitativ) |
| davon Kontrollpositionen | Bio-Rad Dx Assays 2, ansonsten Assay-abhängig | 2–3 |
| Aufrüstzeit bei voller Beladung (Min.) | < 1 | Selbstcheck < 1 |
| Hands-on-time/Lauf (Min.) | Ca. 10 | 10 |
| Zeitbedarf (Min./n Zyklen) | Protokoll-abhängig | 45 (qualitativ), 60 (quantitativ) |
| Vorläufiges Ergebnis | Kontinuierlich für Eigenapplikationen; Bio-Rad Dx Assays: 2–3 h | 10–15 Min. |
| Informationstechnik | Dx Software für Bio-Rad Dx Assays: einfach zu bedienen, automatische Ergebnisinterpretation; CFX-Manager für Programmierung und Analyse von Fremdassays | Software vorinstalliert auf Iam-Computer, Updates kostenlos, Barcodescanner |
| Reinigungsintervalle und Zeitaufwand | 1 x monatlich < 5 Min. | 1 x wöchentlich |
| Wartungsintervalle und Zeitaufwand | 1 x jährlich, geringer Aufwand; werkseitig vorkalibrierte Optik, keine Kalibrierung notwendig | 1 x jährlich, < 5 h |
| Kundendienst/Technische Hotline | Mo–Fr 8–18 Uhr | Mo–Fr 8–18 Uhr |
| Besonderheiten / Alleinstellungsmerkmale | Für optimale Multiplex-PCR-Ergebnisse. Schnelle Heiz- und Kühlzyklen. Innovative, robuste und vom Hersteller kalibrierte optische Einheit für optimale PCR-Ergebnisse. Unterstützung durch Fernwartung | Maximale Flexibilität im Probendurchsatz (1–48 Proben) durch Verwendung von 1–6 Geräten. Besonders kleine Ausmaße, extrem einfach zu bedienende Software, schnelle Ergebnisse in 45–60 Min. mit Angabe der Kopienzahl ohne Notwendigkeit der aufwendigen Interpretation. CE-IVD Kits für BKV, Herpes-Viren, Parvovirus, Toxoplasma gondii |

Abkürzungen:

FRET = Förster-Resonanzenergietransfer, HAI = Healthcare Associated Infections, HRM = High Resolution Melting, LAMP = Loop Mediated Isothermal Amplification, NA = Nucleic Acids

