

Zastosowanie aparatu NucliSens easyMag do automatycznej izolacji kwasów nukleinowych w diagnostyce medycznej

Application of automatic nucleic acid extractor NucliSens easyMag in medical diagnostics

Piotr Grabarczyk

Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej,
Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Streszczenie

Automatyzacja laboratoriów wykorzystujących metody biologii molekularnej w diagnostyce medycznej staje się obecnie coraz częściej koniecznością. W pracy przedstawiono informacje dotyczące jednego z dostępnych na rynku urządzeń do automatycznej izolacji kwasów nukleinowych. Omówiono podstawy procesów wykorzystanych w aparacie NucliSens easyMag (bioMerieux), charakterystykę urządzenia oraz przykłady jego zastosowania na podstawie własnych doświadczeń i literatury. Przedstawiono zalety aparatu i problemy, z którymi mogą się zetknąć użytkownicy tego typu urządzeń.

Zastosowanie omawianego ekstraktora w laboratorium diagnostycznym stanowi racjonalną alternatywę dla manualnych metod ekstrakcji kwasów nukleinowych; usprawnia rutynową pracę i stwarza nowe możliwości.

Słowa kluczowe: izolacja kwasów nukleinowych, DNA, RNA, automatyzacja, diagnostyka medyczna

J. Transf. Med. 2010; 1: 1–8

Summary

It is becoming standard procedure to introduce automatization in laboratories which employ molecular biology for the purpose of medical diagnostics. This paper presents one of the currently available devices for automatic isolation of nucleic acids. The paper describes the molecular principles of isolation used in NucliSens easyMag (bioMerieux), the extractor itself and examples of application to routine diagnostics as based on our own experience and literature. The advantages of the device as well as difficulties that users may encounter are discussed.

Application of this extractor intended for automatic nucleic acid isolation is a rational alternative to manual procedures; it improves routine work and offers new diagnostic possibilities.

Key words: nucleic acid extraction, DNA, RNA, automatization, medical diagnostics

J. Transf. Med. 2010; 1: 1–8

Wprowadzenie

Techniki amplifikacji kwasów nukleinowych (NAT, *nucleic acid amplification techniques*) zrewolucjonizowały diagnostykę. Przełom nastąpił w szczególności w dziedzinie mikrobiologii, gdzie dzięki ich zastosowaniu zaczęto w sposób specyficzny i ze znaczną czułością wykrywać wiele patogenów. Stało się możliwe wprowadzenie do rutynowych badań testów ilościowych oraz analizy polimorfizmu. Badania typu *multipleks* pozwoliły na uzyskiwanie dużej liczby informacji w krótkim czasie. Postępowi w dziedzinie technik namnażania kwasów nukleinowych towarzyszyło ulepszenie metod izolacji kwasów nukleinowych wykorzystywanych jako substrat w NAT. Konieczne było opracowanie metod otrzymywania kwasów nukleinowych:

- o odpowiedniej czystości;
- pozbawionych inhibitorów reakcji enzymatycznych;
- o odpowiedniej koncentracji.

Powszechność stosowania NAT w laboratoriach i rosnąca liczba aplikacji sprawiły, że coraz pilniejsze stało się wdrożenie automatyzacji poszczególnych etapów, w tym izolacji kwasów nukleinowych.

Obecnie metody biologii molekularnej zajmują kluczowe miejsce w transfuzjologii laboratoryjnej, gdzie na wielką skalę są wykorzystywane do prowadzenia przeglądowych badań wirusologicznych oraz w badaniach potwierdzenia wyników reaktywnych uzyskanych w przeglądowych badaniach immunoenzymatycznych. Techniki amplifikacji kwasów nukleinowych są bardzo ważne w badaniach antygenów komórek krwi (HLA, HPA, RHD, itp.). Stąd i w tej dziedzinie diagnostyki wiedza dotycząca postępów metodyki izolacji kwasów nukleinowych jest tak bardzo istotna.

W pracy omówiono zasady działania, charakterystykę oraz przykłady zastosowań jednego z dostępnych obecnie na rynku automatycznego aparatu przeznaczanego do izolacji kwasów nukleinowych — ekstraktora NucliSens easyMag (bioMerieux).

