

Sada EZ1[®] DSP Virus Kit

Funkční vlastnosti sady EZ1 DSP Virus Kit byly stanoveny ve studiích hodnotících funkční vlastnosti pomocí plazmy, séra, likvoru, moči, plné krve, stolice, přepravních médií, suchých stěrů a respiračních alikvotů pro izolaci virových nukleových kyselin a bakteriální DNA. Testování bylo provedeno podle protokolů popsanych v aktuální verzi 4 příručky EZ1 DSP Virus.

Účinnost sady však není pro každý druh viru nebo bakterie garantována a musí být validována. Každý uživatel je zodpovědný za validaci funkčních vlastností systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích hodnotících funkční vlastnosti výrobků QIAGEN.

Funkční charakteristiky

Sérum a plazma

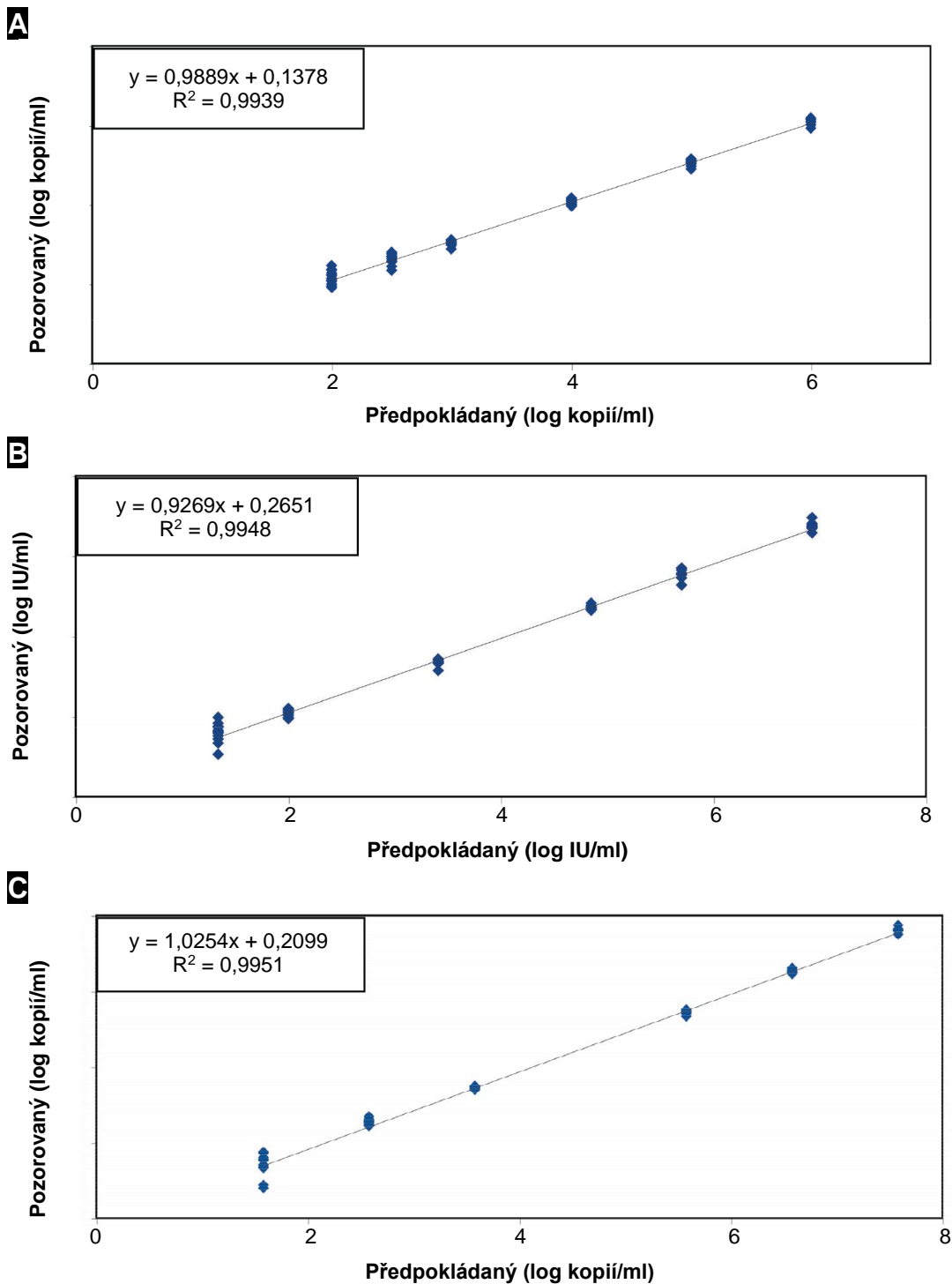
Lineární oblast kvantifikace

Lineární oblast kvantifikace pro sadu EZ1 DSP Virus Kit byla hodnocena pro viry HCV a HIV-1 RNA a virus HBV DNA. Testy byly provedeny s ředěními kvalifikovaných virových panelů vytvořených v HBV, HCV a HIV-1 negativní lidské plazmě či séru. Testovány byly řady ředění se šesti různými virovými titry, přičemž v každém bylo 12 replikátů. Lineární oblast kvantifikace postupu pro sadu EZ1 DSP Virus Kit byla stanovena pro HBV, HCV a HIV-1 pomocí analýz virové zátěže Abbott RealTime (Tabulka 1, Obrázek 1). Před extrakcí byly do každého alikvotu HIV-1 nebo HCV přidány přímo interní kontroly RealTime (každá po 17 µl). Pro RealTime HBV byly u každého alikvotu smíchány 3,4 µl interní kontroly RealTime HBV s nosičovou RNA. Virové nukleové kyseliny byly extrahovány ze 400 µl alikvotů a eluovány v 90 µl elučního pufru (AVE). PCR byla prováděna na Abbott *m* 2000rt.

Tabulka 1. Zdroj alikvotu a následné analýzy používané pro stanovení lineární oblasti kvantifikace výtěžků pomocí protokolu EZ1 DSP Virus

Virus	Zdroj	Následná analýza	Použitá analytická příručka
HIV-1	BBI (Boston Biomedica, Inc., Boston, USA) defektní HIV, rekalcifikovaná plazma BBI	Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HIV-1
HCV	ProMedDx (ProMedDx LLC Norton, MA, USA), alikvot od pacienta, sdružené normální lidské sérum	Abbott RealTime HCV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HCV
HBV	Teragenix (Teragenix Coporate, Ft. Lauderdale, FL, USA), alikvot od pacienta, rekalcifikovaná lidská plazma	Abbott RealTime HBV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HBV





Obrázek 1. Lineární oblast kvantifikace výtěžků při použití protokolu EZ1 DSP Virus. Lineární oblast kvantifikace protokolu EZ1 DSP Virus byl stanoven pomocí řady ředění virů a analýz Abbott RealTime (Tabulka 1) **A** pro HIV-1, **B** pro HCV a **C** pro HBV.

Přesnost

Směrodatné odchylky a koeficienty variací (Coefficient of Variation, CV) byly stanoveny pro řady ředění HIV-1, HCV a HBV v lineární oblasti kvantifikace příslušných navazujících analýz. Pro analýzu přesnosti byly použity stejné následné analýzy jako pro stanovení lineární oblasti kvantifikace (Tabulka 1). Údaje o přesnosti mezi analýzami jsou uvedeny v tabulkách 2–4. Pro každý prvek panelu bylo na pracovní stanici BioRobot EZ1 DSP extrahováno 12 replikátů ve 12 samostatných cyklech. PCR byla provedena ve 2 cyklech po 6 replikátech na zařízení Abbott *m 2000rt*.

