

EZ1[®] DSP Virus Kit

EZ1 DSP Virus Kit sistem performansı; plazma, serum, CSF, idrar, tam kan, dışkı, taşıma besi yerleri, kurutulmuş sürüntüler ve solunum örnekleri kullanılarak yapılan, viral nükleik asitlerin ve bakteriyel DNA'nın izolasyonuna yönelik performans değerlendirme çalışmaları ile ortaya konmuştur. Testler, EZ1 DSP Virus El Kitabının mevcut sürümü olan Sürüm 4'te açıklanan protokoller uyarınca gerçekleştirilmiştir.

Bununla birlikte kit performansı, her bir virüs veya bakteri türü için garanti edilmemektedir ve kullanıcı tarafından doğrulanması gerekir. Laboratuvarında QIAGEN performans değerlendirme çalışmalarının kapsamında olmadan kullanılan herhangi bir işlem için sistem performansını doğrulamak kullanıcının sorumluluğundadır.

Performans Özellikleri

Serum ve plazma

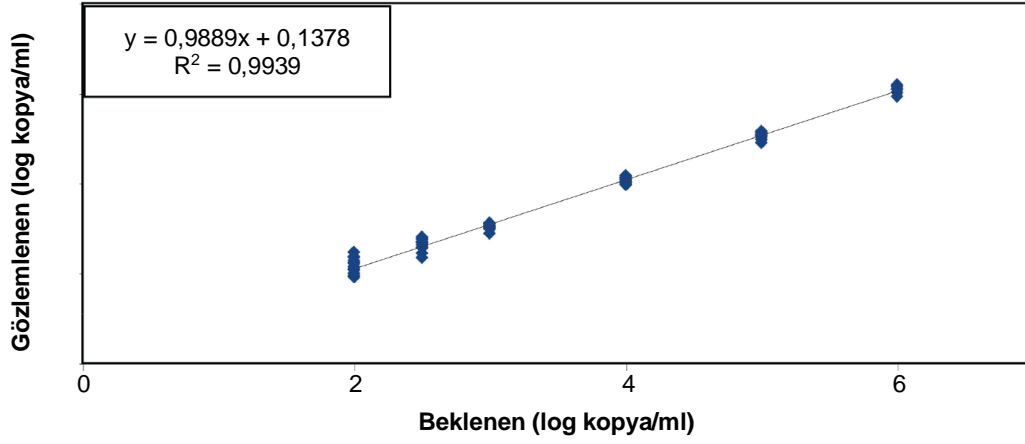
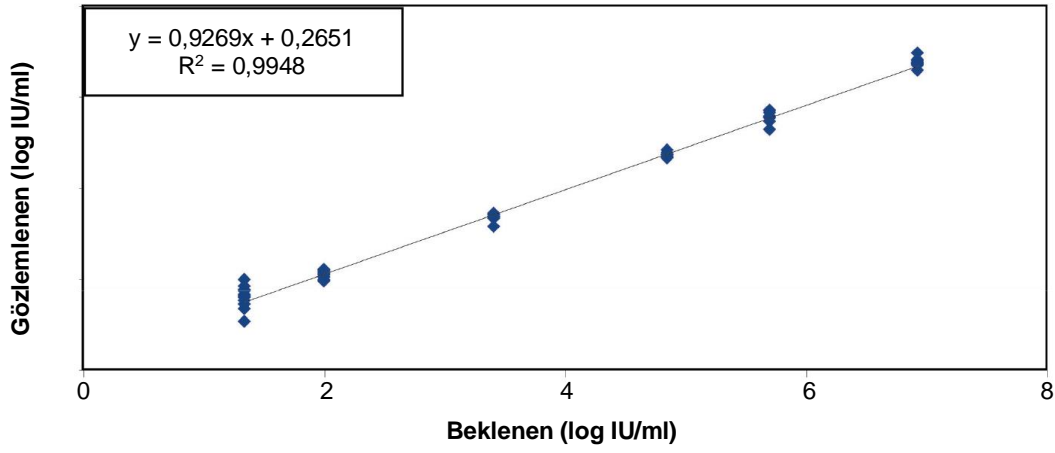
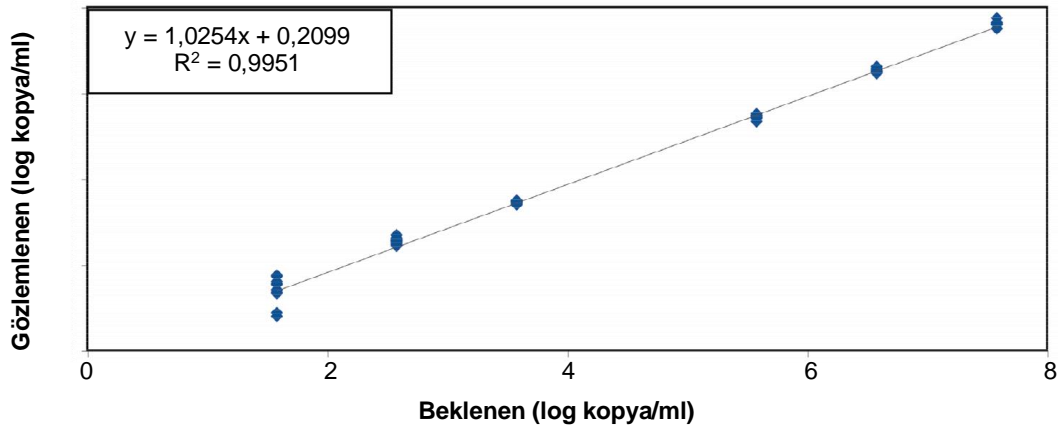
Doğrusal aralık

EZ1 DSP Virus Kit için doğrusal aralık, HCV ve HIV-1 RNA virüslerinin yanı sıra HBV DNA virüsüne yönelik olarak değerlendirilmiştir. Testler, HBV, HCV ve HIV-1 negatif insan plazması veya serumu içinde hazırlanan, miktarı belirlenmiş virüs panellerinin seyreltileriyle gerçekleştirilmiştir. Altı farklı virüs titresine sahip seyrelti serisinde her bir öge 12 replikat ile test edilmiştir. EZ1 DSP Virus Kit prosedürünün doğrusal aralığı HBV, HCV ve HIV-1 için Abbott RealTime viral yük tahlilleriyle belirlenmiştir (Tablo 1, Şekil 1). RealTime Dahili Kontrolleri (her biri 17 µl), her bir HIV-1 veya HCV örneğine ekstraksiyon öncesinde doğrudan eklenmiştir. RealTime HBV'ye yönelik olarak her bir örnek için 3,4 µl RealTime Dahili Kontrol, taşıyıcı RNA ile birleştirilmiştir. 400 µl'lik örneklerden viral nükleik asitler ekstrakte edilmiş ve 90 µl'lik elüsyon tamponunda (AVE) elüsyona tabi tutulmuştur. PCR, Abbott m2000rt üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. EZ1 DSP Virus protokolü ile verimlerin doğrusal aralığının belirlenmesi için kullanılan örnek kaynağı ve aşağı akışlı tahliller

Virüs	Kaynak	Aşağı akışlı tahlil	Kullanılan tahlil kılavuzu
HIV-1	BBI (Boston Biomedica, Inc., Boston, ABD) defektif HIV, BBI rekalsifiye plazma	Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HIV-1
HCV	ProMedDx (ProMedDx LLC Norton, MA, ABD) hasta örneği, havuzlanmış normal insan serumu	Abbott RealTime HCV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HCV
HBV	Teragenix (Teragenix Coporate, Ft. Lauderdale, FL, ABD) hasta örneği, rekalsifiye insan plazması	Abbott RealTime HBV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HBV



A**B****C**

Şekil 1. EZ1 DSP Virus protokolü kullanılan verimlerin doğrusal aralığı. EZ1 DSP Virus protokolünün doğrusal aralığı viral seyrelti serisi ve Abbott RealTime tahlillerinden (Tablo 1) HIV-1 için **A**, HCV için **B**, HBV için ise **C** kullanılarak belirlenmiştir.