Zasady działania i charakterystyka aparatu NucliSens easyMag

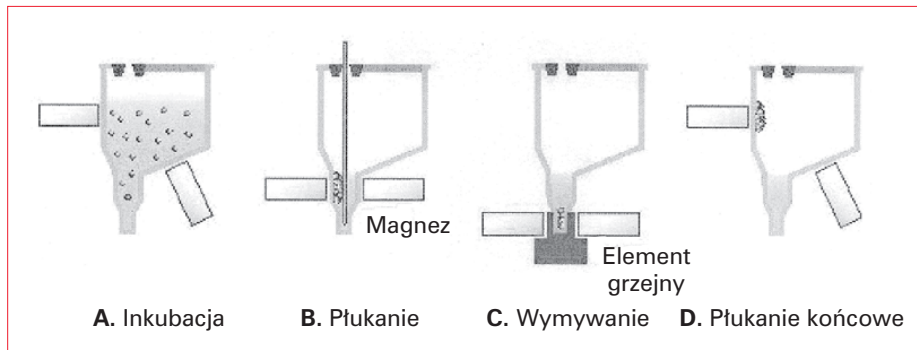
W aparacie NucliSens easyMag wykorzystano metodę izolacji opracowaną przez Booma i wsp. opisaną w 1990 roku [1]. Dwie substancje mają kluczowe znaczenie: tiocyjanian guanidyny (GuSCN) oraz krzemionka. Pierwszy związek był wcześniej znany jako bardzo efektywny czynnik do oczyszczania DNA i RNA ze względu na wysoki potencjał

lityczny komórek oraz skuteczność inaktywacji nukleaz. W wypadku krzemionki pewne było, że wykazuje ona znaczne powinowactwo do kwasów nukleinowych, a jej dodatkową zaletą jest powszechność występowania. Boom i wsp. wykazali, że połączenie właściwości tych dwóch substancji w jednej metodzie umożliwia szybkie oczyszczenie z ludzkiej surowicy lub moczu kolistego dwuniciowego DNA, liniowego dwuniciowego DNA, jednociowego DNA oraz rRNA. W ten sposób, w krótkim czasie, jednocześnie izolowano zarówno DNA, jak i RNA. Wydajność procedury była wysoka i pozwalała odzyskać dużą ilość kwasów nukleinowych. Wyizolowane RNA nie było zdegradowane, charakteryzowało się wysoką czystością i nadawało się do dalszej obróbki enzymatycznej [1].

Metodę Booma i wsp. zastosowano do opracowania automatycznej procedury izolacji kwasów nukleinowych (ryc. 1). Pierwszy krok standardowej procedury automatycznej polega na odpipetowaniu próbki do próbówki z buforem zawierającym czynnik chaotropowy (GuSCN). Po krótkiej inkubacji, w trakcie której następują liza i uwolnienie kwasów nukleinowych z komórek lub w wypadku wirusów z otoczek, mieszaninę przenosi się do specjalnego pojemnika. Następnie jest dodawana zawiesina krzemionki opłaszczonej na cząsteczkach magnetycznych. W pojemniku, w warunkach wysokiego stężenia soli, zachodzi adsorpcja kwasów nukleinowych na powierzchni krzemionki. System automatycznych pipet odciąga lizat. Tuż przed aspiracją lizatu do ścianek pojemnika zbliżają się magnesy, które zatrzymują w pojemniku krzemionkę z zaadsorbowanymi kwasami nukleinowymi. Pozostałości lizatu są odpłukiwane buforem zawierającym GuSCN, a następnie innymi buforami płuczącymi. Ostatni etap polega na elucji i zawieszeniu kwasów nukleinowych w podgrzanym niskostężonym buforze elucyjnym [2].

Na wstępnym etapie izolacji istnieje możliwość dodania wewnętrznej kontroli/kalibratora. Odpowiednie DNA czy RNA może być przeniesione do lizatu jako wewnętrzny standard umożliwiający kontrolę efektywności/prawidłowości procesu izolacji.

Opracowano wiele standardowych protokołów zarządzających pracą aparatu, które pozwalają na izolację kwasów nukleinowych z różnego materiału biologicznego: surowicy, osocza, krwi pełnej, płynu mózgowo-rdzeniowego, moczu, kału, kultur bakteryjnych, jednojądrzastych komórek krwi obwodowej, tkanek [2]. W aparacie stosuje się pojemniki umożliwiające jednoczesną izolację z 8 próbek. Możliwa jest jednoczesna obróbka materiału maksymalnie w 3 pojemnikach, czyli 24 próbki. Stan-



Rycina 1. Schemat izolacji kwasów nukleinowych na pokładzie aparatu NucliSens easyMag (dzięki uprzejmości bioMerieux Polska)