Tabulka 2. Přesnost stanovení mezi zkouškami u protokolu EZ1 DSP Virus pomocí analýzy Abbott RealTime HIV-1

Prvek panelu	n	Kopie/ml	CV (%)	Log kopií/ml	SD (log kopií/ml)
1	12	148	40	2,17	0,17
2	12	426	26	2,63	0,13
3	12	1082	14	3,03	0,06
4	11	11 506	14	4,06	0,06
5	12	116 145	15	5,07	0,07
6	12	1 300 669	16	6,11	0,08

Tabulka 3. Přesnost stanovení mezi zkouškami u protokolu EZ1 DSP Virus pomocí analýzy Abbott RealTime HCV

Prvek panelu	n	IU/ml	CV (%)	Log IU/ml	SD (log IU/ml)
1	12	39	56	1,59	0,27
2	12	122	22	2,09	0,10
3	12	2331	16	3,37	0,08
4	11	51 582	12	4,71	0,05
5	12	357 547	23	5,55	0,11
6	12	5 505 964	24	6,74	0,10

Tabulka 4. Přesnost stanovení mezi zkouškami u protokolu EZ1 DSP Virus pomocí analýzy Abbott RealTime HBV

Prvek panelu	n	Kopie/ml	CV (%)	Log kopií/ml	SD (log kopií/ml)
1	12	22	60	1,34	0,34
2	12	357	16	2,55	0,07
3	12	2 835	7	3,45	0,03
4	11	280 221	10	5,45	0,05
5	12	3 311 311	12	6,52	0,05
6	12	40 040 547	14	7,60	0,06

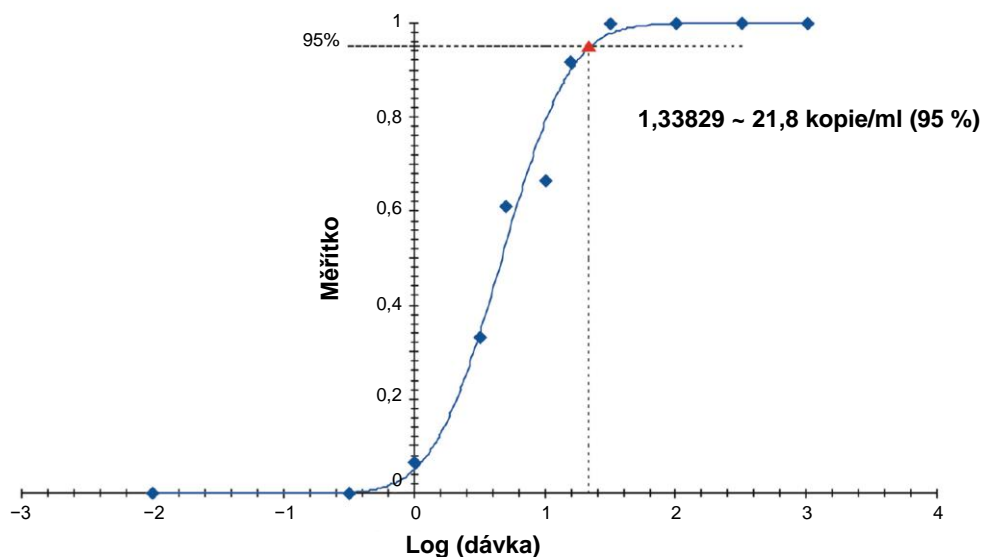
Mez detekce

Mez detekce byla stanovena 95% probitovou hodnotou pro systém EZ1 DSP Virus pomocí mezinárodního virového standardu HIV-1 WHO 97/656, mezinárodního virového standardu HBV WHO 97/746 a kvantifikovaného supernatantu buněčné kultury CMV. Mez detekce byla stanovena zpracováním řady ředění příslušných virů. Viry byly zředěny ve směsi HIV, HBV a CMV negativní normální lidské EDTA plazmy. Každý krok ředění byl připraven v alespoň 3 nezávislých cyklech s alespoň 6 replikáty na jedno ředění. Pro přípravu alikvoty na pracovní stanici BioRobot EZ1 DSP s elucí v 60 µl bylo použito 400 µl plazmy.

K detekci HBV DNA byly použity sady *artus*[®] HBV PCR Kit a k detekci CMV DNA byly použity sady *artus*[®] CMV PCR Kit. Alikvoty byly analyzovány na přístrojích LightCycler[®] 1.2 Instrument (Roche), Rotor-Gene[®] 3000 (Corbett Research) a ABI PRISM[®] 7000 SDS (Applied Biosystems). K detekci HIV RNA byl použit test COBAS[®] Amplicor[®] HIV-1Monitor[®] (verze 1.5) za použití analyzátoru COBAS Amplicor. Kombinovaná data pro všechny alikvoty byla vyhodnocena pomocí probitové analýzy. Data jsou uvedena v tabulkách 5–6 s reprezentativními probitovými grafy na obrázcích 2–3.

Tabulka 5. Mez detekce HBV a CMV DNA pomocí systému EZ1 DSP Virus a sad *artus*[®] PCR Kit

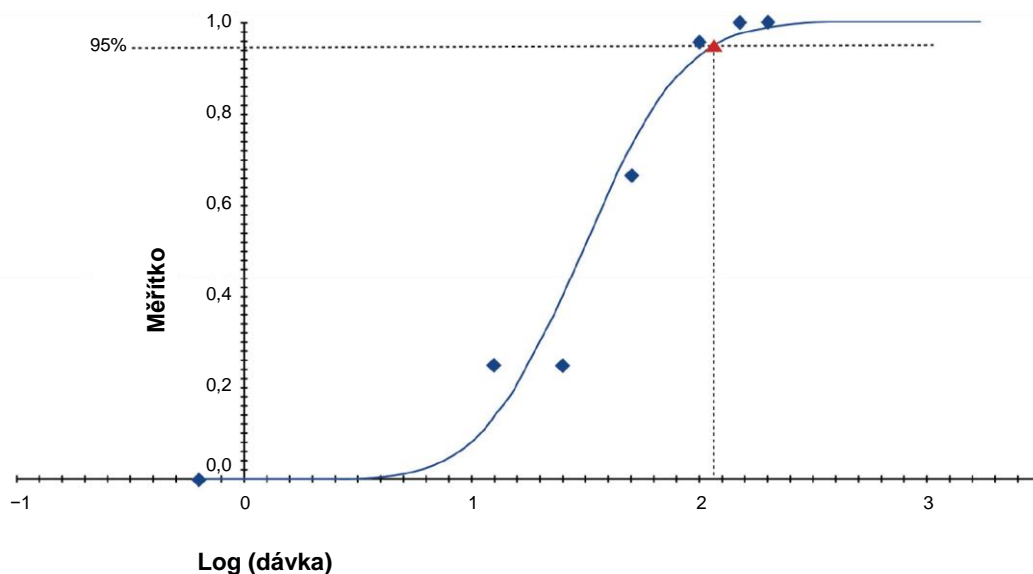
Virus	Vstupní titr	Zásahy (LightCycler)	Zásahy (Rotor-Gene)	Zásahy (ABI PRISM)
HBV	95% probitová hodnota (IU/ml)	45,7	14,4	13,2
	Interval spolehlivosti (IU/ml)	28–102	9,5–26,5	9,0–23,1
CMV	95% probitová hodnota (kopie/ml)	67,2	21,8	38,3
	Interval spolehlivosti (kopie/ml)	41,8–142	14,5–44,1	21,5–89,8



Obrázek 2. Probitová analýza pro detekci CMV DNA pomocí systému EZ1 DSP Virus a sady *artus*[®] CMV RG PCR Kit. Virové nukleové kyseliny byly purifikovány s použitím systému EZ1 DSP Virus a pro detekci CMV DNA na přístroji Rotor-Gene 3000 byla použita sada *artus*[®] CMV PCR RG Kit. 95% probitová hodnota byla 21,8 kopií/ml.