Kesinlik

Standart sapmalar ve varyasyon katsayıları (Coefficients of Variations, CV'ler), uygun aşağı akışlı tahlillerin doğrusal aralığındaki HIV-1, HCV ve HBV seyrelti serisi için belirlenmiştir. Kesinlik analizi için doğrusal aralığın belirlenmesinde kullanılanlarla aynı aşağı akışlı tahliller kullanılmıştır (Tablo 1). Tahliller arası kesinlik verileri Tablo 2 ile 4 arasında gösterilmektedir. Her bir panel üyesi için, BioRobot EZ1 DSP üzerindeki 12 ayrı çalışmada 12 replikat ekstrakte edilmiştir. PCR, Abbott m2000rt üzerinde her biri 6 replikat kullanılan 2 çalışma halinde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2. Abbott RealTime HIV-1 tahlili kullanıldığında EZ1 DSP Virus protokolünün tahliller arası kesinliği

Panel üyesi	n	Kopya/ml	CV (%)	Log kopya/ml	SD (log kopya/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

Tablo 3. Abbott RealTime HCV tahlili kullanıldığında EZ1 DSP Virus protokolünün tahliller arası kesinliği

Panel üyesi	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

Tablo 4. Abbott RealTime HBV tahlili kullanıldığında EZ1 DSP Virus protokolünün tahliller arası kesinliği

Panel üyesi	n	Kopya/ml	CV (%)	Log kopya/ml	SD (log kopya/ml)
1	12	22	60	1,34	0,34
2	12	357	16	2,55	0,07
3	12	2835	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

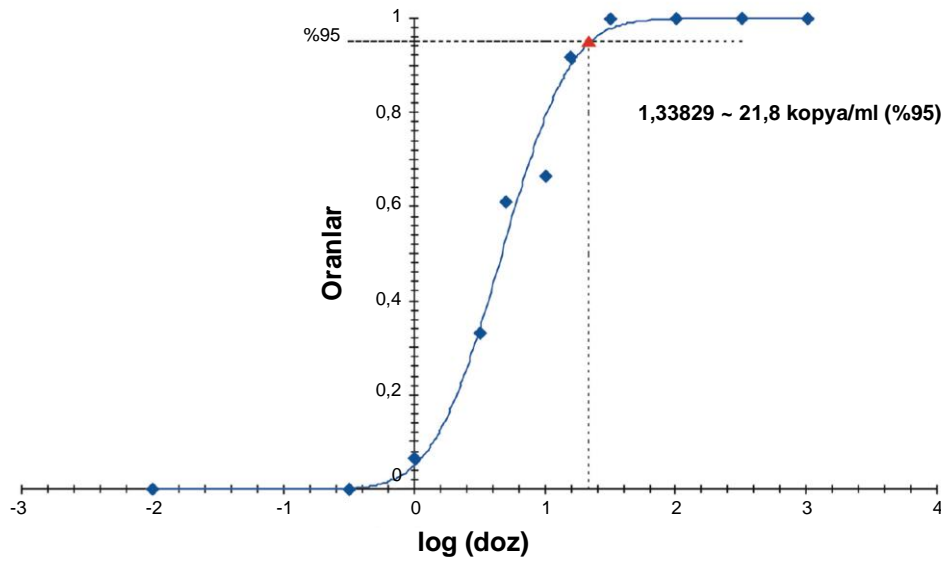
Saptama limiti

Saptama limiti EZ1 DSP Virus sistemi için %95 probit değerine göre HIV-1 WHO uluslararası virüs standardı 97/656, HBV WHO uluslararası virüs standardı 97/746 ve miktarı belirlenmiş CMV hücre kültürü üst fazı kullanılarak belirlenmiştir. Saptama limitinin belirlenmesi, uygun virüslerin seyrelti serisinin işlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Virüsler HIV, HBV ve CMV negatif normal insan EDTA plazma havuzunda seyreltilmiştir. Her bir seyreltme adımı, seyreltme başına en az 6 replikat içeren en az 3 bağımsız çalışma halinde hazırlanmıştır. BioRobot EZ1 DSP üzerinde, 60 µl'de elüsyon ile birlikte örnek hazırlığı için 400 µl plazma kullanılmıştır.

HBV DNA saptaması için *artus*[®] HBV PCR Kit'ler, CMV DNA saptaması için ise *artus*[®] CMV PCR Kit'ler kullanılmıştır. Örnekler bir LightCycler[®] 1.2 Instrument (Roche), bir Rotor-Gene[®] 3000 (Corbett Research) ve bir ABI PRISM[®] 7000 SDS (Applied Biosystems) üzerinde analiz edilmiştir. COBAS Amplicor Analyzer ile HIV RNA saptaması için COBAS[®] Amplicor[®] HIV-1Monitor[®] Test (sürüm 1.5) kullanılmıştır. Tüm örnekler için toplu veriler probit analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler Tablo 5 ve 6'da sunulmaktadır, bunları temsil eden probit grafikleri ise Şekil 2 ve 3'te mevcuttur.

Tablo 5. EZ1 DSP Virus sistemi ve *artus*[®] PCR Kit'ler kullanıldığında HBV ve CMV DNA saptama limiti

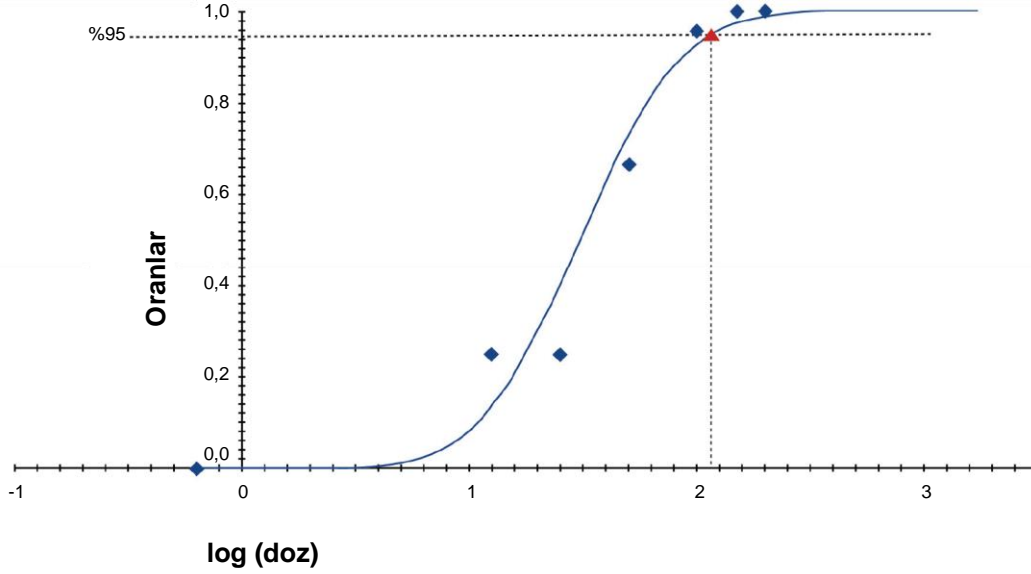
Virüs	Girdi titresi	Belirlemeler (LightCycler)	Belirlemeler (Rotor-Gene)	Belirlemeler (ABI PRISM)
HBV	%95 probit değeri (IU/ml)	45,7	14,4	13,2
	Güven aralığı (IU/ml)	28-102	9,5-26,5	9,0-23,1
CMV	%95 probit değeri (kopya/ml)	67,2	21,8	38,3
	Güven aralığı (kopya/ml)	41,8-142	14,5-44,1	21,5-89,8



