

# EZ1<sup>®</sup> DSP Virus Kit

---

Die Systemfunktionalität des EZ1 DSP Virus Kits bei der Isolierung viraler Nukleinsäuren und bakterieller DNA wurde unter Verwendung von Plasma-, Serum-, Liquor-, Urin-, Vollblut- und Stuhlproben sowie mit Transportmedien, getrockneten Abstrich-Tupfern und respiratorischen Proben getestet. Die Durchführung der Tests erfolgte gemäß den Protokollen, die in der aktuellen Version 4 des EZ1 DSP Virus Kit Handbuchs beschrieben sind.

Allerdings kann die volle Leistungsfähigkeit eines Kits nicht für jede Virus- oder Bakterien-Spezies garantiert werden; sie ist vielmehr vom Anwender zu validieren. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Leistungscharakteristik des Systems für jede Methode, die im Labor des Anwenders angewandt wird und die durch die QIAGEN Untersuchungen zur Leistungsevaluierung nicht abgedeckt ist, selbst zu validieren.

## Leistungscharakteristik

### Serum und Plasma

#### Linearer Wertebereich

Der lineare Wertebereich des EZ1 DSP Virus Kits wurde für die RNA-Viren HCV und HIV-1 sowie für das DNA-Virus HBV bestimmt. Dazu wurden Verdünnungsreihen von zuvor quantifizierten Virus-Standards in menschlichem HBV-, HCV- und HIV-1-negativem Plasma bzw. Serum hergestellt. Die Tests mit sechs verschiedenen Konzentrationsstufen wurden als 12-fach-Bestimmung durchgeführt. Der lineare Bereich des EZ1 DSP Virus-Protokolls wurde für HBV, HCV und HIV-1 mithilfe der Abbott RealTime Viruslast-Assays bestimmt (siehe Tabelle 1 und Abbildung 1). Die internen Kontrollen der RealTime HIV-1- bzw. HCV-Assays (jeweils 17  $\mu$ l) wurden unmittelbar vor Beginn der Nukleinsäure-Reinigung zu jeder HIV-1- bzw. HCV-Probe gegeben. Die interne Kontrolle des RealTime HBV-Assays (jeweils 3,4  $\mu$ l) wurde kombiniert mit Carrier-RNA zugegeben. Die Präparation der viralen Nukleinsäuren wurde mit 400- $\mu$ l-Proben durchgeführt; die Elution erfolgte mit 90  $\mu$ l Elutionspuffer (AVE). Für die PCR wurde ein Abbott *m2000rt* Real-Time-Thermocycler verwendet.



**Tabelle 1. Ausgangsmaterial und Nachweis-Assays zur Bestimmung des linearen Wertebereichs der Ausbeute bei der Nukleinsäure-Reinigung nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll**

<b>Virus</b>	<b>Ausgangsmaterial</b>	<b>Nachweis-Assay</b>	<b>Verwendetes Assay-Handbuch</b>
HIV-1	HIV-negatives, rekalfiziertes Plasma (Boston Biomedica Inc. (BBI), Boston, USA)	Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HIV-1
HCV	Gepooltes normales Humanserum, Patientenprobe (ProMedDx LLC, Norton, MA, USA)	Abbott RealTime HCV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HCV
HBV	Rekalfiziertes humanes Plasma, Patientenprobe (Teragenix Corporation, Fort Lauderdale, FL, USA)	Abbott RealTime HBV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HBV

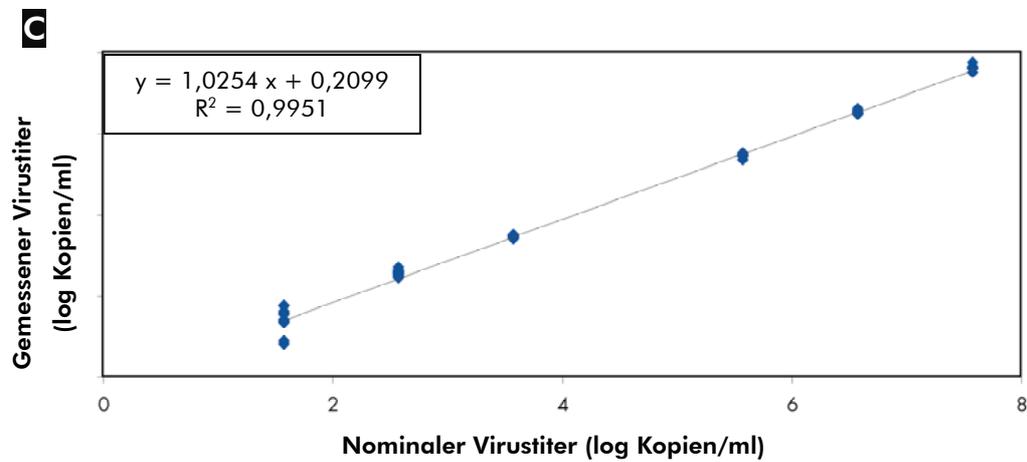
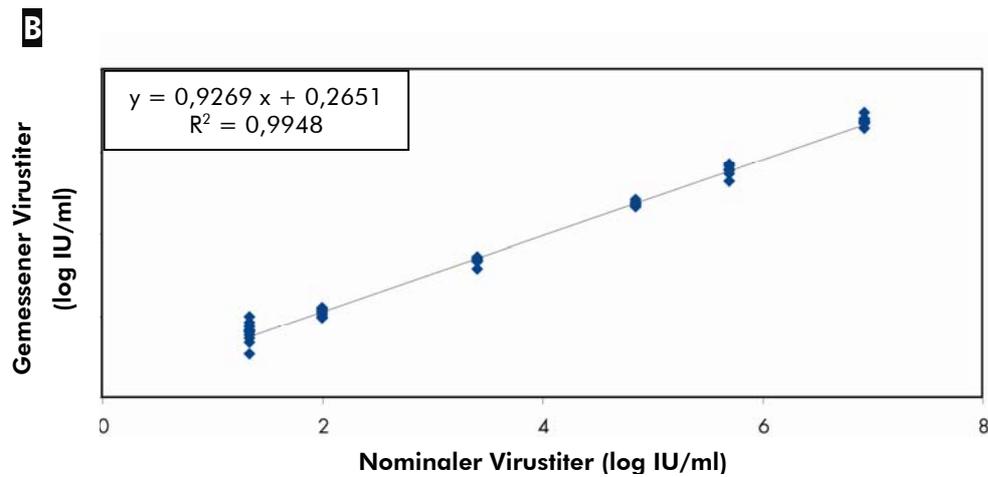
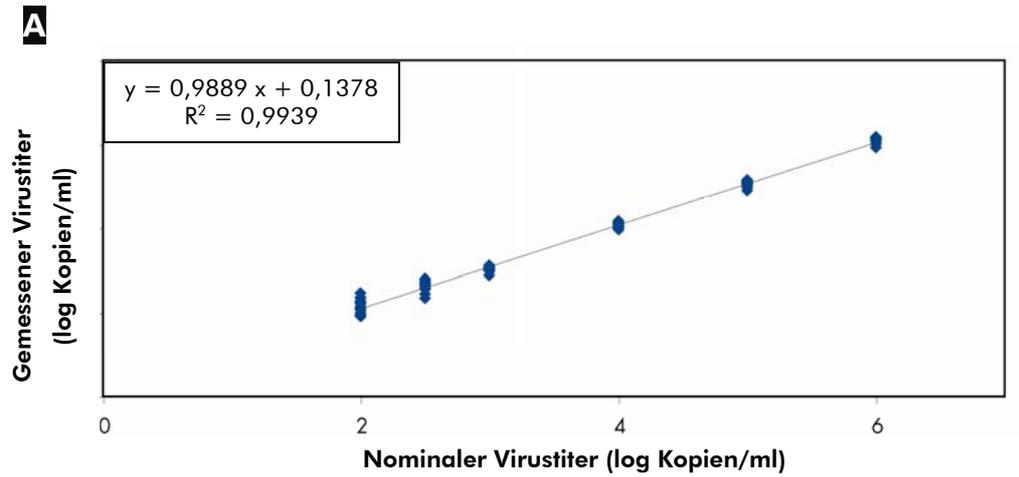