Tabulka 6. Mez detekce HIV RNA pomocí systému EZ1 DSP Virus a COBAS Amplikor HIV-1 Monitor Test, verze 1.5

Vstupní titr (IU/ml)	Zásahy
95% probitová hodnota (IU/ml)	114,5
Interval spolehlivosti (IU/ml)	82,9–194,3



Obrázek 3. Probitová analýza pro mez detekce HIV RNA pomocí systému EZ1 DSP Virus a COBAS Amplikor HIV-1 Monitor Test, verze 1.5. Virové nukleové kyseliny byly purifikovány za použití systému EZ1 DSP Virus, se vstupem alikvoty 400 µl a s elucí 60 µl. K detekci HIV RNA na analyzátoru COBAS Amplikor v ultrasenzitivním režimu byl použit COBAS Amplikor HIV-1 Monitor Test. 95% probitová hodnota byla 114,5 IU/ml.

Vyloučení přenosu mezi alikvoty

Bylo provedeno devět cyklů na přístrojích BioRobot EZ1 DSP, EZ1 Advanced a EZ1 Advanced XL, aby se vyhodnotilo riziko křížové kontaminace během postupů EZ1 DSP Virus a mezi nimi. Testy byly provedeny za použití kvantifikovaného alikvoty od pacienta s parvovirem B19. Virové zatížení pozitivních alikvotů použitých pro testy přenosu bylo $1,0 \times 10^8$ IU/ml. Pro ředění pozitivních alikvotů a alikvotů coby negativní kontroly byla použita směs negativní EDTA plazmy s lidským parvovirem B19.

K detekci přenosu mezi alikvoty byly na každém přístroji se střídavým šachovnicovým nastavením negativních a vysoce pozitivních alikvotů provedeny 2 cykly. Každý třetí cyklus byl proveden pomocí všech negativních alikvotů za účelem monitorování možného přenosu mezi jednotlivými cykly. Toto nastavení alikvoty bylo opakováno třikrát, což vedlo k celkem devíti cyklům pro každý přístroj. Parvovirus B19 DNA byl detekován a kvantifikován pomocí sady *artus*[®] Parvo B19 RG PCR Kit se značeným CE-IVD na přístroji Rotor-Gene 3000. Analytická mez detekce sady

artus® Parvo B19 RG PCR Kit byla stanovena 0,2 IU/μl v eluátu (p = 0,05). To označuje, že s 95% pravděpodobností bude v eluátu detekováno 0,2 IU/μl.

Všechny vysoce pozitivní alikvoty byly detekovány pozitivní pomocí sady artus® Parvo B19 RG PCR Kit. Všechny negativní alikvoty, v šachovnicových cyklech i ve všech negativních cyklech, byly nereaktivní (Tabulka 7 ukazuje výsledky na pracovní stanici BioRobot EZ1 DSP). Tyto experimenty prokazují, že protokol EZ1 DSP Virus zajišťuje, že za těchto podmínek nedochází k žádnému přenosu mezi alikvoty.

Tabulka 7. Nastavení testu na křížovou kontaminaci a hodnoty C_T pro detekci DNA parvoviru B19 na pracovní stanici BioRobot EZ1 DSP

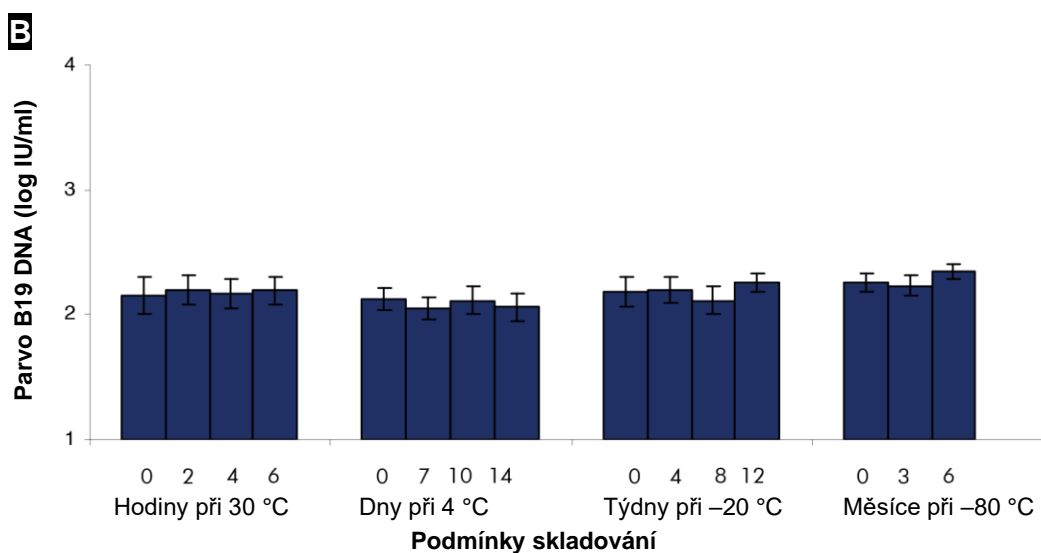
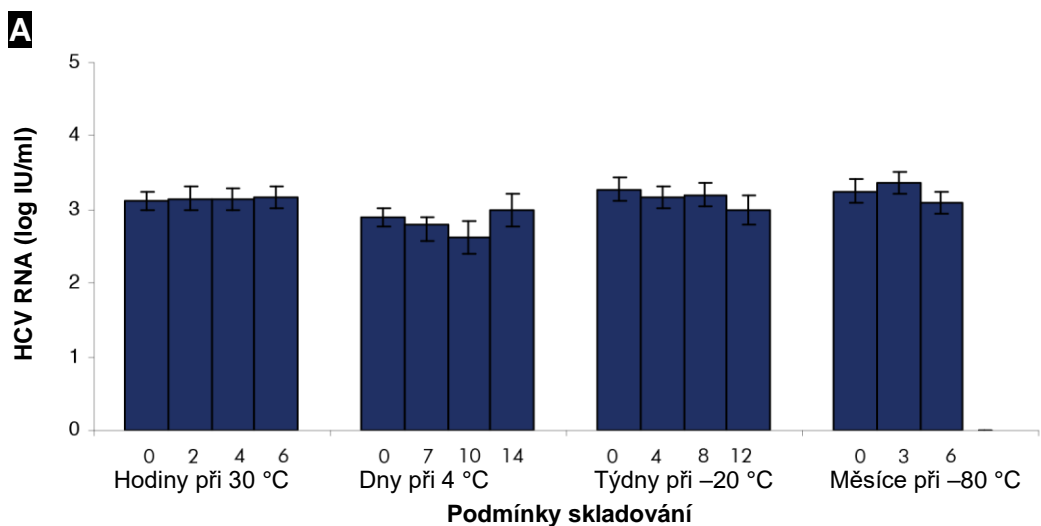
Cyklus	Pozice					
	1	2	3	4	5	6
1	15,47	X	15,41	X	15,36	X
2	X	15,48	X	15,53	X	15,32
3	X	X	X	X	X	X
4	15,35	X	15,2	X	15,27	X
5	X	15,21	X	15,13	X	15,43
6	X	X	X	X	X	X
7	15,62	X	15,48	X	15,23	X
8	X	15,31	X	15,83	X	15,62
9	X	X	X	X	X	X

Průměrná hodnota C_T všech alikvotů = 15,40 ±0,18 (CV = 1,14 %)

X: Po 45 cyklech PCR nereaguje.