Şekil 2. EZ1 DSP Virus sistemi ve *artus*[®] CMV RG PCR Kit kullanıldığında CMV DNA saptaması için probit analizi. Viral nükleik asitler EZ1 DSP Virus sistemi kullanılarak saflaştırılmış ve Rotor-Gene 3000 üzerinde CMV DNA saptaması için *artus*[®] CMV PCR RG Kit kullanılmıştır. %95 probit değeri 21,8 kopya/ml olmuştur.

Tablo 6. EZ1 DSP Virus sistemi ve COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Test, sürüm 1.5 kullanıldığında HIV RNA saptama limiti

Girdi titresi (IU/ml)	Belirlemeler
%95 probit değeri (IU/ml)	114,5
Güven aralığı (IU/ml)	82,9-194,3



Şekil 3. EZ1 DSP Virus sistemi ve COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Test, Sürüm 1.5 kullanıldığında HIV RNA saptaması için probit analizi. Viral nükleik asitler EZ1 DSP Virus sistemi kullanılarak 400 µl örnek girdisi ve 60 µl elüsyon ile saflaştırılmıştır. COBAS Amplicor Analyzer üzerinde, ultra hassas modda HIV RNA saptaması için COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Test kullanılmıştır. %95 probit değeri 114,5 IU/ml olmuştur.

Örnek taşınmasını hariç bırakma

EZ1 DSP Virus prosedürleri esnasında ve arasında çapraz kontaminasyon olayları riskinin değerlendirilmesi için BioRobot EZ1 DSP, EZ1 Advanced ve EZ1 Advanced XL cihazlarının her birinde dokuz çalışma yapılmıştır. Testler miktarı belirlenmiş bir parvovirüs B19 hasta örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taşıma testleri için kullanılan pozitif örneklerin viral yükü 1,0x10⁸ IU/ml olmuştur. Pozitif örneklerin seyreltilmesi için ve negatif kontrol örnekleri olarak bir insan parvovirüs B19 negatif EDTA plazma havuzu kullanılmıştır.

Örnekten örneğe taşınmanın saptanması için her bir cihazda negatif ve yüksek düzeyde pozitif örneklerden oluşan, değişen bir dama tahtası kurulumuyla 2 çalışma gerçekleştirilmiştir. Her üçüncü çalışma, muhtemel çalışmadan çalışmaya taşınmanın takibi için tamamen negatif örnekler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu örnek kurulumu üç defa tekrarlanmış ve sonuç olarak her bir cihaz için toplam dokuz çalışma olmuştur. Parvovirüs B19 DNA, Rotor-Gene 3000 üzerinde

CE-IVD işaretli *artus*[®] Parvo B19 RG PCR Kit kullanılarak saptanmış ve ölçülmüştür. *artus*[®] Parvo B19 RG PCR Kit'in analitik saptama limiti elüatta 0,2 IU/μl olarak belirlenmiştir (p = 0,05). Bu elüatta 0,2 IU/μl saptanması olasılığının %95 olduğu anlamına gelir.

Yüksek düzeyde pozitif örneklerin tamamı *artus*[®] Parvo B19 RG PCR Kit ile pozitif olarak saptanmıştır. Dama tahtası çalışmaları ve tamamen negatif olan çalışmalarda tüm negatif örnekler tepkisiz kalmıştır (Tablo 7, BioRobot EZ1 DSP üzerindeki sonuçları göstermektedir). Bu deneyler EZ1 DSP Virus protokolünün söz konusu koşullar altında örnek taşınmasına yol açmadığını göstermektedir.

Tablo 7. BioRobot EZ1 DSP kullanıldığında parvovirüs B19 DNA saptaması için çapraz kontaminasyon test kurulumu ve C_T değerleri

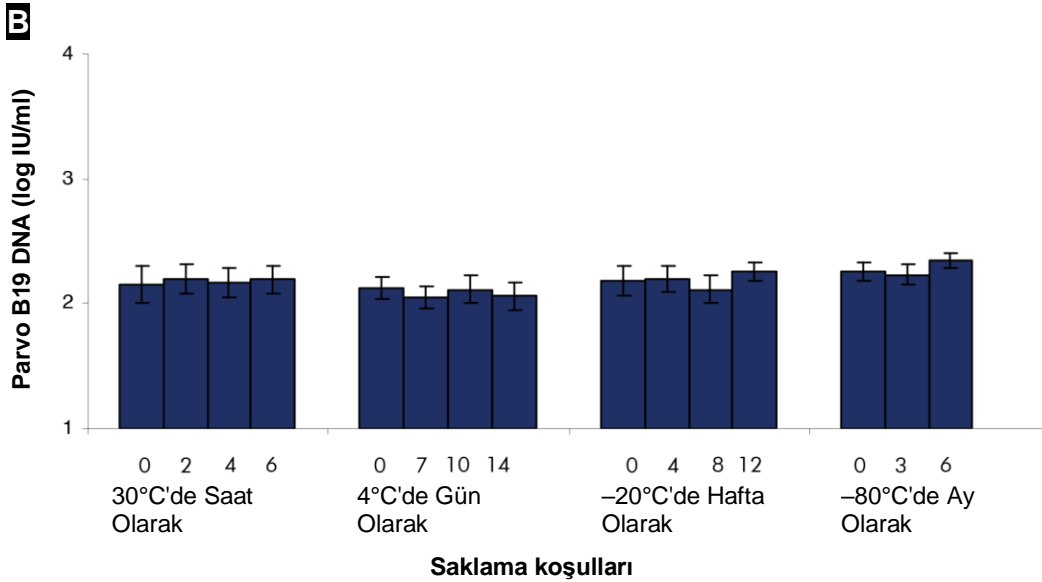
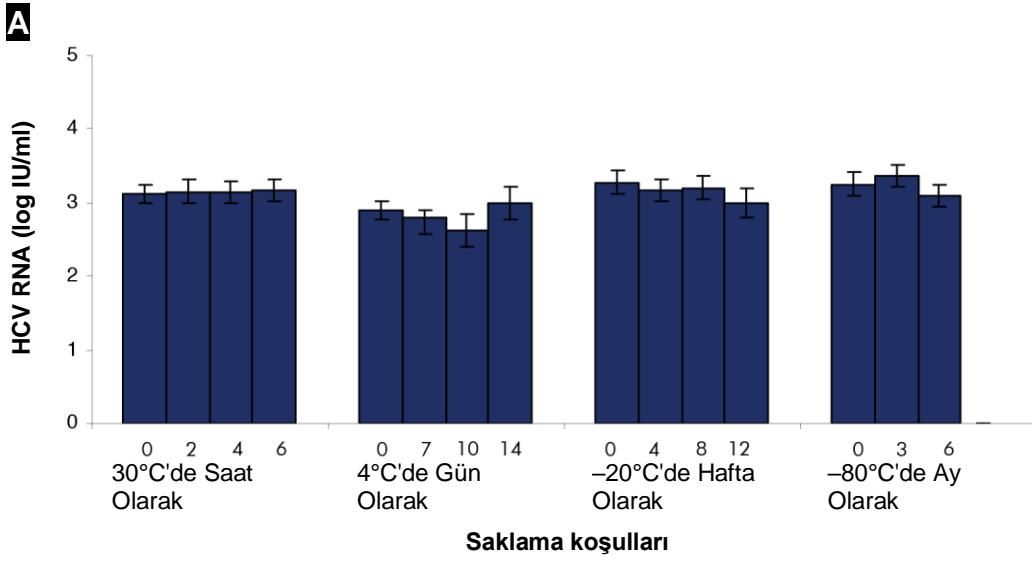
Çalışma	Pozisyon					
	1	2	3	4	5	6
1	15,47	X	15,41	X	15,36	X
2	X	15,48	X	15,53	X	15,32
3	X	X	X	X	X	X
4	15,35	X	15,2	X	15,27	X
5	X	15,21	X	15,13	X	15,43
6	X	X	X	X	X	X
7	15,62	X	15,48	X	15,23	X
8	X	15,31	X	15,83	X	15,62
9	X	X	X	X	X	X