Abbildung 1. Linearer Wertebereich der Ausbeute bei der Nukleinsäure-Reinigung nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll. Der lineare Bereich des EZ1 DSP Virus-Protokolls wurde mit Verdünnungsreihen von Virus-Standards und Abbott RealTime Assays (siehe Tabelle 1) bestimmt: **A** für HIV-1, **B** für HCV und **C** für HBV.

## Präzision

Im linearen Bereich des jeweiligen Nachweis-Assays wurden für die HIV-1-, HCV- und HBV-Verdünnungsreihen die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (CVs) bestimmt. Bei der Analyse der Assay-Präzision wurde derselbe Nachweis-Assay verwendet wie bei der Bestimmung des linearen Wertebereichs (siehe Tabelle 1). Die Werte für die Inter-Assay-Präzision sind in den Tabellen 2 bis 4 wiedergegeben. Für jede Konzentrationsstufe wurden 12 Nukleinsäure-Reinigungen in 12 verschiedenen Läufen auf dem BioRobot EZ1 DSP durchgeführt. Die anschließende PCR dieser 12 gleichen Proben erfolgte in zwei Läufen à sechs Proben mit dem Abbott *m2000rt* Real-Time-Thermocycler.

**Tabelle 2. Inter-Assay-Präzision des EZ1 DSP Virus-Protokolls mit dem Abbott RealTime HIV-1-Nachweis-Assay**

<b>Konzentrationsstufe</b>	<b>Präparationen (n)</b>	<b>Virustiter (Kopien/ml)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>log Kopien/ml</b>	<b>SD (log Kopien/ml)</b>
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

**Tabelle 3. Inter-Assay-Präzision des EZ1 DSP Virus-Protokolls mit dem Abbott RealTime HCV-Nachweis-Assay**

Konzentrationsstufe	Präparationen (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

**Tabelle 4. Inter-Assay-Präzision des EZ1 DSP Virus-Protokolls mit dem Abbott RealTime HBV-Nachweis-Assay**

Konzentrationsstufe	Präparationen (n)	Virustiter (Kopien/ml)	CV (%)	log Kopien/ml	SD (log Kopien/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

## Nachweisgrenze

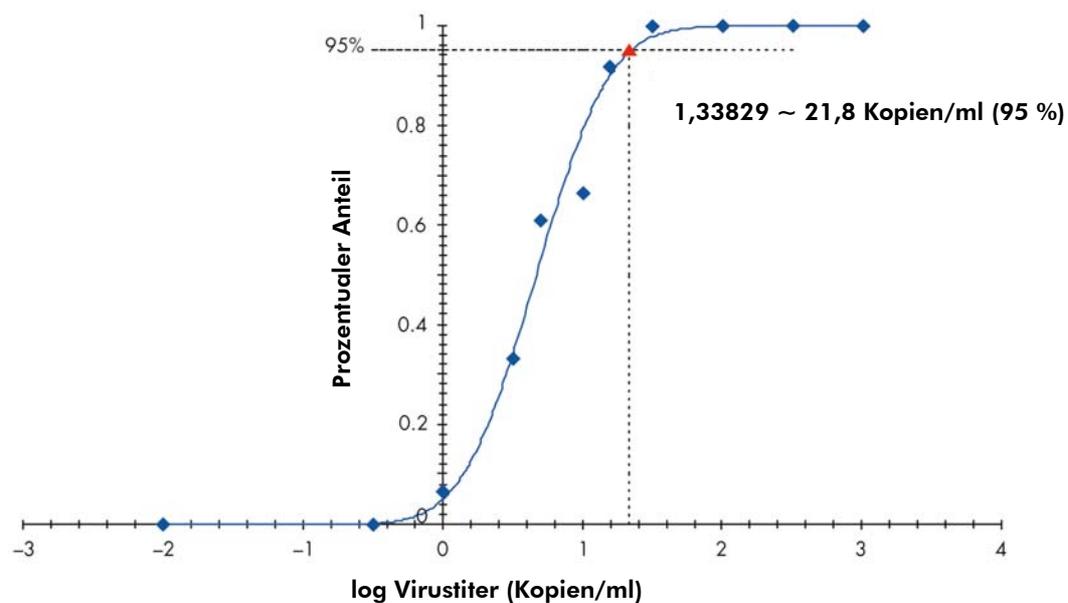
Die Nachweisgrenze wurde anhand des 95%-Probit-Werts für das EZ1 DSP Virus-System ermittelt, wobei für HIV-1 der internationale Virus-Standard 97/656 und für HBV der Standard 97/746 der WHO sowie ein quantifizierter Zellkulturüberstand für CMV verwendet wurden. Die Nachweisgrenze wurde jeweils mithilfe von Verdünnungsreihen des betreffenden Virus als Ausgangsmaterial ermittelt. Dazu wurden die Viren in HIV-, HBV- bzw. CMV-negativem, gepooltem humanem EDTA-