Figure 1. Scheme of nucleic acid extraction with NucliSens EasyMag

- A.** Podczas inkubacji próbek z buforem lizującym kwasy nukleinowe są uwalniane, a następnie „wychwytywane” przez krzemionkę opłaszczoną na cząstkach magnetycznych
- B.** Magnes umiejscowiony na pokładzie NucliSens easyMag zatrzymuje cząstki magnetyczne w pojemniku, umożliwiając systemowi oczyszczenie kwasów nukleinowych w procesie wielokrotnego płukania
- C.** Etap podgrzewania pozwala na efektywne uwolnienie kwasów nukleinowych z cząstek krzemionki do niskostężonego buforu
- D.** W ostatnim etapie cząstki magnetyczne są oddzielane od eluatu

dardowa procedura izolacji DNA/RNA z 8–24 próbek trwa około 45 minut, licząc od momentu wstawienia materiału biologicznego do aparatu. Musi być poprzedzona 15-minutowym etapem przygotowawczym oraz zakończona przeniesieniem eluatu zawierającego kwasy nukleinowe do czystej próbki. Można przyjąć, że, stosując procedurę standardową, w ciągu godziny możliwe jest uzyskanie eluatu kwasów nukleinowych nawet z 24 próbek [2]. Organizując pracę tak, aby w trakcie działania aparatu przygotowywać kolejną partię próbek, można przeprowadzić 8 serii izolacji, za każdym razem nastawiając 24 próbki. W ten sposób w trakcie jednej zmiany można przeprowadzić 192 izolacje.

Aparat jest obsługiwany przez oprogramowanie, które pozwala na: 1. wybór odpowiedniej procedury izolacji, 2. dokonanie opcjonalnych ustawień protokołu (np. objętość próbki oraz eluatu), 3. kontrolę procesu izolacji (postęp procedury, ocena ilości odczynników, śledzenie błędów), 4. generowanie, przechowywanie i drukowanie protokołów izolacji oraz ich przebiegu [2].

Użytkownik dysponuje standardowymi protokołami izolacji (*generic*, *specific*), jednak dopuszczalna jest pewna elastyczność, jeśli chodzi o przebieg procesu izolacji. Istnieją dwa opcjonalne scenariusze — w pierwszym (procedura *on board*) dodawanie buforu lizującego do próbki następuje na pokła-

dzie urządzenia, w alternatywnym (*off board*) etap ten i wstępna inkubacja są prowadzone poza aparatem, w przeznaczony do tego celu przedamplifikacyjnej części laboratorium. Zwłaszcza w przypadku drugiego sposobu postępowania istnieje możliwość modyfikowania procedury (np. dodawanie proteazy K lub/i zmiany proporcji buforu lizującego do objętości materiału badanego, zmiana ilości krzemionki, itp.) w celu zwiększenia jej wydajności. Tego typu modyfikacji dokonano w Pracowni Biologii Molekularnej IHiT. Ponieważ standardowy protokół izolacji DNA z krwi pełnej nie pozwalał na uzyskanie kwasów nukleinowych o oczekiwanej czystości oraz koncentracji, wdrożono procedurę, w której zamiast 200 μ l buforu lizującego zastosowano 900 μ l. Dodatkowo proces lizy *on board* został poprzedzony inkubacją *off board*.

Kilku autorów dokonało bezpośredniego porównania aparatu NucliSens easyMag z innymi tego rodzaju urządzeniami oraz z metodami manualnymi wykorzystywanymi w diagnostyce klinicznej. Konfrontowano wyniki badań NAT różnych patogenów po izolacji z różnorodnego materiału klinicznego na ekstraktorze bioMerieux i na urządzeniach firmy Qiagen GmbH, takich jak BioRobot 9604 [3], Biorobot MDx [4] i EZ1 [5, 6]; firmy Roche — MagNA Pure Compact [6] oraz metodami manualnymi — QIAamp DNA lub RNA Viral Mini Kit (Qiagen) [3, 5–8] i High Pure

PCR Template Preparation Kit (Roche) [6]. Choć odczynniki oraz materiały zużywalne do tego aparatu należały do najdroższych, metoda ta wymagała stosunkowo niewielkiego zaangażowania obsługi i pozwoliła uzyskać bardzo wysoką przepustowość oraz bardzo dobrą wydajność odzyskiwania kwasów nukleinowych z badanej próbki [5].