Tüm örneklerin ortalama C_T değeri = 15,40 ± 0,18 (CV = %1,14)

X: 45 PCR döngüsünden sonra tepkisiz.

Stabilite

EZ1 DSP Virus Kit kullanılarak oluşturulan elüatlarda viral RNA ve DNA'nın stabilitesi belirlenmiştir. İnsan EDTA plazmasına 1x10³ IU/ml HCV AcroMetrix OptiQuant[®] HCV RNA ve Parvo B19 VQC standart materyali eklenmiştir. EZ1 DSP Virus sistemi kullanılarak test zaman noktası ve inkübasyon koşulu başına 18 replikat işlenmiştir. Parvo B19 DNA ve HCV RNA içeren elüatlar 30°C'de 6 saate, 4°C'de 14 güne, -20°C'de 12 haftaya ve -80°C'de 9 aya kadar inkübe edilmiştir. Çalışma hala devam etmektedir. Elüatlar doğrulanmış bir kurum içi HCV RT-PCR ve *artus*[®] Parvo B19 RG PCR kullanılarak analiz edilmiştir. 4°C'de 14 gün saklama sonrasında HCV RNA için 18 replikat arasında bir RT-PCR başarısızlığı gözlemlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Viral nükleik asitlerin stabilitesi. EZ1 DSP Virus Kit kullanılarak oluşturulan elüatlarda **A HCV RNA ve **B** Parvo B19 DNA için viral RNA ve DNA'nın stabilitesi belirlenmiştir.**

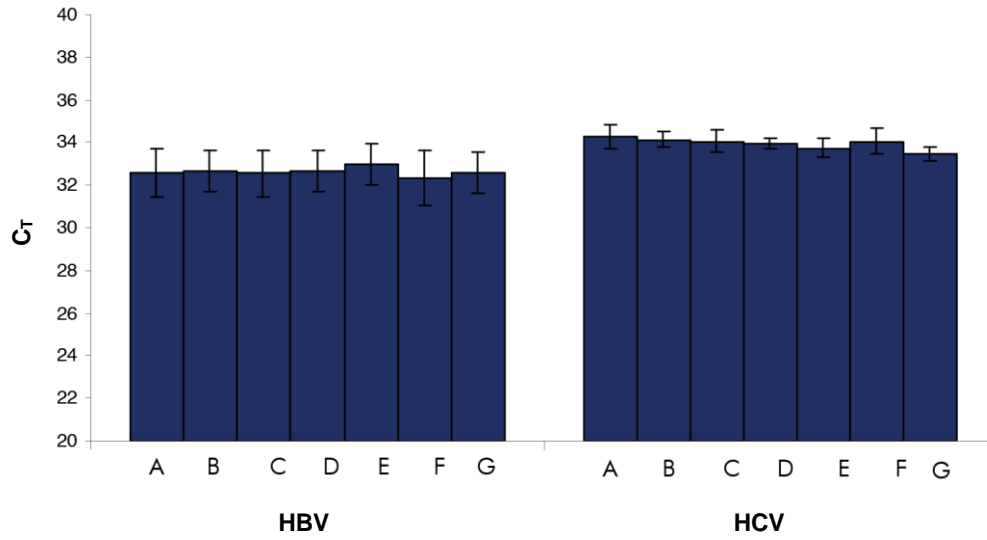
Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, 3 farklı günde çalıştırılan 3 BioRobot EZ1 DSP cihazı kullanılarak belirlenmiştir (bkz. Tablo 8, sonraki sayfa). Her bir test (A–G) için, BioRobot EZ1 DSP üzerindeki 2 çalışmada 12 replikat işlenmiştir. İnsan EDTA plazmasına 1×10^4 IU/ml AcroMetrix OptiQuant HCV RNA ve 1×10^3 IU/ml AcroMetrix OptiQuant HBV DNA eklenmiştir. HBV DNA, *artus*[®] HBV RG PCR Kit ve HCV RNA ile doğrulanmış bir kurum içi HCV RT-PCR tahlili kullanılarak belirlenmiştir.

Otomatik prosedür, 3 farklı günde 3 farklı BioRobot EZ1 DSP cihazındaki viral nükleik asitlerin saflaştırılmasına yönelik kıyaslanabilir sonuçların da gösterdiği şekilde yüksek düzeyde tekrarlanabilir (Şekil 5).

Tablo 8. Tekrarlanabilirlik test kurulumu

Test kurulumu	Gün 1	Gün 2	Gün 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



Şekil 5. Tekrarlanabilirlik. Tekrarlanabilirlik, üç farklı günde üç farklı BioRobot EZ1 DSP cihazında belirlenmiştir.

İdrar

EZ1 DSP Virus Kit'in idrar örnekleriyle kullanımda performansı, ilgili örnek materyalinde seyreltilmiş olan niceliksel CMV (DNA virüsü) ve HCV (RNA virüsü) virüs panelleri kullanılarak plazma ile kıyaslama yoluyla değerlendirilmiştir. İdrar ve plazma örnekleri EZ1 DSP Virus Kit El Kitabı uyarınca işlenmiş ve EZ1 DSP Virus Kit ile eşdeğer örnek hacimleri ekstrakte edilmiştir. Viral nükleik asitler *artus*[®] CMV RG PCR ve *artus*[®] HCV RG RT-PCR Kit kullanılarak saptanmıştır. EZ1 DSP Virus Kit'in idrar ve plazmayı karşılaştıran performans değerlendirmesi hem CMV hem de HCV için yalnızca ~%2 (C_T değerlerine dayalı olarak) farklılık göstermiştir (Tablo 9).