Plasma verdünnt. Für jede Konzentrationsstufe wurde die Nukleinsäure-Reinigung mindestens 6-fach wiederholt (verteilt auf mindestens drei voneinander unabhängige Läufe auf dem BioRobot EZ1 DSP). Dabei wurden jeweils 400- $\mu$ l-Plasmaproben verwendet, eluiert wurde mit jeweils 60  $\mu$ l.

Als Nachweis-Assay für HBV- und CMV-DNA wurden die *artus*<sup>®</sup> HBV PCR bzw. *artus*<sup>®</sup> CMV PCR Kits verwendet. Als Analysegeräte wurden ein LightCycler<sup>®</sup> 1.2 (Roche), ein Rotor-Gene<sup>®</sup> 3000 (Corbett Research) oder ein ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 SDS (Applied Biosystems) eingesetzt. Der Nachweis der HIV-RNA wurde mithilfe des COBAS<sup>®</sup> Amplicor<sup>®</sup> HIV-1 Monitor<sup>®</sup> Tests (Version 1.5) auf einem COBAS Amplicor Analyzer durchgeführt. Die Auswertung der aus allen Proben kombinierten Daten erfolgte mittels Probit-Analyse. Die experimentellen Daten sind in den Tabellen 5 und 6, repräsentative Probit-Diagramme in den Abbildungen 2 und 3 wiedergegeben.

**Tabelle 5. Nachweisgrenze für HBV- und CMV-DNA bei Verwendung des EZ1 DSP Virus-Systems kombiniert mit *artus*<sup>®</sup> PCR Kits als Nachweis-Assay**

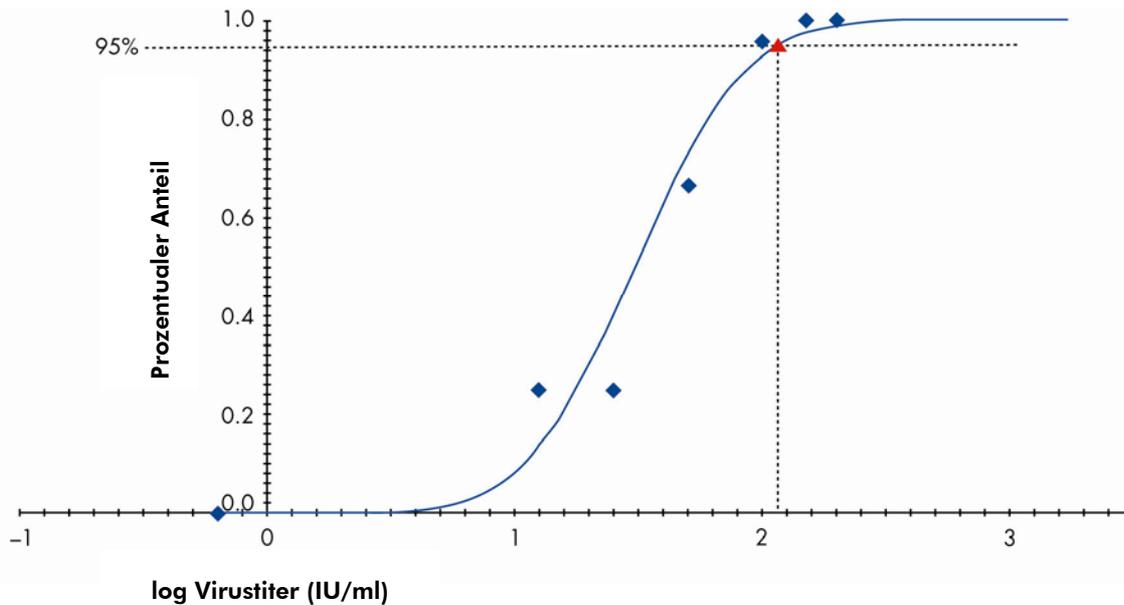
<b>Virus</b>	<b>Ausgangs-Titer</b>	<b>Treffer (LightCycler)</b>	<b>Treffer (Rotor-Gene)</b>	<b>Treffer (ABI PRISM)</b>
HBV	95-%-Probit-Wert (IU/ml)	45,7	14,4	13,2
	Konfidenzintervall (IU/ml)	28–102	9,5–26,5	9,0–23,1
CMV	95-%-Probit-Wert (Kopien/ml)	67,2	21,8	38,3
	Konfidenzintervall (Kopien/ml)	41,8–142	14,5–44,1	21,5–89,8



**Abbildung 2. Probit-Analyse für den Nachweis von CMV-DNA unter Verwendung des EZ1 DSP Virus-Systems in Kombination mit dem artus® CMV RG PCR Kit als Nachweis-Assay. Die viralen Nukleinsäuren wurden mit dem EZ1 DSP Virus-System gereinigt. Anschließend erfolgte der Nachweis der CMV-DNA mithilfe des artus® CMV PCR RG Kits und einem Rotor-Gene 3000. Der 95%-Probit-Wert betrug 21,8 Kopien/ml.**