Zastosowanie automatycznej ekstrakcji kwasów nukleinowych w mikrobiologii

W Pracowni Biologii Molekularnej IHiT aparat NucliSens easyMag jest wykorzystywany do izolacji kwasów nukleinowych w trakcie wielu badań diagnostycznych, między innymi w badaniu ilościowym DNA CMV (*cytomegalovirus*) oraz DNA EBV (*Epstein-Barr virus*) w krwi pełnej. Badania DNA CMV są wykonywane głównie u pacjentów z chorobami hematologicznymi, zwłaszcza tych z upośledzoną odpornością i należących do grupy ryzyka reaktywacji zakażeń CMV. U pacjentów po przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych DNA CMV jest monitorowane według wcześniej opisanego algorytmu. Procedura badania/śledzenia DNA CMV u chorych z upośledzoną odpornością ma na celu różnicowanie istotnego klinicznie zakażenia aktywnego od nieistotnego zakażenia latentnego. Dodatkowo, monitorowanie DNA CMV metodami ilościowymi jest zlecane dla oceny skuteczności leczenia przeciwwirusowego [9, 10].

Ilościowe badanie DNA EBV wykonuje się w celu diagnozowania mononukleozy zakaźnej, po-transplantacyjnej choroby limfoproliferacyjnej (PTLD, *post-transplant lymphoproliferative disorder*) oraz do oceny przebiegu zakażenia.

W tabeli 1 porównano wyniki badań próbek kontrolnych (Program Zewnętrznej Kontroli Jakości Diagnostyki Molekularnej [*Quality Control for Molecular Diagnostics*] Glasgow, Szkocja 2009 rok) metodą *real-time* PCR (*polymerase chain reaction*) poprzedzoną izolacją DNA wykonaną automatycznym ekstraktorem NucliSens easyMag oraz metodą manualną z zastosowaniem kolumnienek z membraną krzemionkową (NucleoSpin Blood Kit, Macherey-Nagel); DNA wirusów CMV oraz Parvo B19 (B19V) izolowano obiema metodami z tych samych próbek, a następnie amplifikowano odpowiednią metodą *real-time* PCR. W wypadku DNA B19V, gdy używano procedury automatycznej, sygnał fluorescencji pojawiał się wcześniej. Świadczy to o podobnej efektywności obu systemów izolacji pozwalającej uzyskać podobną czułość detekcji, z niewielką przewagą procedury automatycznej.

Tabela 1. Porównanie wyników badania próbek kontrolnych zakażonych wirusem Parvo B19 oraz CMV po izolacji kwasów nukleinowych metodą manualną NucleoSpin Blood Kit, Macherey-Nagel oraz automatyczną NucliSens easyMag

Table 1. Comparison of test results of control samples infected with B19V and CMV after use of manual (NucleoSpin Blood Kit, Macherey-Nagel) and automatic (NucliSens EasyMag) method of extraction

Parvovirus B19 [IU/ml]	Wynik <i>real-time</i> PCR (Ct)	
	Metoda manualna	EasyMag
157	44,00	41,92
948	35,97	33,07
94	45 (ujemny)	45 (ujemny)
382	39,71	36,88
0	45 (ujemny)	45 (ujemny)
1274	34,1	33,72
708	40,91	34,52
28	45 (ujemny)	45 (ujemny)
CMV (AD 169) [kopie/ml]		
24 099	29,85	30,30
1009	33,18	34,65
211	38,32	38,45
252 348	25,81	26,43
1028	33,99	35,26
3266	31,69	33,16
23 174	28,71	29,93
0	45 (ujemny)	45 (ujemny)
2 228 435	22,33	22,69
238	45 (ujemny)	45 (ujemny)
245	36,10	38,11
4313	32,01	33,14

W obu przypadkach izolację prowadzono z 200 μ l osocza próbek kontrolnych oraz eluowano odpowiednio 50 i 25 μ l buforu elucyjnego. Do detekcji stosowano taką samą dla danego wirusa metodę *real-time* PCR [11, 12], wyniki wyrażono w postaci wartości Ct (*threshold cycle*)

Należy podkreślić, że zarówno w przypadku badań materiału klinicznego, jak próbek od dawców w badaniach przesiewowych prowadzonych u niektórych dawców krwi zdarza się, że mamy do czynienia z bardzo wysoką wiremią, sięgającą nawet 10^{13} IU/ml [13]. Tak znaczna koncentracja wirusa w próbce stwarza potencjalne ryzyko wystąpienia kontaminacji już na etapie przed amplifikacją. Dotychczas, w trakcie badań metodą automatyczną próbek z wysoką wiremią przekraczającą 10^6 IU/ml ($n = 30$) nie obserwowano tego typu niepożądanego zdarzenia prowadzącego do powstania wyników fałszywie dodatnich.