Tablo 9. EZ1 DSP Virus prosedürünün idrar ve plazma örnekleriyle kullanıma yönelik kıyaslaması

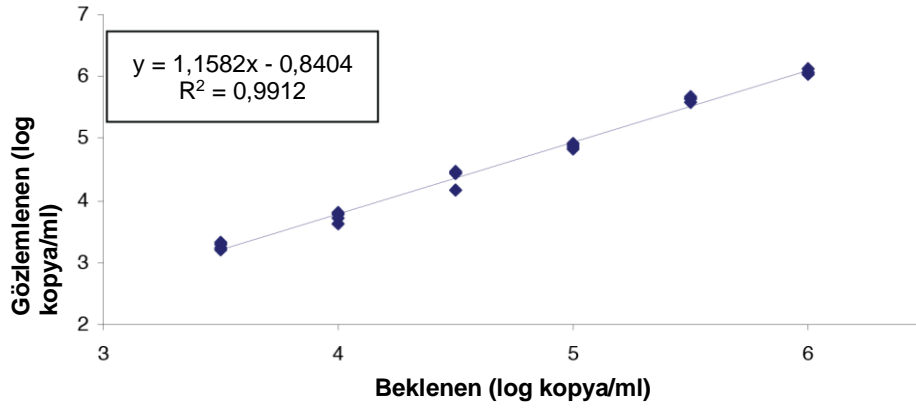
Numune tipi	n	CT değeri	İdrar/Plazma Oranı (CT değeri)	Kopya/ml	İdrar/Plazma Oranı (Kopya/ml)
CMV					
İdrar	4	31,60	0,98	6.250	1,51
Plazma	5	32,17		4.130	
HCV					
İdrar	4	37,83	1,02	278	0,77
Plazma	5	37,25		363	

Tam Kan

Doğrusal Aralık

EZ1 DSP Virus Kit için doğrusal aralık, DNA virüsü olarak EBV kullanımıyla değerlendirilmiştir. Testler, EBV negatif insan tam kanı içinde hazırlanan niceliksel virüs panelleri seyreltileriyle gerçekleştirilmiştir. Altı farklı virüs titresine sahip seyrelti serisinde her bir öge 4 replikat ile test edilmiştir. 200 µl'lik tam kandan (200 µl Buffer ATL* ile karışık) viral nükleik asitler ekstrakte edilmiş ve 60 µl'lik elüsyon tamponunda (AVE) elüsyona tabi tutulmuştur. EZ1 DSP Virus Kit prosedürünün doğrusal aralığı EBV için Rotor-Gene Q cihazı üzerinde *artus*[®] EBV RG PCR ile belirlenmiştir (Şekil 6).

*QIAGEN GmbH, kat. no. 939016



Şekil 6. Tam kandan EBV ekstraksiyonu için *artus*[®] EBV RG PCR tahlili ile birlikte EZ1 DSP Virus protokolü kullanıldığında verimlerin doğrusal aralığı.

Kesinlik

Tam kana yönelik standart sapmalar ve varyasyon katsayıları (Coefficients of Variations, CV'ler) CMV için Rotor-Gene Q cihazı üzerinde *artus*[®] CMV RG PCR Kit kullanılarak belirlenmiştir. Tahliller arası kesinlik verileri Tablo 10 üzerinde gösterilmektedir. Kan veren 13 bireyden elde edilen tam kan EZ1 Advanced XL üzerinde, ayrı çalışmalarda ve 5 replikat halinde test edilmiştir. 200 µl'lik tam kandan (200 µl Buffer ATL* ile karışık) viral nükleik asitler ekstrakte edilmiş ve 120 µl'lik elüsyon tamponunda (AVE) elüsyona tabi tutulmuştur.

*QIAGEN GmbH, kat. no. 939016

Tablo 10. Tam kandan CMV ekstraksiyonu için *artus*[®] CMV RG PCR Kit ile birlikte EZ1 DSP Virus protokolünün tahliller arası kesinliği

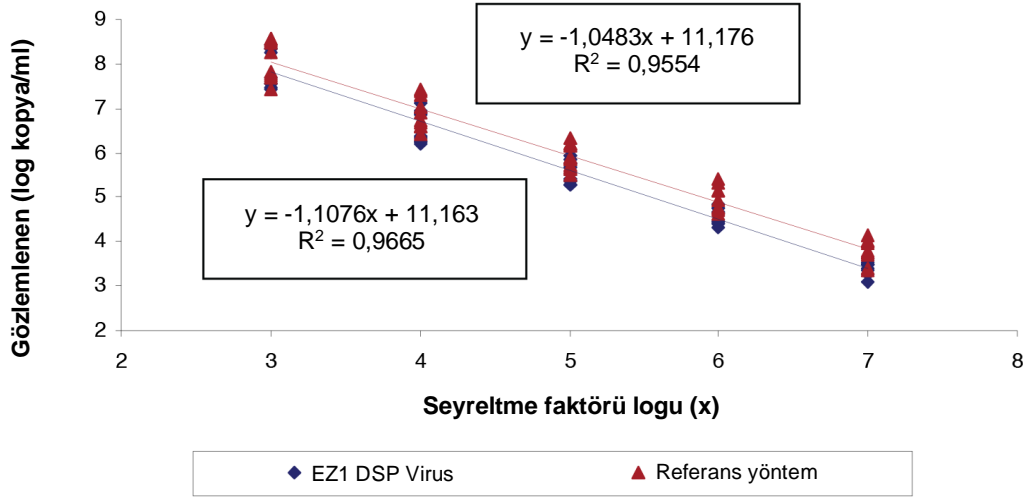
Donör	Kopya/ml	CV (%)	log kopya/ml	SD (log kopya/ml)	
1	5	7.209	13	3,86	0,06
2	5	7.404	24	3,87	0,10
3	5	7.313	14	3,86	0,06
4	5	7.185	17	3,86	0,08
5	5	7.803	28	3,89	0,12
6	5	7.257	39	3,86	0,17
7	5	7.870	20	3,90	0,08
8	5	7.583	26	3,88	0,12
9	5	8.571	24	3,93	0,10
10	5	7.177	30	3,86	0,13
11	5	8.294	24	3,92	0,11
12	5	7.790	21	3,89	0,10
13	5	7.627	27	3,88	0,13

Dışkı

Doğrusal Aralık

EZ1 DSP Virus Kit için doğrusal aralık, DNA virüsü olarak Adenovirüs 5 kullanımıyla değerlendirilmiştir. Testler Adenovirüs negatif dışkıda hücre kültürü üst fazının seri 10 kat seyreltilerile gerçekleştirilmiştir. Beş farklı virüs seyreltisine sahip seyrelti serisinde her bir öge 10 replikat ile test edilmiştir. 200 µl'lik örneklerden (Buffer ASL'de* tekrar 1:10 süspansiyon haline getirilmiş) viral nükleik asitler ekstrakte edilmiş ve 120 µl'lik elüsyon tamponunda (AVE) elüsyona tabi tutulmuştur. EZ1 DSP Virus prosedürünün doğrusal aralığı Rotor-Gene Q cihazı üzerinde Adenovirus R-Gene™ PCR tahlili (Argene SA, Fransa, ref. 96-010B) ile birlikte bir referans ekstraksiyon yöntemiyle kıyaslanarak belirlenmiştir (Şekil 7).