**Tabelle 6. Nachweisgrenze für HIV-DNA bei Verwendung des EZ1 DSP Virus-Systems kombiniert mit dem COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Test (Version 1.5) als Nachweis-Assay**

Ausgangs-Titer (IU/ml)	Treffer
95%-Probit-Wert (IU/ml)	114,5
Konfidenzintervall (IU/ml)	82,9–194,3



**Abbildung 3. Probit-Analyse für den Nachweis von HIV-RNA bei Verwendung des EZ1 DSP Virus-Systems in Kombination mit dem COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Test (Version 1.5) als Nachweis-Assay. Die viralen Nukleinsäuren wurden mit dem EZ1 DSP Virus-System gereinigt (eingesetztes Probenvolumen: 400 µl; Elutionsvolumen: 60 µl). Anschließend erfolgte der Nachweis der HIV-RNA mithilfe des COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Tests und dem COBAS Amplicor Analyzer im hochsensitiven Modus („ultrasensitive“). Der 95%-Probit-Wert lag bei 114,5 IU/ml.**

## Ausschluss von Kreuzkontamination

Um das Risiko einer Kreuzkontamination während einer Präparation und zwischen zwei Präparationen mit dem EZ1 DSP Virus-System abschätzen zu können, wurden jeweils neun Protokolldurchläufe auf einem BioRobot EZ1 DSP, einem EZ1 Advanced und einem EZ1 Advanced XL durchgeführt. Dabei diente jeweils eine zuvor auf Parvovirus B19 quantifizierte Patientenprobe als Ausgangsmaterial. Die Viruslast der positiven Proben für den Verschleppungstest betrug  $1,0 \times 10^8$  IU/ml. Zur Verdünnung der Positivproben und als Negativkontrollen wurden EDTA-Plasmapools, die negativ für humanes Parvovirus B19 waren, verwendet.

Um eine eventuelle Verschleppung zwischen zwei Proben nachzuweisen, wurden mit jedem Gerät jeweils zwei Läufe mit einer schachbrettartig wechselnden Anordnung von Negativkontrollen und hoch positiven Proben durchgeführt. Jeder dritte Lauf enthielt dann ausschließlich Negativkontrollen, um eine eventuelle Verschleppung zwischen zwei Läufen auszuschließen. Diese Abfolge von Probendurchläufen wurde dreimal wiederholt, sodass insgesamt neun Läufe mit jedem Gerät durchgeführt wurden. Der Nachweis und die Quantifizierung der Parvovirus-B19-DNA erfolgte mithilfe des CE-IVD-zertifizierten *artus*<sup>®</sup> Parvo B19 RG PCR Kits auf einem Rotor-Gene 3000 PCR-System. Die analytische Nachweisgrenze für den *artus*<sup>®</sup> Parvo B19 RG PCR Kit wurde zu 0,2 IU/µl Eluat bestimmt ( $p = 0,05$ ). Dies bedeutet, dass im Eluat eine Virusmenge von 0,2 IU/µl mit 95%iger Wahrscheinlichkeit nachgewiesen wird.

Alle hoch positiven Proben wurden mit dem *artus*<sup>®</sup> Parvo B19 RG PCR Kit positiv getestet. Weder bei den „Schachbrett“-Läufen noch bei den Läufen mit ausschließlich Negativkontrollen wurde ein Detektionssignal gemessen (in Tabelle 7 sind die Ergebnisse für den BioRobot EZ1 DSP wiedergegeben). Diese Experimente zeigen, dass unter diesen Bedingungen bei der Nukleinsäure-Reinigung nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll keine Proben-Verschleppung stattfindet.

**Tabelle 7. Probenverteilung (Positiv- und Negativkontrollen) und C<sub>T</sub>-Werte beim Test auf Kreuzkontamination während des Nachweises von Parvovirus-B19-DNA mit dem BioRobot EZ1 DSP**