| | Hain Lifescience GmbH | QIAGEN GmbH | Vela Diagnostics GmbH |
|--|--|---|---|
| |  |  |  |
| | Lisann Mußmacher Tel. 07473/9451-16 lisann.mussmacher@hain-lifescience.de www.hain-lifescience.de | Dr. Antje Plaschke-Schluetter Tel. 0041 55/254-2118 antje.plaschke-schluetter@qiagen.com www.qiagen.com | Troels Meyer Tel. 040/890662232 troels.meyer@veladx.com www.veladx.com |
| | FluoroCycler® 12 | Rotor-Gene Q MDx Realtime-PCR Cyclers | Rotor-Gene Q 5plex HRM |
| | 18,5 x 24 x 24, Gewicht ca. 5 kg | 37 x 27,5 x 42, Gewicht 12 kg | 37 x 27,5 x 42, Gewicht 12 kg |
| | Im GenoXtract® 96 | Zum Beispiel im QS-AS-RGQ System | Auf Sentosa SX |
| | Fluoreszenzbasierte-Endpunkt-PCR (qualitativ) | Realtime-PCR (quantitativ und qualitativ) | Realtime-PCR (quantitativ) |
| | 470 | 365, 470, 530, 585, 625, 680, 460 (HRM) | 365, 470, 530, 585, 625, 680, 460 (HRM) |
| | 520 | 460, 510, 555, 610, 660, 712, 510 (HRM) | 460, 510, 555, 610, 660, 712, 510 (HRM) |
| | Photodiode | Photomultiplier | Photomultiplier |
| | 9 log Stufen | Parameter-abhängig bis zu 10 log Stufen | Parameter-abhängig bis zu 10 log Stufen |
| | Nein | 2 (plus 1 HRM) , 5 (plus 1 HRM) , 6 | 5 plus 1 für HRM |
| | Ja | Ja, plus hochauflösende Schmelzkurven für HRM-Plattformen | Ja |
| | Bei einem Modul Batch, bei mehreren Random Access | Batch | Batch |
| | Amplifikationskontrolle vorhanden | Interne Amplifikationskontrolle / Wasserkontrolle | Amplifikations- und Negativkontrolle |
| | PCR-Reaktionsgefäße zusätzlich erforderlich | PCR-Tubes in Strips oder Ringformat (72 oder 100) | Reaktionsgefäße und Heißsiegelfolie in 72-Ringformat |
| | IVD: Nein; R&D: Ja | Ja | Ja |
| | Ja, möglich mittels Fluoro-Software R&D | Ja | Vela-Protokolle werden mitgeliefert; Homebrew-Protokolle erlaubt |
| | 4 Peltierelemente | Heizelemente und Luftkühlung | Heizelemente und Luftkühlung |
| | 4–99,9; ±0,8 (20–99 in der Probe) | 35–99; ±0,5 | 35–99; ±0,5 |
| | ±0,5 in der Probe | 0,02 bei einer Temperatur zwischen 35–99 °C | 0,02 bei einer Temperatur zwischen 35–99 °C |
| | Bis 3 | > 15 / > 20 | > 15 / > 20 |
| | 6 (für FluoroType®-Tests); R&D: flexibel | 15 mit QIAGEN Rotor-Gene-Kits | 5–10 |
| | 16 (für FluoroType®-Tests); R&D: flexibel | 20 mit QIAGEN Rotor-Gene-Kits | 20–25 mit Vela-Kits |
| | max. 12 pro Modul | mind. 2–72 oder 100 in Rotor-Disc | 1–72 |
| | flexibel | 4–6, Kit-abhängig | Mind. 2, Kit-abhängig |
| | < 5 | 1 | 3 |
| | < 5 | 1–30, abh. von Workflow und Probenzahl | Assay-Setup auf Sentosa SX 101 Instrument |
| | Keine Angabe möglich | 45–60 (Assay-spezifisch) | Assay-spezifisch |
| | Ca. 2 h, abhängig vom Test | Kontinuierlich | Kontinuierlich |
| | Fluoro-Software IVD & Fluoro-Software R&D, Barcode-scanner für Probentracking und Kit-Chargeneingabe | LIMS Anbindung bidirektional; Schnittstellen zu QS-RGQ-AS und allen QIAGEN Automaten; Assay Manager für maximale Sicherheit & Ergebnisinterpretation; Barcodescanner | Laptop mit vorinstallierter Software und Vela Laufprotokolle. Barcodescanner möglich. Anbindung zum LIS-System über Sentosa Link Software |
| | Keine; Empfehlung: Gehäuse 1 x monatlich reinigen | 1 x monatlich ca. 3–5 Min. | Keine |
| | 1 x jährlich | Wartungsfrei | Halbjährlich, 60 Min. |
| | Mo–Fr 9–17 Uhr | Mo–Fr 8–17 Uhr, Mo–Sa 24 h (nur engl.) | Täglich 8–18 Uhr |
| | Alle Programme für die FluoroType®-Tests sind vorinstalliert; Anschluss von bis zu 8 Modulen möglich | Realtime-PCR in höchster Präzision; Gerät erfüllt EU IVD Direktive 98/79/EC; robuste Technologie; geringer Wartungsbedarf; breites Portfolio an CE-IVD-PCR-Kits für Humanmedizin und Kits/Assays für Veterinärmedizin, Lebensmittelsicherheit und zahlreiche molekularbiologische Forschungsanwendungen | Bedienungs- und wartungsfreundlich. Probenverfolgung mit Anbindung zur Sentosa SX. Optimal in Kombination mit dem breiten Vela Diagnostics Produktportfolio |

Die Tabelle stellt laut Artikel 9 Bayerisches Pressegesetz eine Anzeige dar; sie basiert auf Herstellerangaben und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und Richtigkeit.