Tabela 2. Przykłady zastosowania aparatu do automatycznej izolacji kwasów nukleinowych NucliSens easyMag w mikrobiologii klinicznej**Table 2.** Examples of application of automatic nucleic acids extractor NucliSens easyMag in medical microbiology

Badany patogen	Materiał biologiczny	Materiał genetyczny patogenu/ów	Metoda NAT	Piśmiennictwo
<i>Metapneumovirus</i> (hMPV)	Materiały z górnych dróg oddechowych (aspiraty, popłuczyny, wymazy, płwocina)	DNA	NASBA (EasyQ)	[14]
<i>Cytomegalovirus</i> (CMV)	Wysuszona krew pobrana na bibułę	DNA	Real-time PCR, klasyczny PCR	[28]
<i>Cytomegalovirus</i> (CMV)	Osocze	DNA	QPCR (Artur)	[21]
<i>Bordatella pertusis</i>	Popłuczyny oskrzelowe			
<i>Herpes simplex virus II</i>	Płyn mózgowo-rdzeniowy	DNA	QPCR	[5]
<i>Coxsackievirus A9</i>				
<i>BK virus</i>	Osocze			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Próbka z tchawicy			
HCV	Osocze	RNA	Abbott Real TimeHCV QPCR	[20]
HIV-1	Osocze	RNA	Nuclisens Easy Q-EasyMag HIV-1 assay	[15]
HIV-1	Osocze	RNA	Nuclisens Easy Q-EasyMag HIV-1 assay	[18]
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Wymaz z gardła	DNA	Real-time	[16]
<i>Chlamydia pneumoniae</i>			NASBA EasyQ	
CMV	Pełna krew		QPCR real-time PCR	
<i>Respiratory Syncytial virus</i> (RSV)	Próbki z górnych dróg oddechowych	RNA	NASBA	[24]
<i>Human papiloma virus</i>	Wymaz z szyjki macicy/Cervical swabs	DNA	Amplicor HPV, Linear Array HPV genotyping	[19]
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Próbki z górnych dróg oddechowych	DNA	Nuclisens easyQ	[17]
<i>Chlamydia pneumoniae</i>				
<i>Clostridium difficile</i> (toxin B gene)	Kał	DNA	Real-time PCR	[27]
<i>Influenza A (H1N1) virus</i>	Próbki z górnych dróg oddechowych	RNA	Multipleks real-time PCR poprzedzony odwrotną transkrypcją	[25]
<i>Influenza A (A1–A3) virus</i>				
<i>Influenza B virus</i>				
RSV				
<i>Influenza A virus</i>	Próbki z górnych dróg oddechowych	RNA/DNA	Real-time PCR	[3]
<i>Influenza B virus</i>				
<i>Parainfluenza virus type 1</i>				
<i>Adenovirus</i>				

W automacie izolowane są także kwasy nukleinowe do badania w kierunku wirusa BK (wirus krwotocznego zapalenia pęcherza moczowego), do badania genotypu wirusa HBV i HCV metodą odwrotnej hybrydyzacji (LIPA) oraz do reakcji PCR, której produkt jest stosowany do sekwencjonowania (badanie polimorfizmu HBV, B19V).

W różnych laboratoriach aparat jest wykorzystywany do wykrywania wielu innych patogenów (tab. 2). Automatyczna metoda izolacji jest łączona

z detekcją metodami typu *home made* oraz z zestawami komercyjnymi takich producentów, jak Bio-Merieux [14–18], Roche [19] czy Abbott [20, 21]. Prowadzone są badania różnorodnego materiału biologicznego obejmującego osocze [5, 15, 20–22], krew pełną [16, 23], materiał z dróg oddechowych [3, 5, 14, 16, 17, 24–26], płyn mózgowo-rdzeniowy [5, 6], mocz [4], kał [27]. Wykazano użyteczność tej procedury do badań przesiewowych DNA CMV u noworodków. Jako materiał wyjściowy stosowa-