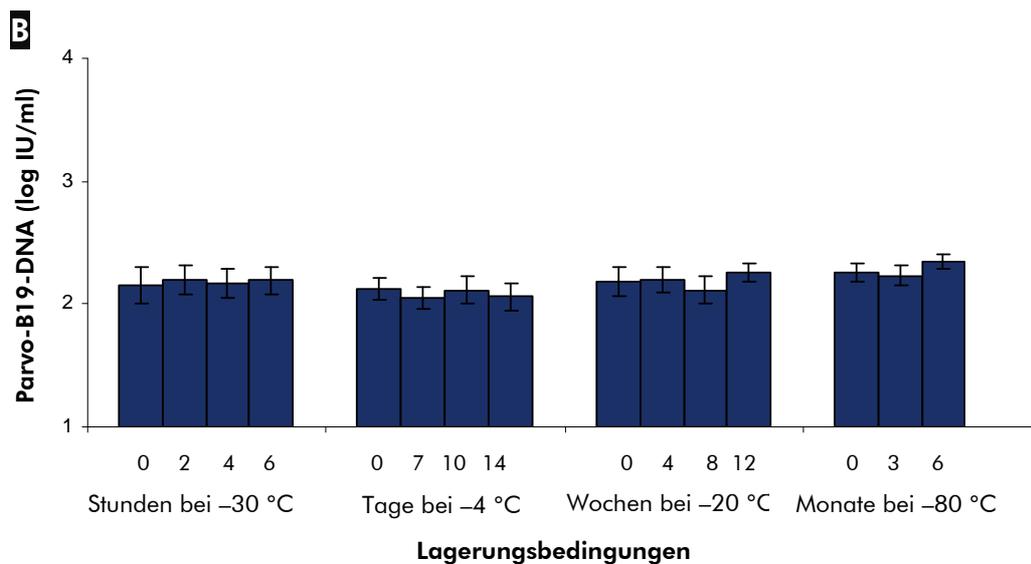
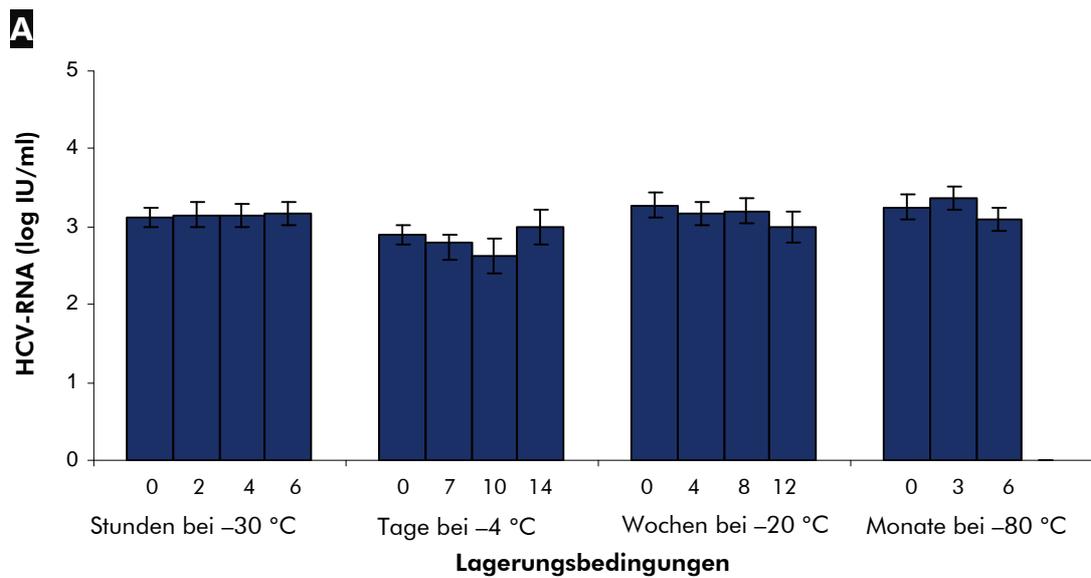
Lauf	Position					
	1	2	3	4	5	6
1	15,47	X	15,41	X	15,36	X
2	X	15,48	X	15,53	X	15,32
3	X	X	X	X	X	X
4	15,35	X	15,2	X	15,27	X
5	X	15,21	X	15,13	X	15,43
6	X	X	X	X	X	X
7	15,62	X	15,48	X	15,23	X
8	X	15,31	X	15,83	X	15,62
9	X	X	X	X	X	X

C<sub>T</sub>-Mittelwert (über alle Proben gemittelt) = 15,40 ± 0,18 (CV = 1,14 %)

X: kein Detektionssignal nach 45 PCR-Zyklen

### RNA- und DNA-Stabilität

Die Stabilität der viralen RNA und DNA in den Eluaten, die mit dem EZ1 DSP Virus Kit erhalten werden, wurde bestimmt. Dazu wurde humanes EDTA-Plasma mit 1 x 10<sup>3</sup> IU/ml HCV-RNA (AcroMetrix OptiQuant<sup>®</sup> HCV RNA) bzw. Parvo-B19-DNA-Standard (VQC) versetzt. Pro Testzeitpunkt und Inkubationsbedingung wurde eine 18-fach-Bestimmung mit dem EZ1 DSP Virus-System durchgeführt. Die erhaltenen Eluate mit Parvo-B19-DNA bzw. HCV-RNA wurden anschließend für bis zu sechs Stunden bei 30 °C, bis zu 14 Tage 4 °C, bis zu zwölf Wochen bei -20 °C und bis zu neun Monate bei -80 °C inkubiert bzw. gelagert (die Studie ist noch nicht abgeschlossen). Die Eluate wurden bzw. werden mit einem laborinternen validierten HCV-RT-PCR-Assay bzw. mit dem *artus*<sup>®</sup> Parvo B19 RG PCR Assay analysiert. Bislang trat bei den 18 Wiederholungen der HCV-RNA-Präparation lediglich ein Ausfall bei der RT-PCR nach einer Lagerung der HCV-RNA für 14 Tage bei 4 °C auf (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4. Stabilität der viralen Nukleinsäuren. Die Stabilität der viralen RNA bzw. DNA in den Eluaten nach Präparation mit dem EZ1 DSP Virus Kit wurde für **A** HCV-RNA und **B** Parvo-B19-DNA ermittelt.**

## Reproduzierbarkeit

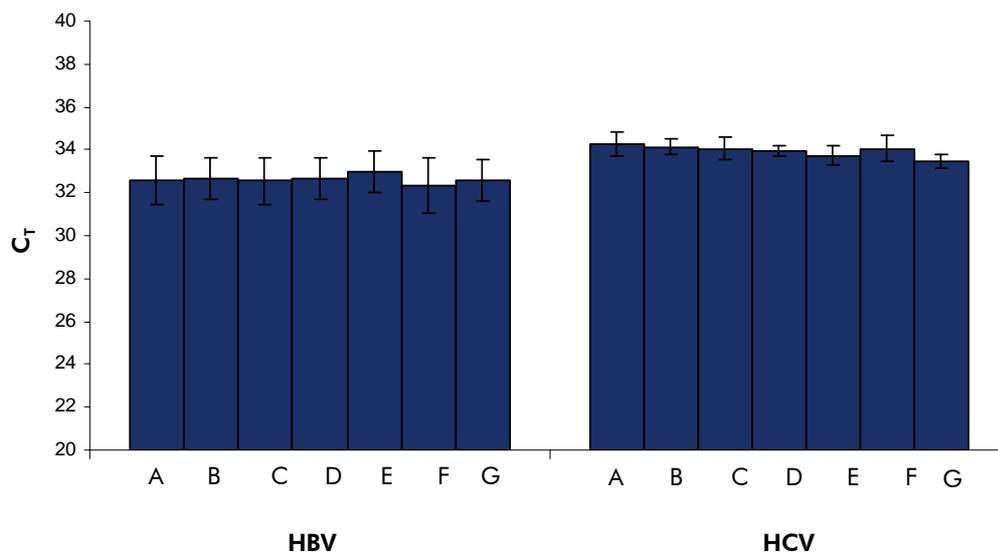
Die Reproduzierbarkeit wurde bestimmt, indem Protokollläufe mit drei BioRobot EZ1 DSP Geräten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt wurden (siehe Tabelle 8 auf der nächsten Seite). Jeder Test (A bis G) wurde als 12-fach-Bestimmung (zwei Läufe à sechs Proben) auf dem BioRobot EZ1 DSP durchgeführt. Dazu wurde humanes EDTA-Plasma mit  $1 \times 10^4$  IU/ml HCV-RNA (AcroMatrix