*QIAGEN GmbH, kat. no. 19082



Şekil 7. Dışkıdan Adenovirüs 5 ekstraksiyonu için Adenovirus R-Gene™ PCR tahlili ile birlikte EZ1 DSP Virus protokolü kullanıldığında verimlerin doğrusal aralığı.

Kesinlik

Dışkıya yönelik standart sapmalar ve varyasyon katsayıları (Coefficients of Variations, CV'ler) Adenovirüs 5 için Rotor-Gene Q cihazı üzerinde Adenovirus R-Gene™ PCR tahlili (Argene SA, Fransa, ref. 96-010B) kullanılarak belirlenmiştir. Adenovirüs negatif dışkıya Adenovirüs 5 hücre kültürü üst fazı eklenmiş ve 200 µl'lik örneklerden (Buffer ASL'de* tekrar 1:10 süspansiyon haline getirilmiş) viral DNA ekstrakte edilip 120 µl'lik elüsyon tamponunda (AVE) elüsyona tabi tutulmuştur. Üç EZ1 Advanced XL cihazı ve üç EZ1 DSP Virus Kit/Buffer ASL lotu kombinasyonu ile üç günde her biri 9 veya 10 replikat içeren yedi EZ1 çalışması yapılmıştır. Tüm örnekler aynı PCR çalışmasında analiz edilmiştir. Kesinlik verileri (Tablo 11) farklı cihazlardan, günlerden, lotlardan ve tüm EZ1 çalışmalarından birlikte gelen sonuçlar (toplam) dikkate alınarak hesaplanmıştır.

*QIAGEN GmbH, kat. no. 19082

Tablo 11. Dışkıdan Adenovirüs 5 ekstraksiyonu için Adenovirus R-Gene™ PCR tahlili ile birlikte EZ1 DSP Virus protokolünün kesinliği

Çalışma	n	Kop/ml	Log kop/ml	SD (log kop/ml)	Tahlil içi	CV c/ml (%)			
						3 EZ1 Adv. XL	3 gün	3 lot	Toplam
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	–	–	–	–

Korelasyon çalışması

EZ1 DSP Virus prosedürüne yönelik olarak 66 hasta dışkı örneğinden Norovirüs Genogrup II ekstraksiyonu için bir referans yöntemiyle kıyas yapılarak bir korelasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. 200 µl'lik örneklerden (Buffer ASL'de* tekrar 1:10 süspansiyon haline getirilmiş) viral nükleik asitler ekstrakte edilmiş ve 120 µl'lik elüsyon tamponunda (AVE) elüsyona tabi tutulmuştur. Analiz Norovirüs Genogrup II'ye karşı kurum içi bir RT PCR tahlili ile yapılmıştır (Tablo 12).

*QIAGEN GmbH, kat. no. 19082

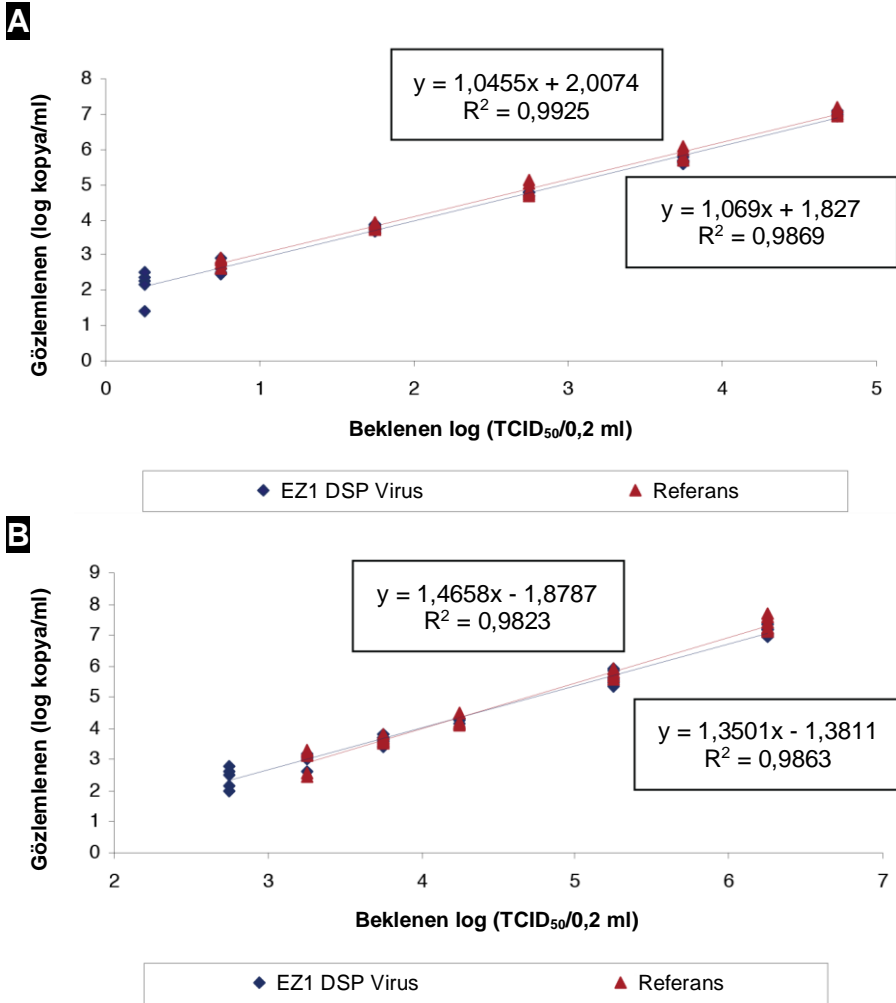
Tablo 12. Bir referans yöntemiyle EZ1 DSP Virus prosedürünün korelasyonu

		Referans		
		Pozitif	Negatif	Toplam
EZ1 DSP Virus	Pozitif	34	15	49
	Negatif	1	16	17
	Toplam	35	31	66

Taşıma Besi Yerleri

Doğrusal Aralık

EZ1 DSP Virus Kit için doğrusal aralık PreservCyt® besi yerinden (Cytoc Corporation, ref. 0200011) HSV-1 ve *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) ekstrakte edilerek değerlendirilmiştir. Testler, taşıma besi yeri içinde hazırlanan niceliksel virüs panellerinin seyreltileriyle gerçekleştirilmiştir. Altı farklı virüs titresine sahip seyrelti serisinde her bir öge 5 veya 6 replikat ile test edilmiştir. EZ1 DSP Virus Kit'in doğrusal aralığı *artus*® HSV1/2 TM PCR ve *artus*® *C. trachomatis* TM PCR tahlili ile bir referans yöntemle kıyaslanarak belirlenmiştir (Şekil 8). 200 µl'lik örneklerden viral nükleik asitler ekstrakte edilmiş ve 90 µl'lik elüsyon tamponunda (AVE) elüsyona tabi tutulmuştur.