Stabilita

Byla stanovena stabilita virové RNA a DNA v eluátech generovaných pomocí sady EZ1 DSP Virus Kit. Lidská EDTA plasma byla doplněna 1x10³ IU/ml standardních materiálů HCV AcroMetrix OptiQuant® HCV RNA a Parvo B19 VQC. Pro jeden časový bod testu a inkubační podmínku bylo zpracováno 18 replikátů pomocí systému EZ1 DSP Virus. Eluáty obsahující Parvo B19 DNA a HCV RNA byly inkubovány až 6 hodin při teplotě 30 °C, až 14 dní při teplotě 4 °C, až 12 týdnů při teplotě -20 °C a až 9 měsíců při teplotě -80 °C. Studie stále probíhá. Eluáty byly analyzovány s použitím validovaného interního postupu HCV RT-PCR a artus® Parvo B19 RG PCR. Jedno selhání u RT-PCR z 18 replikátů bylo pozorováno pro HCV RNA po uchování při teplotě 4 °C po dobu 14 dnů (Obrázek 4).



Obrázek 4. Stabilita virových nukleových kyselin. Byla stanovena stabilita virové RNA a DNA v eluátech generovaných pomocí sady EZ1 DSP Virus Kit pro **A** HCV RNA a **B** Parvo B19 DNA.

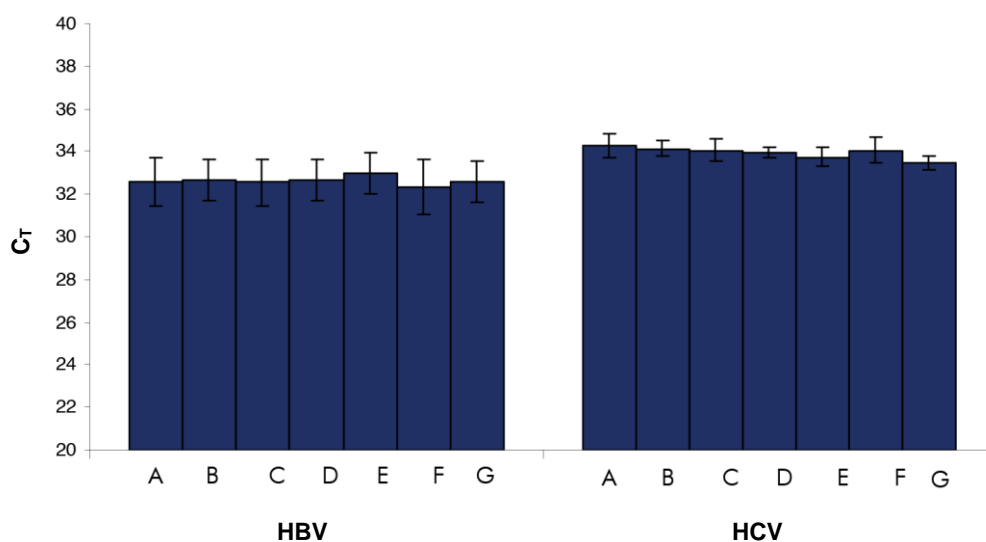
Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost byla stanovena pomocí 3 pracovních stanic BioRobot EZ1 DSP běžících ve 3 různých dnech (viz Tabulka 8, další strana). Pro každý test (A–G) bylo zpracováno 12 replikátů ve 2 cyklech na pracovní stanici BioRobot EZ1 DSP. Lidská EDTA plasma byla doplněna 1×10^4 IU/ml AcroMetrix OptiQuant HCV RNA a 1×10^3 IU/ml AcroMetrix OptiQuant HBV DNA. HBV DNA byla stanovena pomocí sady *artus*[®] HBV RG PCR Kit a HCV RNA byla stanovena pomocí validované interní analýzy HCV RT-PCR.

Automatizovaný postup je vysoce reprodukovatelný, což dokazují srovnatelné výsledky z purifikace virových nukleových kyselin na 3 různých pracovních stanicích BioRobot EZ1 DSP ve 3 různých dnech (Obrázek 5).

Tabulka 8. Nastavení testu reprodukovatelnosti

Nastavení testu	Den 1	Den 2	Den 3
BioRobot EZ1 DSP I	Test A	Test D	Test F
BioRobot EZ1 DSP II	Test B	Test E	
BioRobot EZ1 DSP III	Test C		Test G



Obrázek 5. Reprodukovatelnost. Reprodukovatelnost byla stanovena na třech různých pracovních stanicích BioRobot EZ1 DSP ve třech různých dnech.

Moč

Účinnost sady EZ1 DSP Virus Kit pro použití u alikvotů moči byla hodnocena porovnáním s plazmou za použití kvantifikovaných virových panelů CMV (DNA virus) a HCV (RNA virus) zředěných v příslušném materiálu alikvoty. Alikvoty moči a plazmy byly upraveny podle příručky EZ1 DSP Virus Kit a ekvivalentní objemy alikvotů byly extrahovány pomocí sady EZ1 DSP Virus Kit. Virové nukleové kyseliny byly detekovány použitím sady *artus*[®] CMV RG PCR a *artus*[®] HCV RG RT-PCR Kit. Hodnocení účinnosti sady EZ1 DSP Virus Kit srovnávající moč a plazmu ukázalo nesrovnalost jak u CMV, tak u HCV pouze cca 2 % (na základě hodnot C_T) (Tabulka 9).