OptiQuant HCV RNA) bzw.  $1 \times 10^3$  IU/ml HBV-DNA (AcroMetrix OptiQuant HBV DNA) versetzt. Die HBV-DNA wurde mithilfe des *artus*<sup>®</sup> HBV RG PCR Kits und die HCV-RNA unter Verwendung eines laborinternen validierten HCV-RT-PCR-Assays bestimmt.

Das automatisierte Protokoll ist hoch reproduzierbar, wie die vergleichbaren Ergebnisse der an drei verschiedenen Tagen mit drei verschiedenen BioRobot EZ1 DSP Geräten durchgeführten Reinigung der viralen Nukleinsäuren zeigt (siehe Abbildung 5).

**Tabelle 8. Abfolge beim Test auf Reproduzierbarkeit**

Gerät für den Test	Tag 1	Tag 2	Tag 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



**Abbildung 5. Reproduzierbarkeit. Die Reproduzierbarkeit wurde mit drei verschiedenen BioRobot EZ1 DSP Geräten an drei verschiedenen Tagen bestimmt.**

## Urin

Die Leistungsfähigkeit des EZ1 DSP Virus Kits bei der Verarbeitung von Urinproben wurde durch den Vergleich zu Plasmaproben evaluiert, wobei quantifizierte Virus-Standards für CMV (DNA-Virus) und HCV (RNA-Virus), jeweils im betreffenden Probenmaterial verdünnt, verwendet wurden. Urin- und Plasmaproben wurden gemäß den Protokollen im EZ1 DSP Virus Kit-Handbuch verarbeitet, wobei die Nukleinsäure-Präparation mit dem EZ1 DSP Virus Kit aus gleichen Probenvolumina erfolgte. Die viralen Nukleinsäuren wurden mithilfe des *artus*<sup>®</sup> CMV RG PCR Kits bzw. des *artus*<sup>®</sup> HCV RG RT-PCR Kits detektiert. Bei der Leistungsevaluierung des EZ1 DSP Virus Kits ergab sich beim Vergleich von Urin- und Plasmaproben eine Abweichung von lediglich ~ 2 % (auf Grundlage der C<sub>T</sub>-Werte), sowohl bei CMV als auch bei HCV (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9. Vergleich des EZ1 DSP Virus-Protokolls bei Verarbeitung von Urin- und Plasmaproben**

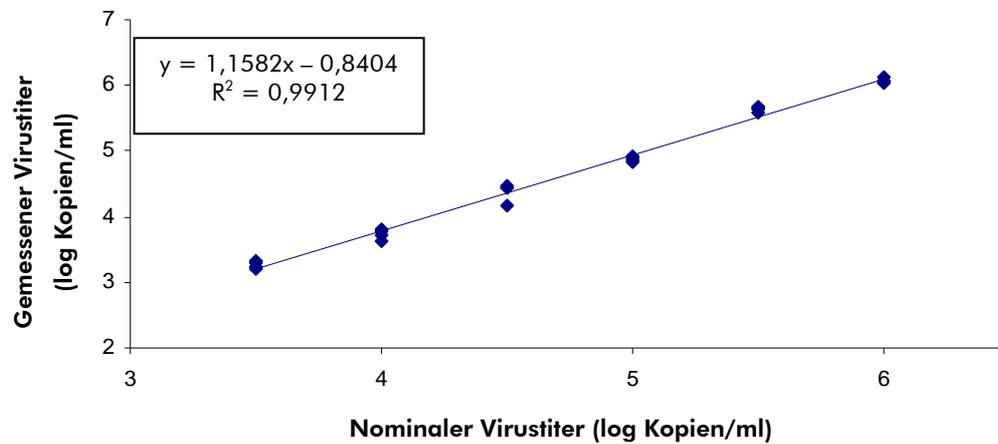
Probentyp	Präparationen (n)	C <sub>T</sub> -Wert	Verhältnis Urin/Plasma (C <sub>T</sub> -Wert)	Virustiter (Kopien/ml)	Verhältnis Urin/Plasma (Kopien/ml)
<b>CMV</b>					
Urin	4	31,60	0,98	6250	1,51
Plasma	5	32,17		4130	
<b>HCV</b>					
Urin	4	37,83	1,02	278	0,77
Plasma	5	37,25		363	

# Vollblut

## Linearer Wertebereich

Der lineare Wertebereich des EZ1 DSP Virus Kits wurde für das DNA-Virus HBV bestimmt. Dazu wurden Verdünnungsreihen von zuvor quantifizierten Virus-Standards in EBV-negativem humanem Vollblut hergestellt. Die Tests mit sechs verschiedenen Konzentrationsstufen wurden als 4-fach-Bestimmung durchgeführt. Die Isolierung der viralen Nukleinsäuren erfolgte aus einem Ausgangsvolumen von 200 µl Vollblut (gemischt mit 200 µl Puffer ATL\*); eluiert wurde mit 60 µl Elutionspuffer (AVE). Der lineare Wertebereich des EZ1 DSP Virus-Protokolls wurde für EBV mit dem *artus*<sup>®</sup> EBV RG PCR Kit als Nachweis-Assay und dem Rotor-Gene Q Thermocycler bestimmt (siehe Abbildung 6).