Şekil 8. Taşıma besi yerinden HSV-1 ve *C. trachomatis* ekstraksiyonu için *artus*® *C. trachomatis* PCR (A) ve *artus*® HSV1/2 TM PCR (B) tahlili ile EZ1 DSP Virus protokolü kullanıldığında verimlerin doğrusal aralığı. Çalışma, bir referans yöntemle kıyaslanarak gerçekleştirilmiştir.

Kesinlik

Taşıma besi yerlerine yönelik standart sapmalar ve varyasyon katsayıları (Coefficients of Variations, CV'ler) HSV-1 ve *C. trachomatis* için *artus*[®] HSV1/2 TM PCR ve *artus*[®] *C. trachomatis* TM PCR tahlili kullanılarak belirlenmiştir. 400 µl'lik besi yerinden viral ve bakteriyel DNA ekstrakte edilmiş ve 60 µl'lik elüsyon tamponunda (AVE) elüsyona tabi tutulmuştur. Üç EZ1 DSP Virus Kit lotu ile üç günde, altı EZ1 çalışmasında ve her biri 12 replikat halinde olacak şekilde beş taşıma besi yeri ekstrakte edilmiştir. Tüm örnekler aynı PCR çalışmasında analiz edilmiştir. *C. trachomatis* (Tablo 13) ve HSV-1 (Tablo 14) için ara kesinlik her bir taşıma besi yerinin tüm replikatları dikkate alınarak hesaplanmıştır (farklı EZ1 çalışmaları, günler ve lotlar).

Tablo 13. Taşıma besi yerlerinden *C. trachomatis* ekstraksiyonu için *artus*[®] *C. trachomatis* RG PCR Kit ile birlikte EZ1 DSP Virus protokolünün kesinliği

Besi Yeri	n	Nominal	Gözlemlenen kop/ml	Ara kesinlik	Gözlemlenen log kop/ml	SD (log kop/ml)
		log TCID ₅₀ / 0,2 ml		CV'si 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. no. 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. no. 330C

Tablo 14. Taşıma besi yerlerinden HSV-1 ekstraksiyonu için *artus*[®] HSV1/2 RG PCR Kit ile birlikte EZ1 DSP Virus protokolünün kesinliği

Besi Yeri	n	Nominal		Ara kesinlik		
		log TCID ₅₀ / 0,2 ml	Gözlemlenen kop/ml	CV'si kop/ml (%)	Gözlemlenen 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. no. 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. no. 330C

Klinik Performans (HPV)

STM içinde toplanmış 50 HC2 pozitif örnek, PreservCyt® içinde toplanmış 50 HC2 pozitif örnek ve STM içinde toplanmış 8 HC2 negatif örnekten oluşan toplam 108 örnekten saflaştırılmış DNA alikotları *digene*® HPV Genotyping RH Test (kat. no. 613413) ve *digene*® HPV Genotyping LQ Test (kat. no. 613215) ile Free University RLB sistemiyle* kıyaslanarak test edilmiştir.

Sonuçlar aynı (%100 eşleşen genotipler), uyumlu (en az bir ortak genotip) veya uyumsuz (eşleşen genotip yok) olarak puanlanmıştır. Farklılıklar (uyumsuz genotipleme sonuçları) iki tahlilin de tekrarlanmasıyla ve devam eden farklılıklar olması durumunda üçüncü bir hassas HPV saptama ve genotipleme tahlili [SPF10-LiPA25 (sürüm1)] ile analiz yapılarak çözülmüştür.

Sonuçlar referans yöntemine kıyasla her iki genotipleme tahlili için de başlangıçtaki farklılık gösteren örneklerin çözülmesinden sonra çok düşük bir farklılık gösteren örnek seviyesi (%2) sergilemiştir (Tablo 15).

Tablo 15. Taşıma besi yerlerinden HPV ekstraksiyonu için EZ1 DSP Virus prosedürü kullanıldığında digene HPV Genotyping RH Test (A) ve digene HPV Genotyping LQ Test'in Free University RLB sistemiyle* kıyaslaması

Sonuç türü	A	B
	Klinik örneklerin %'si	Klinik örneklerin %'si
Aynı	80	58
Uyumlu	18	12
Uyumsuz	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.

Klinik Performans (İnfluenza A)

Klinik performansın gösterilmesi amacıyla nükleik asit ekstraksiyonu için EZ1 DSP Virus Kit kullanılarak UTM (Copan Diagnostics Inc., kat. no. 330C) içinde toplanmış 102 karakterize nazofaringeal sürüntü numunesi değerlendirilmiştir. İnfluenza A RNA, *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR Kit ve EUA onaylı Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR testi kullanılarak saptanmıştır (Tablo 16).

Tablo 16. Nazofaringeal sürüntülerden mevsimsel İnfluenza A ve 2009 H1N1 İnfluenza virüs ekstraksiyonu için EZ1 DSP Virus Kit kullanılarak *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR Kit'in EUA onaylı Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR testi ile kıyaslaması

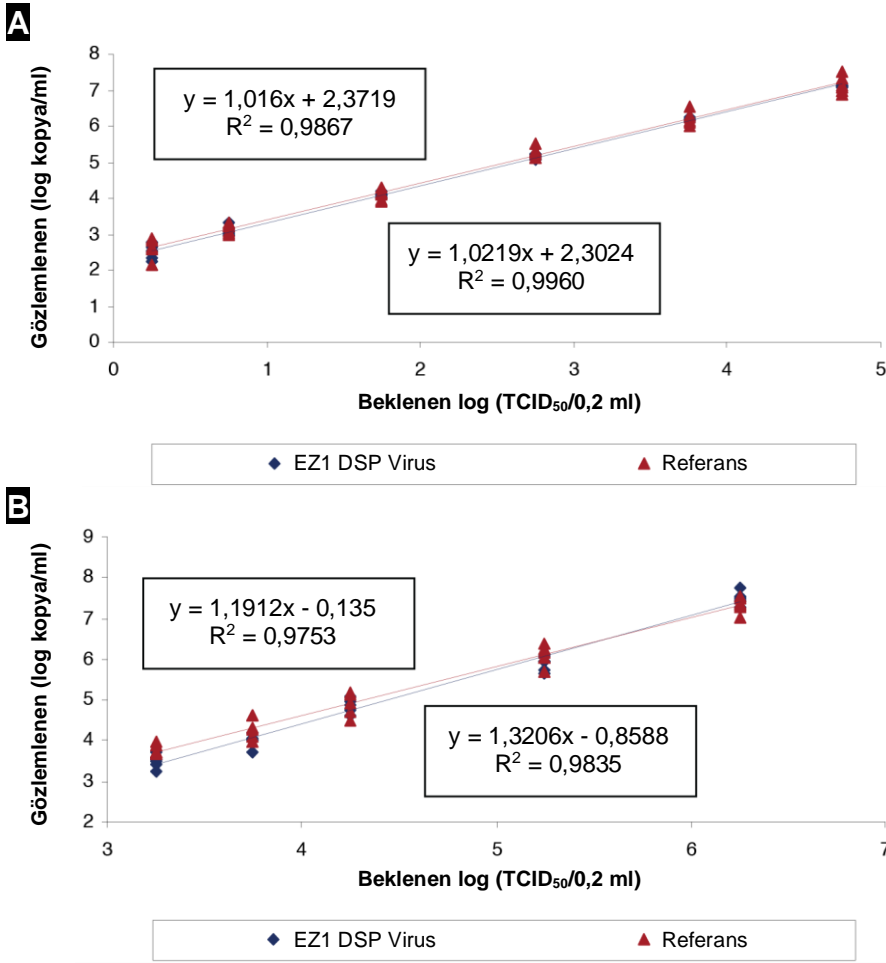
		Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR			
		Mevsimsel İnfl.A pozitif	2009 H1N1 pozitif	Negatif	Toplam
<i>artus</i> [®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR	Mevsimsel İnfl.A pozitif	5	0	2	7
	2009 H1N1 pozitif	0	27	1	28
	Negatif	0	0	67	67
	Toplam	5	27	70	102