Tabulka 9. Porovnání postupu EZ1 DSP Virus pro použití s alikvoty moči a plazmy

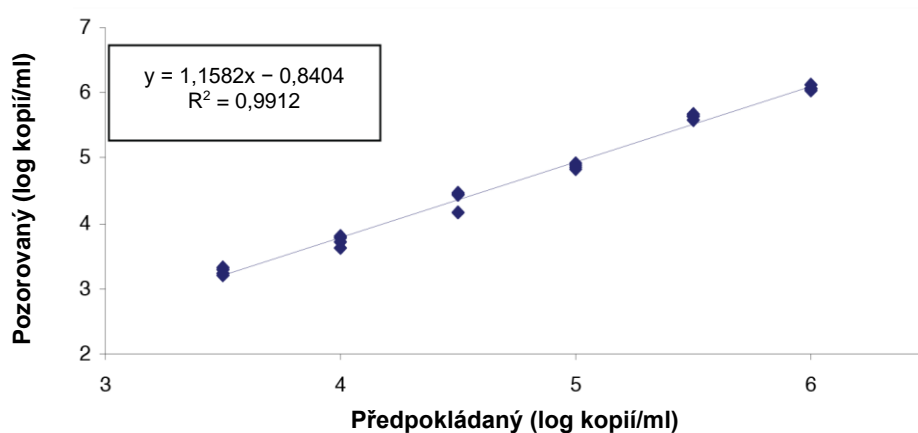
Typ vzorku	n	Hodnota CT	Poměr moč/plazma (hodnota CT)	Kopie/ml	Poměr moč/plazma (kopie/ml)
CMV					
Moč	4	31,60	0,98	6 250	1,51
Plazma	5	32,17		4 130	
HCV					
Moč	4	37,83	1,02	278	0,77
Plazma	5	37,25		363	

Plná krev

Lineární oblast kvantifikace

Lineární oblast kvantifikace pro sadu EZ1 DSP Virus Kit byla hodnocena pomocí EBV jako DNA viru. Testy byly provedeny s ředěními kvantifikovaných virových panelů vytvořených v EBV negativní lidské plné krvi. Testovány byly řady ředění se šesti různými virovými titry, přičemž v každém byly 4 replikáty. Virové nukleové kyseliny byly extrahovány z 200 µl plné krve (smícháno s 200 µl Bufferu ATL*) a eluovány v 60 µl elučního pufru (AVE). Lineární oblast kvantifikace postupu sady EZ1 DSP Virus Kit byla stanovena pro EBV s *artus*[®] EBV RG PCR na přístroji Rotor-Gene Q (Obrázek 6).

*QIAGEN GmbH, kat. č. 939016



Obrázek 6. Lineární oblast kvantifikace výtěžků při použití protokolu EZ1 DSP Virus v kombinaci s analýzou *artus*[®] EBV RG PCR pro extrakci EBV z plné krve.

Přesnost

Směrodatné odchylky a koeficienty variací (Coefficient of Variation, CV) pro plnou krev byly stanoveny pro CMV pomocí sady *artus*[®] CMV RG PCR Kit na přístroji Rotor-Gene Q. Údaje o přesnosti stanovení mezi zkouškami jsou uvedeny v Tabulka 10. Plná krev získaná od 13 dárců krve byla testována v 5 replikátech v samostatných cyklech na přístroji EZ1 Advanced XL. Virové nukleové kyseliny byly extrahovány z 200 µl plné krve (smícháno s 200 µl Bufferu ATL*) a eluovány v 120 µl elučního pufru (AVE).

*QIAGEN GmbH, kat. č. 939016

Tabulka 10. Přesnost stanovení mezi zkouškami u protokolu EZ1 DSP Virus v kombinaci s analýzou *artus*[®] CMV RG PCR Kit pro extrakci CMV z plné krve

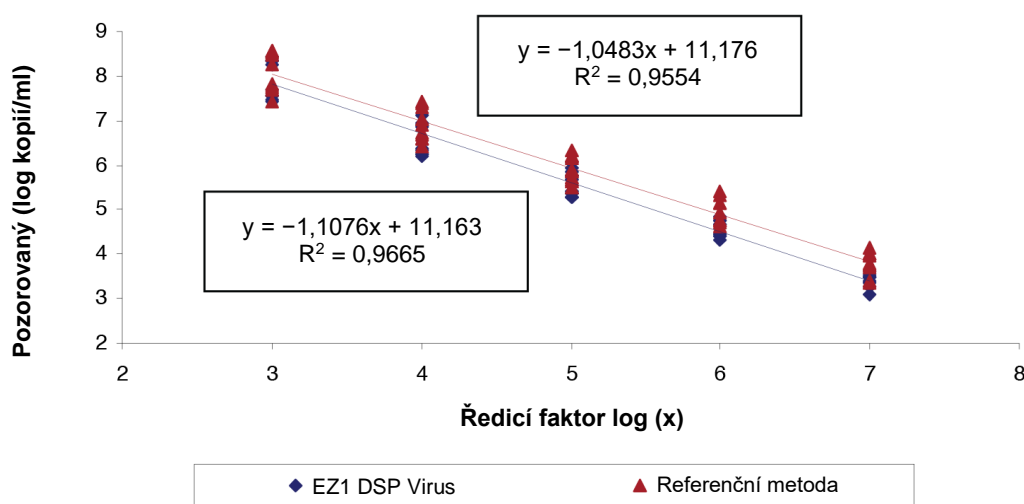
Dárce	Kopie/ml	CV (%)	log kopíí/ml	SD (log kopíí/ml)	
1	5	7 209	13	3,86	0,06
2	5	7 404	24	3,87	0,10
3	5	7 313	14	3,86	0,06
4	5	7 185	17	3,86	0,08
5	5	7 803	28	3,89	0,12
6	5	7 257	39	3,86	0,17
7	5	7 870	20	3,90	0,08
8	5	7 583	26	3,88	0,12
9	5	8 571	24	3,93	0,10
10	5	7 177	30	3,86	0,13
11	5	8 294	24	3,92	0,11
12	5	7 790	21	3,89	0,10
13	5	7 627	27	3,88	0,13

Stolice

Lineární oblast kvantifikace

Lineární oblast kvantifikace pro sadu EZ1 DSP Virus Kit byla hodnocena pomocí adenoviru 5 jako DNA viru. Testy byly provedeny se sériovým 10násobným ředěním supernatantu buněčné kultury ve stolici negativní na adenovir. Testovány byly řady ředění s pěti různými ředěními viru, přičemž v každém bylo 10 replikátů. Virové nukleové kyseliny byly extrahovány z 200 µl alikvotů (resuspendovaných 1 : 10 v Bufferu ASL*) a eluovány ve 120 µl elučního pufru (AVE). Lineární oblast kvantifikace postupu EZ1 DSP Virus byla stanovena v kombinaci s analýzou Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, Francie, ref. 96-010B) na přístroji Rotor-Gene Q ve srovnání s referenční metodou extrakce (Obrázek 7).

*QIAGEN GmbH, kat. č. 19082



Obrázek 7. Lineární oblast kvantifikace výtěžků při použití protokolu EZ1 DSP Virus v kombinaci s analýzou Adenovirus R-Gene™ PCR pro extrakci adenoviru 5 ze stolice.

Přesnost

Směrodatné odchylky a koeficienty variací (Coefficient of Variation, CV) pro stolici byly stanoveny pro adenovirus 5 pomocí analýzy Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, Francie, ref. 96-010B) na přístroji Rotor-Gene Q. Stolica negativní na adenovirus byla doplněna supernatantem buněčné kultury adenoviru 5 a virová DNA byla extrahována z 200µl alikvotů (resuspenze 1 : 10 v Bufferu ASL*) a eluována ve 120 µl elučního pufru (AVE). Ve třech dnech bylo provedeno sedm cyklů EZ1, každý s 9 nebo 10 replikátů, s použitím třech přístrojů EZ1 Advanced XL a se třemi kombinacemi šarží EZ1 DSP Virus Kit/Buffer ASL. Všechny alikvoty byly analyzovány ve stejném cyklu PCR. Údaje o přesnosti (Tabulka 11) byly vypočteny s ohledem na výsledky různých přístrojů, dnů, šarží a všech cyklů EZ1 dohromady (celkem).