no bibułę z zaschniętą krwią [28]. Wielu autorów podkreśla, że izolacja easyMag pozwala skuteczniej ograniczyć trudności związane z obecnością w badanym materiale biologicznym inhibitorów reakcji enzymatycznych. Jest to szczególnie istotne w przypadku izolacji kwasów nukleinowych z moczu. Wchodzący w jego skład mocznik to silny inhibitor polimerazy DNA stosowanej w reakcji PCR. Skala problemu związanego z obecnością inhibitorów reakcji PCR w moczu oraz jego ograniczenie przez stosowanie ekstrakcji kwasów nukleinowych na aparacie easyMag została pokazana przez Kima i wsp. [4]. Porównano wyniki badania DNA wirusa BKV w osoczu oraz w moczu po ekstrakcji kwasów nukleinowych równoległe dwiema metodami wykorzystującymi powinowactwo krzemionki do kwasów nukleinowych — w aparacie easyMag oraz BioRobot MDx system (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy). To drugie urządzenie wykorzystuje powszechnie stosowaną w laboratoriach technologię membran krzemionkowych umieszczonych w kolumnkach. Ilościowa metoda *real-time* PCR pozwalała na wykrycie DNA wirusa BK. Badanie było unieważniane, jeśli wartość Ct (*threshold cycles*) dla kontroli wewnętrznej wynosiła powyżej 36. Gdy badano osocze, odsetek wyników nieważnych dla obu metod był zbliżony, jednak gdy badano mocz, w przypadku metody wykorzystującej membrany krzemionkowe konieczność powtórzenia badania z powodu nieważnej kontroli wewnętrznej występowała niemal trzykrotnie częściej (ok. 36%). Według autorów wyniki takie wskazują na to, że system easyMag skuteczniej usuwa inhibitory reakcji PCR obecne w moczu. Jednocześnie, tam gdzie udało się uzyskać wyniki dodatnie obiema metodami, fluorescencja po izolacji technologią z użyciem krzemionki opłaszczonej na kulkach magnetycznych pojawiała się wcześniej w trakcie amplifikacji (Ct miało niższą wartość). Wyniki badań przedstawione przez Kima i wsp. pokazują, że jest to metoda przynosząca wymierne korzyści w badaniach ilościowych wirusa BK w moczu.

Zastosowanie aparatu NucliSense easyMag do badań genetycznych

Oprócz zastosowania w mikrobiologii aparat NucliSense easyMag może być wykorzystywany w laboratoriach genetycznych oraz onkologicznych.

Standardowy protokół pozwala na izolację kwasów nukleinowych ze 100 μ l krwi pobranej na *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (EDTA) oraz ich elucję w objętości 25–110 μ l odpowiedniego buforu. Na przykład, przy użyciu standardowego protokołu

z próbek krwi pełnej pobranej od 20 dawców z parametrami morfologii krwi mieszczącymi się w granicach normy uzyskiwano stężenie DNA w granicach 13,07–27,48 ng/ μ l (pomiaru dokonywano w 1 μ l eluatu w spektrofotometrze NanoDrop). Wydaje się, że wspomniany protokół wydajnej ekstrakcji kwasów nukleinowych z bibuły z zaschniętą krwią może znaleźć zastosowanie w klinicznych laboratoriach genetycznych, onkologicznych oraz w laboratoriach medycyny sądowej.

W Pracowni Biologii Molekularnej IHiT urządzenie to stosowano do genotypowania krwinek płytkowych (HPA1) metodą *sequence specific priming* (SSP) oraz do genotypowania krwinek czerwonych (RHD) metodą *real-time* PCR. Wysoka wydajność w odzyskiwaniu kwasów nukleinowych z osocza została wykorzystana do opracowania unikalnych metod pozwalających na prowadzenie nieinwazyjnych badań prenatalnych w osoczu kobiet ciężarnych w konfliktach serologicznych [29–31]. Wykorzystano fakt, że w osoczu kobiety ciężarnej jest obecne pozakomórkowe, wolnokrążące DNA płodu, które stanowi 3–6% DNA izolowanego w osoczu. Pojawia się ono już w 5.–7. tygodniu ciąży, jego stężenie wzrasta w trakcie ciąży i zanika szybko po porodzie [32]. Takie postępowanie diagnostyczne pozwala zastąpić badanie antygenów na powierzchni erytrocytów pobieranych podczas kordocentezy albo badania metodami genetycznymi z amniocytów lub kosmków łożyska, które niosą ze sobą ryzyko powikłań, pogłębienia immunizacji matki, a nawet utraty ciąży. Automatyczna izolacja DNA z 1 ml osocza matki oraz zagęszczenie w 25 μ l buforu elucyjnego pozwala wykryć metodą *real-time* PCR nawet najmniejsze ilości DNA niosące ze sobą informacje o rodzaju antygenów czerwono krwiniowych płodu oraz odpowiednich genów kontrolnych. Badanie nieinwazyjne genu RHD płodu stosuje się obecnie rutynowo w Pracowni Biologii Molekularnej Zakładu Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej u kobiet z przeciwciałami anti-RhD. Niewykrycie genu RHD w próbce DNA izolowanego z osocza ciężarnej zawierającego DNA płodowe wskazuje na to, że przeciwciała nie są groźne dla płodu. Można więc nie podejmować inwazyjnych metod monitorowania choroby hemolitycznej.