\*QIAGEN GmbH, Kat.-Nr. 939016



**Abbildung 6. Linearer Wertebereich der Ausbeute bei der Präparation der EBV-Nukleinsäuren aus Vollblutproben nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll in Kombination mit dem *artus*<sup>®</sup> EBV RG PCR Nachweis-Assay.**

## Präzision

Die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (CVs) bei Vollblutproben wurden für CMV mit dem *artus*<sup>®</sup> CMV RG PCR Kit und dem Rotor-Gene Q Thermocycler bestimmt. Die Daten zur Inter-Assay-Präzision sind in Tabelle 10 wiedergegeben. Die von 13 Blutspendern gewonnenen Vollblutproben wurden als 5-fach-Bestimmung in verschiedenen Läufen mit dem EZ1 Advanced XL verarbeitet. Die Isolierung der viralen Nukleinsäuren erfolgte aus einem Ausgangsvolumen von 200 µl Vollblut (gemischt mit 200 µl Puffer ATL\*); eluiert wurde mit 120 µl Elutionspuffer (AVE).

\*QIAGEN GmbH, Kat.-Nr. 939016

**Tabelle 10. Inter-Assay-Präzision des EZ1 DSP Virus-Protokolls in Kombination mit dem *artus*<sup>®</sup> CMV RG PCR Kit als Nachweis-Assay bei der Präparation der CMV-Nukleinsäuren aus Vollblutproben**

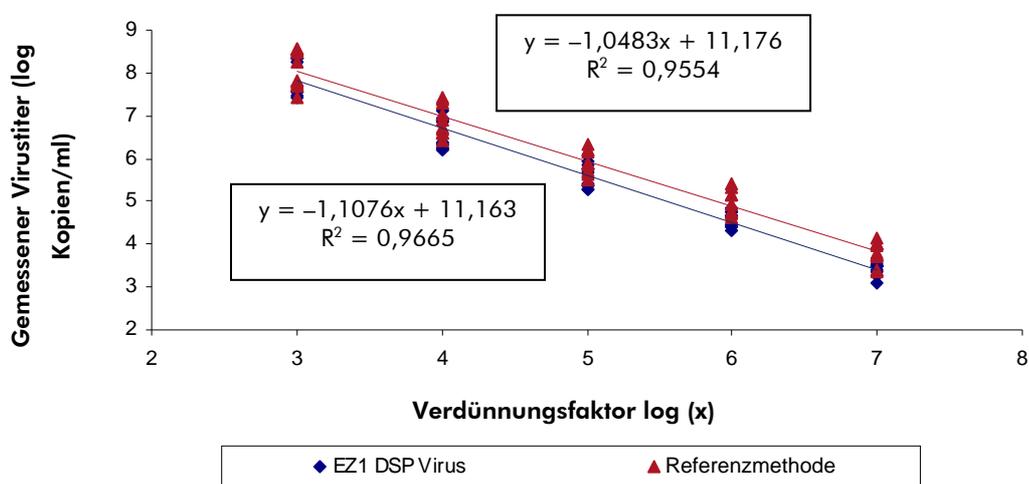
Spender	Präparationen (n)	Virustiter (Kopien/ml)	CV (%)	log Kopien/ml	SD (log Kopien/ml)
1	5	7209	13	3,86	0,06
2	5	7404	24	3,87	0,10
3	5	7313	14	3,86	0,06
4	5	7185	17	3,86	0,08
5	5	7803	28	3,89	0,12
6	5	7257	39	3,86	0,17
7	5	7870	20	3,90	0,08
8	5	7583	26	3,88	0,12
9	5	8571	24	3,93	0,10
10	5	7177	30	3,86	0,13
11	5	8294	24	3,92	0,11
12	5	7790	21	3,89	0,10
13	5	7627	27	3,88	0,13

# Stuhl

## Linearer Wertebereich

Der lineare Wertebereich des EZ1 DSP Virus Kits wurde für das Adenovirus 5 (DNA-Virus) bestimmt. Für die Tests wurden serielle Verdünnungen (Verdünnungsfaktor 10) von Zellkulturüberständen in Adenovirus-negativen Stuhlproben hergestellt. Die Tests mit fünf verschiedenen Virustiter-Verdünnungen wurden als 10-fach-Bestimmung durchgeführt. Die Isolierung der viralen Nukleinsäuren erfolgte aus einem Ausgangs-Probenvolumen von 200 µl (1:10 in Puffer ASL\* resuspendiert); eluiert wurde mit 120 µl Elutionspuffer (AVE). Der lineare Wertebereich des EZ1 DSP Virus-Protokolls wurde mit dem Adenovirus R-Gene™ PCR Nachweis-Assay (Argene SA, Frankreich, Bestellnr. 96-010B) und dem Rotor-Gene Q Thermocycler im Vergleich zu einer Referenz-Isolierungsmethode bestimmt (siehe Abbildung 7).

\*QIAGEN GmbH, Kat.-Nr. 19082



**Abbildung 7. Linearer Wertebereich der Ausbeute bei der Präparation der Adenovirus-5-Nukleinsäure aus Stuhlproben nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll in Kombination mit dem Adenovirus R-Gene™ PCR Nachweis-Assay.**

## Präzision

Die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (CVs) bei Stuhlproben wurden für Adenovirus 5 mit dem Adenovirus R-Gene™ PCR Assay (Argene SA, Frankreich, Bestellnr. 96-010B) und dem Rotor-Gene Q Thermocycler bestimmt. Adenovirus-negative Stuhlproben wurden mit Adenovirus-5-haltigem Zellkulturüberstand versetzt („gespikt“). Die Isolierung der viralen DNA erfolgte dann aus 200-µl-Proben (1:10 in Puffer ASL\* resuspendiert); eluiert wurde mit 120 µl Elutionspuffer (AVE). Sieben EZ1-Protokolldurchläufe (jeweils als 9- oder 10-fach-Bestimmung) wurden an drei Tagen mit drei verschiedenen EZ1 Advanced XL Geräten und drei unterschiedlichen Chargen-Kombinationen aus EZ1 DSP Virus Kit und Buffer ASL durchgeführt. Alle Proben wurden dann im selben PCR-Lauf analysiert. Die Daten zur Präzision (siehe Tabelle 11) wurden unter

Berücksichtigung der Ergebnisse von verschiedenen Geräten, an unterschiedlichen Tagen, mit verschiedenen Chargen und aller EZ1-Protokolldurchläufe insgesamt berechnet.