*QIAGEN GmbH, kat. č. 19082

Tabulka 11. Přesnost protokolu EZ1 DSP Virus v kombinaci s analýzou Adenovirus R-Gene™ PCR pro extrakci adenoviru 5 ze stolice

Cyklus	n	Kop/ml	Log kop/ml	SD (log kop/ml)	Stanovení v rámci zkoušky	CV c/ml (%)			Celkem
						3 Adv. XL	3 dny	3 šarže	
1	9	3 530	3,46	0,22	48	80	59	47	66
2	9	2 955	3,42	0,19	38	–	–	–	–
3	9	2 226	3,26	0,35	43	–	–	–	–
4	9	2 385	3,35	0,23	54	–	–	–	–
5	9	604	2,69	0,24	54	–	–	–	–
6	9	1 214	3,06	0,21	53	–	–	–	–
7	10	1 702	3,19	0,26	48	–	–	–	–

Korelační studie

Byla provedena korelační studie pro postup EZ1 DSP Virus ve srovnání s referenční metodou pro extrakci norovirové genoskupiny II ze 66 alikvotů stolice od pacientů. Virové nukleové kyseliny byly extrahovány z 200 µl alikvotů (resuspendovaných 1 : 10 v Bufferu ASL*) a eluovány ve 120 µl elučního pufru (AVE). Stanovení bylo provedeno interní analýzou RT PCR proti norovirové genoskupině II (Tabulka 12).

*QIAGEN GmbH, kat. č. 19082

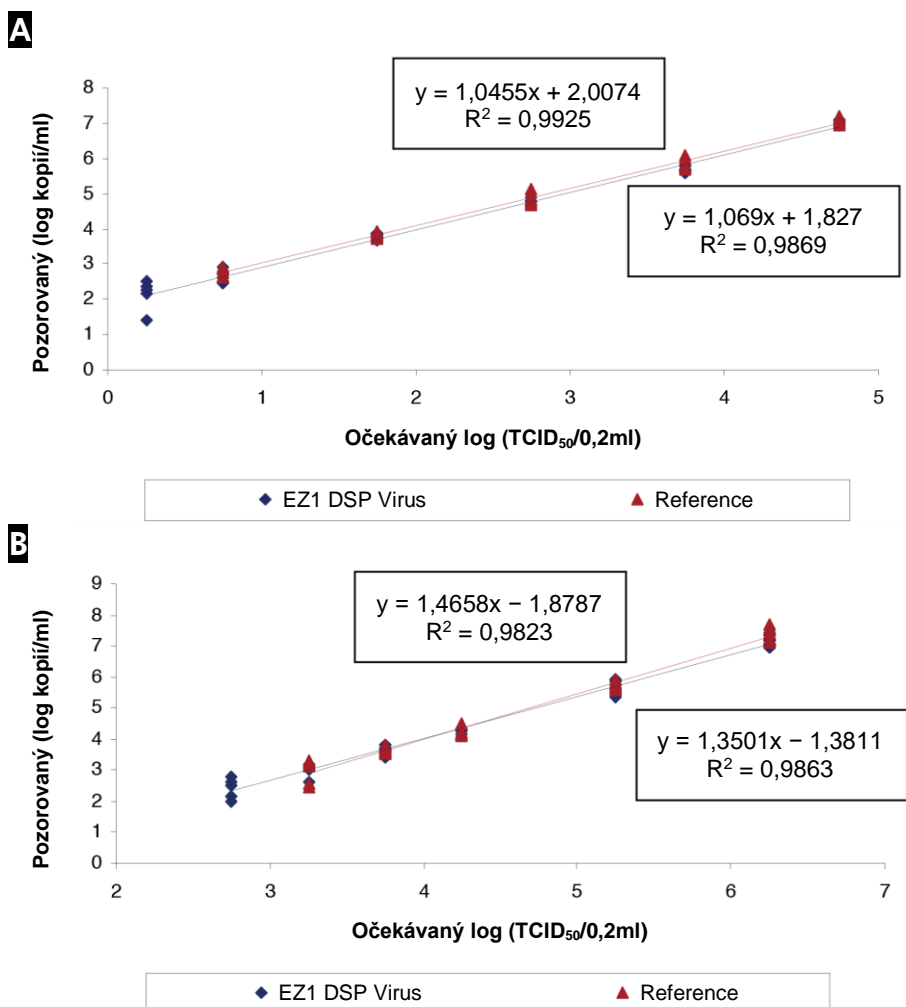
Tabulka 12. Korelace postupu EZ1 DSP Virus s referenční metodou

EZ1 DSP Virus		Reference		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
	Pozitivní	34	15	49
	Negativní	1	16	17
	Celkem	35	31	66

Přepavní médium

Lineární oblast kvantifikace

Lineární oblast kvantifikace pro sadu EZ1 DSP Virus Kit byla hodnocena extrakcí HSV-1 a *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) z média PreservCyt® (Cytoc Corporation, ref. 0200011). Testy byly provedeny s ředěními kvantifikovaných virových panelů vytvořených v přepravním médiu. Testovány byly řady ředění se šesti různými virovými titry, v každém bylo 5 nebo 6 replikátů. Lineární oblast kvantifikace pro sadu EZ1 DSP Virus Kit byla stanovena ve srovnání s referenční metodou s analýzou *artus*® HSV1/2 TM PCR a *artus*® *C. trachomatis* TM PCR (Obrázek 8). Virové nukleové kyseliny byly extrahovány z 200 µl alikvotů a eluovány v 90 µl elučního pufru (AVE).



Obrázek 8. Lineární oblast kvantifikace výtěžků při použití protokolu EZ1 DSP Virus v kombinaci s analýzou *artus*® *C. trachomatis* PCR (A) a *artus*® HSV1/2 TM PCR (B) pro extrakci HSV-1 a *C. trachomatis* z přepravního média. Studie byla provedena ve srovnání s referenční metodou.

Přesnost

Směrodatné odchylky a koeficienty variací (Coefficient of Variation, CV) pro přepravní médium byly stanoveny na HSV-1 a *C. trachomatis* pomocí analýzy *artus*[®] HSV1/2 TM PCR a *artus*[®] *C. trachomatis* TM PCR. Virová a bakteriální DNA byla extrahována ze 400 µl média a eluována v 60 µl elučního pufru (AVE). Pět přepravních médií bylo extrahováno ve 12 replikátech, každý v šesti cyklech EZ1, ve třech dnech a se třemi šaržemi sady EZ1 DSP Virus Kit. Všechny alikvoty byly analyzovány ve stejném cyklu PCR. Střední přesnost pro *C. trachomatis* (Tabulka 13) a HSV-1 (Tabulka 14) byla vypočtena s ohledem na všechny replikáty jednotlivých přepravních médií (různé cykly EZ1, dny a šarže).