Kurutulmuş Sürüntüler

Doğrusal Aralık

EZ1 DSP Virus Kit için doğrusal aralık Puritan Cotton Swabs (ref. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC) HSV-1 ve *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) ekstrakte edilerek değerlendirilmiştir. Testler niceliksel standart materyal seyreltileriyle gerçekleştirilmiştir. İnsan negatif salyasına patojen materyal eklenmiş ve salya, sürüntüye aktarılmıştır. Dehidrasyon sonrasında patojenler 600 µl Buffer ATL'de* yeniden süspansiyon haline getirme yoluyla kurutulmuş sürüntüden tekrar izole edilmiştir. Altı farklı virüs titresine sahip seyrelti serisinde her bir öge 5 veya 6 replikat ile test edilmiştir. EZ1 DSP Virus Kit'in doğrusal aralığı *artus*[®] HSV1/2 TM PCR ve *artus*[®] C. trachomatis TM PCR tahlili ile bir referans yöntemiyle kıyaslanarak belirlenmiştir (Şekil 9). 400 µl'lik örneklerden viral nükleik asitler ekstrakte edilmiş ve 150 µl'lik elüsyon tamponunda (AVE) elüsyona tabi tutulmuştur.

*QIAGEN GmbH, kat. no. 939016



Şekil 9. Kurutulmuş sürüntülerden *C. trachomatis* ve HSV-1 ekstraksiyonu için *artus*[®] *C. trachomatis* PCR (A) ve *artus*[®] HSV1/2 TM PCR (B) tahlili ile EZ1 DSP Virus protokolü kullanıldığında verimlerin doğrusal aralığı. Çalışma, bir referans yöntemle kıyaslanarak gerçekleştirilmiştir.

Kesinlik

Kurutulmuş sürüntüleri yönelik standart sapmalar ve varyasyon katsayıları (Coefficients of Variations, CV'ler) HSV-1 ve *C. trachomatis* için *artus*[®] HSV1/2 TM PCR ve *artus*[®] *C. trachomatis* TM PCR tahlili kullanılarak belirlenmiştir. Copan Flocked Swabs (kat. no. 502CS0, Copan Italia S.p.A.) ve Puritan Cotton Swabs (ref. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC) Kurutulmuş sürüntüler yukarıda açıklanan şekilde hazırlanıp ön işleme tabi tutulmuş ve 400 µl'lik örnek hacminden viral ve bakteriyel DNA ekstrakte edilerek 60 µl'lik elüsyon tamponunda (AVE) elüsyona tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon üç EZ1 DSP Virus Kit/Buffer ATL lot kombinasyonu ile, üç günde, altı EZ1 çalışmasında ve her biri 8 veya 9 replikat halinde olacak şekilde üç salya donörüyle gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler aynı PCR çalışmasında analiz edilmiştir. *C. trachomatis* (Tablo 17) ve HSV-1 (Tablo 18) için ara kesinlik her bir donörün ve sürüntü türünün tüm replikatları dikkate alınarak hesaplanmıştır (farklı EZ1 çalışmaları, günler ve lotlar).

Tablo 17. Kurutulmuş sürüntülerden *C. trachomatis* ekstraksiyonu için *artus*[®] *C. trachomatis* RG PCR Kit ile birlikte EZ1 DSP Virus protokolünün kesinliği

Sürüntü türü	Donör	n	Nominal	Gözlemlenen kop/ml	Ara kesinlik	Gözlemlenen log kop/ml	SD (log kopya/ml)
			log TCID ₅₀ /0,2 ml		CV'si 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 flocced 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

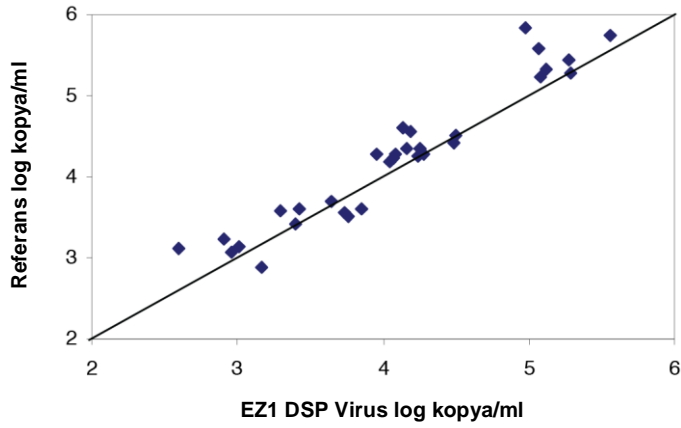
Tablo 18. Kurutulmuş sürüntülerden HSV-1 ekstraksiyonu için *artus*[®] HSV1/2 RG PCR Kit ile birlikte EZ1 DSP Virus protokolünün kesinliği

Sürüntü türü	Donör	n	Nominal	Gözlemlenen kop/ml	Ara kesinlik	Gözlemlenen log kop/ml	SD (log kopya/ml)
			log TCID ₅₀ /0,2 ml		CV'si 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
Copa flocced 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

Solunum örnekleri (tükürük)

Korelasyon çalışması

EZ1 DSP Virus için negatif insan tükürüğünden *Mycobacterium tuberculosis* ekstraksiyonuna yönelik olarak bir korelasyon çalışması yapılmıştır. 4 farklı virüs titresine sahip bir seyrelti serisi, bir referans yöntemiyle kıyaslanarak tek replikatlar halinde test edilmiştir. Bakteriyel DNA 200 µl tükürükten ekstrakte edilmiş, EZ1 DSP Virus El Kitabı Sürüm 4'te açıklanan şekilde Sputasol (Oxoid Limited, ref. SR0233) ve lizozim (Sigma-Aldrich, kat. no. L6876) ile ön işlem görmüş ve 90 µl elüsyon tamponunda (AVE) elüsyona tabi tutulmuştur. Analiz, *artus*[®] M. tuberculosis RG PCR tahlili (Şekil 10) ile yapılmıştır.



Şekil 10. Bir referans yöntemiyle EZ1 DSP Virus prosedürünün korelasyonu.

Güncel lisans bilgileri ve ürüne özgü yasal uyarılar için ilgili QIAGEN kiti el kitabına veya kullanım kılavuzuna bakın. QIAGEN kit el kitapları ve kullanıcı el kitapları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servis veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Ticari Markalar: QIAGEN®, *artus*®, EZ1®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM® (Applied Biosystems); COBAS®, AMPLICOR® (Roche Molecular Systems, Inc., Roche Diagnostic Systems, Inc.'ye lisansı verilmiştir); 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)

Şubat-11 © 2011 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

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