Wydajna izolacja DNA z osocza kobiet ciężarnych jest też konieczna dla opracowywania metod identyfikacji innych antygenów komórek krwi, poprzez analizę kodujących je genów. Szczególnie istotne będzie opracowanie diagnostyki antygeny K z układu Kell oraz antygeny HPA1a płytek krwi [29]. W przypadku tych antygenów różnice w antygenach matki i płodu sprowadzają się do jednego

nukleotydu (polimorfizm typu *single nucleotide polymorphism*), co w znacznym stopniu zwiększa skalę trudności wdrażania takiej metody.

Kontaminacje niskocząsteczkowymi fragmentami genomu obserwowane w badaniach nieinwazyjnych prowadzonych w autora pracy laboratorium wskazują na konieczność opracowania odpowiednich procedur zapobiegających tego typu problemom. Niektóre laboratoria przezornie nie prowadzą izolacji z osocza i z krwi pełnej przy użyciu tego samego aparatu [informacja ustna].

Podsumowanie

Aparat NucliSens easyMag jest przykładem jednego z dostępnych obecnie na rynku urządzeń do automatycznej izolacji RNA i DNA. Umożliwia ekstrakcję kwasów nukleinowych z różnorodnego materiału klinicznego, pozwala usprawnić rutynową pracę metodami NAT i stanowi realną alternatywę dla obecnie najpowszechniej stosowanych w Polsce metod manualnych. Zaletą urządzenia jest efektywne usuwanie inhibitorów reakcji enzymatycznych oraz elastyczność stosowanych protokołów pozwalająca na wprowadzanie modyfikacji poprawiających wydajność. Przed wprowadzeniem automatycznej ekstrakcji kwasów nukleinowych należy dokonać analizy ekonomicznej ponoszonych kosztów oraz oszczędności, jakie niesie ze sobą częściowe zastąpienie pracy osób zatrudnionych w laboratorium.

Piśmiennictwo

1. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M.E., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28 (3): 495–503.
2. NucliSens EASYMAG Podręcznik użytkownika. Wersja 2.0; 04.2008. bioMérieux, Boxtel, Holandia.
3. Chan K.H., Yam W.C., Pang C.M., Chan K.M., Lam S.Y., Lo K.F., Poon L.L., Peiris J.S. Comparison of the NucliSens easyMAG and Qiagen BioRobot 9604 nucleic acid extraction systems for detection of RNA and DNA respiratory viruses in nasopharyngeal aspirate samples. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (7): 2195–2199.
4. Kim S., Park S.J., Namgoong S., Sung H., Kim M.N. Comparative evaluation of two automated systems for nucleic acid extraction of BK virus: NucliSens easyMAG versus BioRobot MDx. *J. Virol. Methods* 2009; 162 (1–2): 208–212.
5. Dundas N., Leos N.K., Mitui M., Revell P., Rogers B.B. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *J. Mol. Diagn.* 2008; 10 (4): 311–316.
6. Yera H., Filisetti D., Bastien P., Ancelle T., Thulliez P., Delhaes L. Multicenter comparative evaluation of five commercial methods for toxoplasma DNA extraction from amniotic fluid. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (12): 3881–3886.
7. Hantz S., Goudard M., Marczuk V. i wsp. HPV detection and typing by INNO-LiPA assay on liquid cytology media Easyfix Labonord after extraction QIAamp DNA Blood Mini Kit (R) Qiagen and Nuclisens easyMAG(R) Biomérieux. *Pathol. Biol. (Paris)*. 2009 Oct 26. [w druku].
8. Perandin F., Pollara P.C., Gargiulo F., Bonfanti C., Manca N. Performance evaluation of the automated NucliSens easyMAG nucleic acid extraction platform in comparison with QIAamp Mini kit from clinical specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2009; 64 (2): 158–165.
9. Grabarczyk P., Brojer E., Nasitowska B., Mariańska B. Użyteczność ilościowego badania techniką real-time PCR do wykrywania i monitorowania zakażenia cytomegalowirusem po przeszczepieniu allogenicznych komórek krwiotwórczych. *Polski Merkuriusz Lekarski* 2006, 123: 227–231.
10. Grabarczyk P. Wykrywanie i monitorowanie zakażeń CMV metodą ilościowego real-time PCR — nowe możliwości diagnostyki zakażenia wirusem CMV. *Diagnostyka Laboratoryjna* 2008, 44: 249–260.
11. Candotti D., Etiz N., Parsyan A., Allain J-P. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J. Virology* 2004; 78 (22): 12169–12178.
12. Machida U., Kami M., Fukui T. i wsp. Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (7): 2536–2542.
13. Łętowska M. (red.). *Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania ich składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi*. Warszawa, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, 2009.
14. Ginocchio C.C., Manji R., Lotlikar M., Zhang F. Clinical evaluation of NucliSENS magnetic extraction and NucliSENS analyte-specific reagents for real-time detection of human metapneumovirus in pediatric respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (4): 1274–1280.
15. Scott L.E., Noble L.D., Moloi J., Erasmus L., Venter W.D., Stevens W. Evaluation of the Abbott m2000 RealTime human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assay for HIV load monitoring in South Africa compared to the Roche Cobas AmpliPrep-Cobas Amplicor, Roche Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan HIV-1, and BioMérieux NucliSENSEasyQ HIV-1 assays. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (7): 2209–2217.
16. Loens K., Bergs K., Ursi D., Goossens H., Ieven M. Evaluation of NucliSens easyMAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (2): 421–425.
17. Bèssède E., Renaudin H., Clerc M., de Barbeyrac B., Bébéar C., Pereyre S. Evaluation of the combination of the NucliSENS easyMAG(R) and the EasyQ(R) applications for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory tract specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2009 Nov 26. [w druku].
18. Stevens W., Horsfield P., Scott L.E. Evaluation of the performance of the automated NucliSENS easyMAG and EasyQ systems versus the Roche AmpliPrep-AMPLICOR combination for high-throughput monitoring of human immunodeficiency virus load. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (4): 1244–1249.
19. Koidl C., Bozic M., Hadzisejdic I. i wsp. Comparison of molecular assays for detection and typing of human papillomavirus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008; 199 (2): 144.e1–6.
20. Martró E., García-Sierra N., González V., Saludes V., Matas L., Ausina V. Evaluation of an automated nucleic acid extractor for hepatitis C virus load quantification. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (3): 811–813.