Tabulka 13. Přesnost protokolu EZ1 DSP Virus v kombinaci se sadou *artus*[®] *C. trachomatis* RG PCR Kit pro extrakci *C. trachomatis* z přepravního média

Médium	n	Nominální log TCID ₅₀ / 0,2 ml	Pozorované kop/ml	Střední přesnost CV kop/ ml (%)	Pozorovaný log kop/ml	SD (log kop/ml)
¹ QIAGEN STM	12	3,75	61 623	10	4,79	0,05
² Remel M4RT [®]	12	3,75	79 630	10	4,90	0,05
³ PreservCyt [®]	12	3,75	54 749	9	4,74	0,04
⁴ BD Surepath [®]	12	3,75	56 312	18	4,74	0,08
⁵ Copan UTM	12	3,75	76 099	9	4,88	0,04

¹ QIAGEN GmbH, kat. č. 5123-1220; ² Thermo Fisher Scientific Group, ref. R12505; ³ Cytoc Corp., ref. 0200011; ⁴ Becton, Dickinson and Company, ref. GYN-0001-V; ⁵ Copan Diagnostics Inc., kat. č. 330C

Tabulka 14. Přesnost protokolu EZ1 DSP Virus v kombinaci se sadou artus® HSV1/2 RG PCR Kit pro extrakci HSV-1 z přepravního média

Médium	n	Nominální log TCID₅₀/ 0,2 ml	Pozorované kop/ml	Střední přesnost CV kop/ml (%)	Pozorovaný log kop/ml	SD (log kop/ml)
¹ QIAGEN STM	12	4,25	16 615	47	4,17	0,21
² Remel M4RT®	12	4,25	17 433	38	4,21	0,20
³ PreservCyt®	12	4,25	13 494	41	4,09	0,19
⁴ BD Surepath®	12	4,25	17 013	58	4,16	0,28
⁵ Copan UTM	12	4,25	15 999	39	4,17	0,18

¹ QIAGEN GmbH, kat. č. 5123-1220; ² Thermo Fisher Scientific Group, ref. R12505; ³ Cytoc Corp., ref. 0200011; ⁴ Becton, Dickinson and Company, ref. GYN-0001-V; ⁵ Copan Diagnostics Inc., kat. č. 330C

Klinická účinnost (HPV)

Alikvoty DNA purifikované z celkem 108 alikvotů, zahrnujících 50 HC2 pozitivních alikvotů odebraných v STM, 50 HC2 pozitivních alikvotů odebraných v PreservCyt® a 8 HC2 negativních alikvotů v STM, byly testovány pomocí *digene*® HPV Genotyping RH Test (kat. č. 613413) a *digene*® HPV Genotyping LQ Test (kat. č. 613215) ve srovnání se systémem Free University RLB*.

Výsledky byly hodnoceny buď jako identické (100 % odpovídajících genotypů), kompatibilní (alespoň jeden společný genotyp) nebo neshodné (žádné odpovídající genotypy). Rozdíly (výsledky neshodných genotypů) byly vyřešeny opakováním obou analýz a v případě zbývajících nesrovnalostí následnou analýzou pomocí třetí citlivé analýzy s detekcí HPV a genotypizací [SPF10-LiPA25 (verze 1)].

Výsledky ukázaly velmi nízkou hladinu neshodných alikvotů (2 %) po vyřešení počátečních neshodných alikvotů pro obě analýzy s genotypizací ve srovnání s referenční metodou (Tabulka 15).

Tabulka 15. Porovnání testů HPV Genotyping RH (A) a digene HPV Genotyping LQ se systémem Free University RLB* pomocí postupu EZ1 DSP Virus pro extrakci HPV z přepravního média

	A	B
Typ výsledku	% klinického alikvotu	% klinického alikvotu
Identické	80	58
Kompatibilní	18	12
Neshodné	2	2

* van den Brule, A. J., Pol R., Fransen-Daalmeije, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J., and Snijders, P. J. (2002) GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. J Clin Microbiol 40, 779.

Klinická účinnost (Influenza A)

K prokázání klinické účinnosti bylo vyhodnoceno 102 charakterizovaných vzorků nasofaryngeálních stěrů odebraných v UTM (Copan Diagnostics Inc., kat. č. 330C) pomocí sady EZ1 DSP Virus Kit pro extrakci nukleových kyselin. Influenza A RNA byla detekována pomocí sady *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR Kit a testu Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR, schváleným EUA (Tabulka 16).

Tabulka 16. Porovnání sady *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR Kit s testem Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR, schváleným EUA, pomocí sady EZ1 DSP Virus Kit pro extrakci viru sezónní chřipky Influenza A a viru 2009 H1N1 Influenza z nasofaryngeálních tampónů

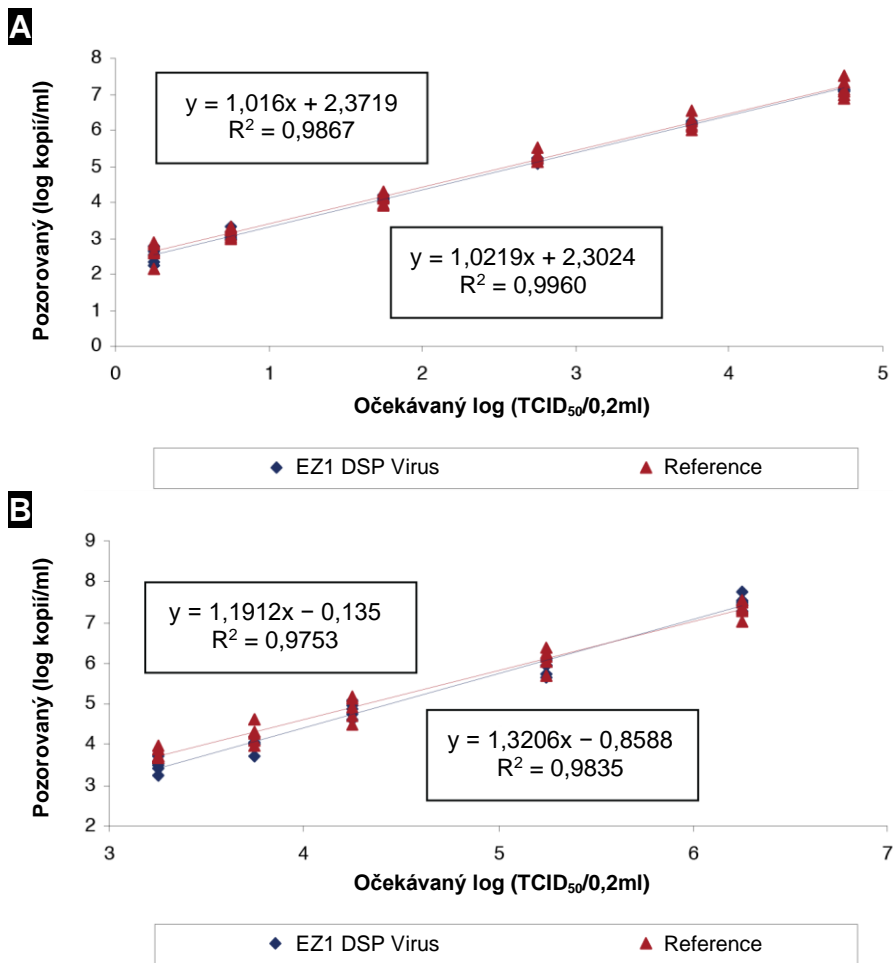
		Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR			
		Sezónní Infl. A pozitivní	2009 H1N1 pozitivní	Negativní	Celkem
<i>artus</i> [®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR	Sezónní Infl. A pozitivní	5	0	2	7
	2009 H1N1 pozitivní	0	27	1	28
	Negativní	0	0	67	67
	Celkem	5	27	70	102

Suché stěry

Lineární oblast kvantifikace

Lineární oblast kvantifikace pro sadu EZ1 DSP Virus Kit byla hodnocena extrakcí HSV-1 a *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) z vatových tampónů Puritan Cotton Swabs (ref. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC). Testy byly prováděny s ředěními kvantifikovaného standardního materiálu. Lidské negativní sliny byly doplněny patogenním materiálem a přeneseny do tampónu. Po dehydrataci byly patogeny ze suchého tampónu znovu izolovány resuspendováním v 600 µl Bufferu ATL*. Testovány byly řady ředění se šesti různými virovými titry, v každém bylo 5 nebo 6 replikátů. Lineární oblast kvantifikace pro sadu EZ1 DSP Virus Kit byla stanovena ve srovnání s referenční metodou s analýzou *artus*[®] HSV1/2 TM PCR a *artus*[®] C. trachomatis TM PCR (Obrázek 9). Virové nukleové kyseliny byly extrahovány ze 400 µl alikvotů a eluovány v 150 µl elučního pufru (AVE).

*QIAGEN GmbH, kat. č. 939016



Obrázek 9. Lineární oblast kvantifikace výtěžků při použití protokolu EZ1 DSP Virus v kombinaci s analýzou *artus*[®] C. trachomatis PCR (A) a *artus*[®] HSV1/2 TM TM PCR (B) pro extrakci C. trachomatis a HSV-1 z vysušených vatových tampónů. Studie byla provedena ve srovnání s referenční metodou.

Přesnost

Směrodatné odchylky a koeficienty variací (Coefficient of Variation, CV) pro suché stěry byly stanoveny na HSV-1 a C. trachomatis pomocí analýzy *artus*[®] HSV1/2 TM PCR a *artus*[®] C. trachomatis TM PCR. Tampóny Copan Flocked Swabs (kat. č. 502CS0, Copan Italia S.p.A) a vatové tampony Puritan Cotton Swabs (ref. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC) – suché stěry byly připraveny a upraveny předem tak, jak je popsáno výše, a virová nebo bakteriální DNA byla extrahována z alikvoty o objemu 400 µl a eluována v 60 µl elučního pufru (AVE). Extrakce byla provedena se třemi dárci slin v 8 nebo 9 replikátech, v šesti cyklech EZ1, ve třech dnech a se třemi kombinacemi šarží EZ1 DSP Virus Kit / Buffer ATL. Všechny alikvoty byly analyzovány ve stejném cyklu PCR. Střední přesnost pro C. trachomatis (Tabulka 17) a HSV-1 (Tabulka 18) byla vypočtena s ohledem na všechny replikáty každého dárce a typ stěru (různé cykly EZ1, dny a šarže).

Tabulka 17. Přesnost protokolu EZ1 DSP Virus v kombinaci se sadou *artus*[®] C. trachomatis RG PCR Kit pro extrakci C. trachomatis ze suchých stěrů

Typ stěru	Dárce	n	Nominální log		Střední přesnost		SD (log kopií/ml)
			TCID ₅₀ /0,2 ml	Pozorované kop/ml	CV kop/ml (%)	Pozorovaný log kop/ml	
Puritan Cotton Swabs	1	9	1,75	16 782	28	4,22	0,12
	2	9	1,75	15 896	23	4,20	0,09
	3	9	1,75	16 111	12	4,21	0,05
Copan Flocked Swabs	1	9	1,75	26 486	19	4,42	0,09
	2	9	1,75	30 356	17	4,48	0,08
	3	9	1,75	19 926	18	4,30	0,08

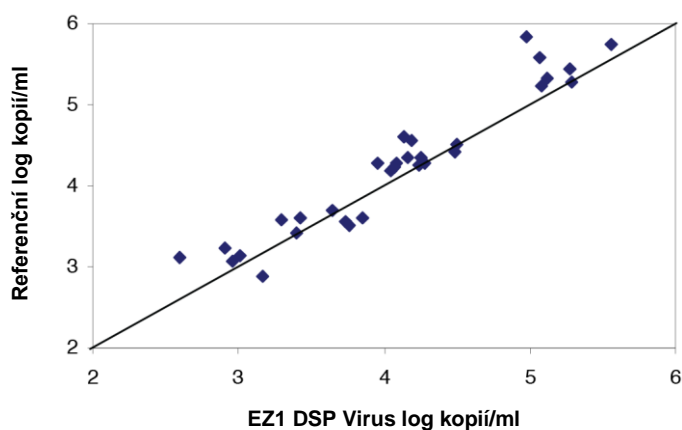
Tabulka 18. Přesnost protokolu EZ1 DSP Virus v kombinaci se sadou *artus*[®] HSV1/2 RG PCR Kit pro extrakci HSV-1 ze suchých stěrů

Typ stěru	Dárce	n	Nominální log		Střední přesnost		SD (log kopií/ml)
			TCID ₅₀ /0,2 ml	Pozorované kop/ml	CV kop/ml (%)	Pozorovaný log kop/ml	
Puritan Cotton Swabs	1	9	3,75	5 843	52	3,77	0,22
	2	8	3,75	13 295	62	4,12	0,20
	3	8	3,75	10 272	40	4,01	0,16
Copan Flocked Swabs	1	8	3,75	6 215	30	3,79	0,13
	2	9	3,75	10 773	24	4,03	0,11
	3	9	3,75	10 336	24	4,01	0,11

Respirační alikvoty (sputum)

Korelační studie

Byla provedena korelační studie pro EZ1 DSP Virus pro extrakci *Mycobacterium tuberculosis* z negativního lidského sputa. Řada ředění se 4 různými titry viru byla testována v jednotlivých replikátech ve srovnání s referenční metodou. Bakteriální DNA byla extrahována z 200 μ l sputa, předem ošetřena činidlem Sputasol (Oxoid Limited, ref. SR0233) a lysozymem (Sigma-Aldrich, kat. č. L6876), jak je popsáno v příručce EZ1 DSP Virus, verze 4, a eluována v 90 μ l elučního pufru (AVE). Stanovení bylo provedeno pomocí analýzy *artus*[®] *M. tuberculosis* RG PCR (Obrázek 10).



Obrázek 10. Korelace postupu EZ1 DSP Virus s referenční metodou.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo uživatelské příručce. Příručky a uživatelské návody sady QIAGEN jsou k dispozici na stránkách www.qiagen.com, případně si je lze vyžádat u Technických služeb společnosti QIAGEN nebo u místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, *artus*®, EZ1®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM® (Applied Biosystems); COBAS®, AMPLICOR® (Roche Molecular Systems, Inc., licencováno pro společnost Roche Diagnostic Systems, Inc.); LightCycler® (Roche); MONITOR® (Roche Group); OptiQuant® (AcroMetrix Corporation); Adenovirus R-Gene™ (Argene, Inc.); Remel M4RT® (Thermo Fisher Scientific Group); PreservCyt® (Cytoc Corp.); Surepath® (Becton, Dickinson and Company)

Únor 2011 © 2011 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

www.qiagen.com

Australia = 1-800-243-800

Austria = 0800/281010

Belgium = 0800-79612

Canada = 800-572-9613

China = 021-51345678

Denmark = 80-885945

Finland = 0800-914416

France = 01-60-920-930

Germany = 02103-29-12000

Hong Kong = 800 933 965

Ireland = 1800 555 049

Italy = 800-787980

Japan = 03-5547-0811

Korea (South) = 1544 7145

Luxembourg = 8002 2076

The Netherlands = 0800 0229592

Norway = 800-18859

Singapore = 65-67775366

Spain = 91-630-7050

Sweden = 020-790282

Switzerland = 055-254-22-11

UK = 01293-422-911

USA = 800-426-8157



Sample & Assay Technologies