21. Caliendo A.M., Ingersoll J., Fox-Canale A.M. i wsp. Evaluation of real-time PCR laboratory-developed tests using analyte-specific reagents for cytomegalovirus quantification. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (6): 1723–1727.
22. Milia M.G., Alice T., Gregori G., Mussino S., Orofino G., Bonora S., Ghisetti V. Magnetic-silica based nucleic acid extraction for Human Immunodeficiency Virus Type-1 drug-resistance testing in low viremic patients. *J. Clin. Virol.* 2010; 47 (1) 8–12.
23. Pillet S., Bourlet T., Pozzetto B. Comparative evaluation of a commercially available automated system for extraction of viral DNA from whole blood: application to monitoring of epstein-barr virus and cytomegalovirus load. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (11): 3753–3755.
24. Manji R., Lotlikar M., Zhang F., Ginocchio C. Clinical Evaluation of NucliSENS Magnetic Extraction and NucliSENS Analytic Specific Reagents for the Real Time Detection of Respiratory Syncytial Virus (RSV) in Pediatric Respiratory Specimens. *J. Clin. Pathol.* 2009 Jul 21. [w druku].
25. Bose M.E., Beck E.T., Ledebner N. i wsp. Rapid semiautomated subtyping of influenza virus species during the 2009 swine origin influenza A H1N1 virus epidemic in Milwaukee, Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (9): 2779–2786.
26. Bolotin S., De Lima C., Choi K.W. i wsp. Validation of the TaqMan Influenza A Detection Kit and a rapid automated total nucleic acid extraction method to detect influenza A virus in nasopharyngeal specimens. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2009; 39 (2): 155–159.
27. Stamper P.D., Babiker W., Alcabasa R. i wsp. Evaluation of a new commercial TaqMan PCR assay for direct detection of the clostridium difficile toxin B gene in clinical stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (12): 3846–3850.
28. Soetens O., Vauloup-Fellous C., Foulon I. i wsp. Evaluation of different cytomegalovirus (CMV) DNA PCR protocols for analysis of dried blood spots from consecutive cases of neonates with congenital CMV infections. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (3): 943–946.
29. Orzińska A., Guz K., Brojer E., Żupańska B. Preliminary results of fetal Rhc examination in plasma of pregnant women with anti-c. *Prenat. Diagn.* 2008, 28: 335–337.
30. Orzińska A., Engels K., Łakomy M. i wsp. Obecność „niemego” genu *RHD* u RhD ujemnej kobiety ciężarnej z przeciwciałami anti-RhD uniemożliwia określenie genotypu *RHD* płodu metodą nieinwazyjną. *Ginekol. Pol.* 2009, 80: 786–790.
31. Orzińska A., Guz K., Brojer E. Nieinwazyjne badania prenatalne z osocza kobiet ciężarnych w konfliktach serologicznych w Polsce. *Ginekol. Pol.* 2009, 80: 768–771.
32. Lo Y., Corbetta N., Chamberlain P. i wsp. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997, 350: 485–487.