\*QIAGEN GmbH, Kat.-Nr. 19082

**Tabelle 11. Präzision bei der Isolierung der Adenovirus-5-Nukleinsäure aus Stuhlproben nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll in Kombination mit dem Adenovirus R-Gene™ PCR Nachweis-Assay**

Lauf	Präparationen (n)	Kopien/ml	log Kopien/ml	SD (log Kopien/ml)	CV Kopien/ml (%)				
					Intra-Assay-Präz.	3 Adv. XL	3 Tage	3 Chargen	Gesamt
1	9	3530	3,46	0,22	48	80	59	47	66
2	9	2955	3,42	0,19	38	–	–	–	–
3	9	2226	3,26	0,35	43	–	–	–	–
4	9	2385	3,35	0,23	54	–	–	–	–
5	9	604	2,69	0,24	54	–	–	–	–
6	9	1214	3,06	0,21	53	–	–	–	–
7	10	1702	3,19	0,26	48	–	–	–	–

## Korrelationsbestimmung

Für das EZ1 DSP Virus-Protokoll wurde eine Untersuchung der Korrelation im Vergleich zu einer Referenzmethode für die Isolierung der Norovirus-Nukleinsäure (Genogruppe II) aus 66 Patienten-Stuhlproben durchgeführt. Die Isolierung der viralen Nukleinsäuren erfolgte aus einem Ausgangs-Probenvolumen von 200 µl (1:10 in Puffer ASL\* resuspendiert); eluiert wurde mit 120 µl Elutionspuffer (AVE). Die Analyse erfolgte mit einem firmeneigenen RT-PCR-Assay gegen die Norovirus-Genogruppe II (siehe Tabelle 12).

\*QIAGEN GmbH, Kat.-Nr. 19082

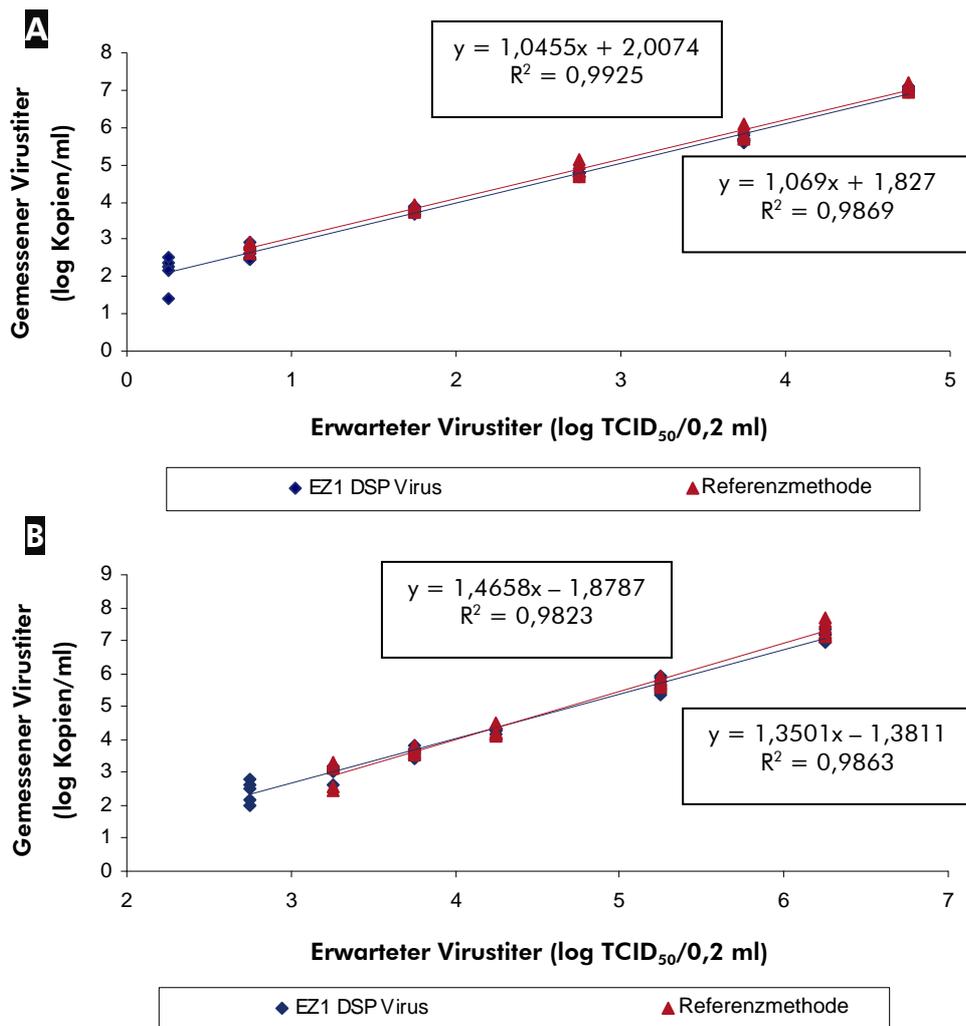
**Tabelle 12. Korrelation zwischen der Nukleinsäure-Isolierung nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll und einer Referenzmethode**

		Referenz		
		Positiv	Negativ	Gesamt
EZ1 DSP Virus	Positiv	34	15	49
	Negativ	1	16	17
	Gesamt	35	31	66

## Transportmedien

### Linearer Wertebereich

Der lineare Wertebereich des EZ1 DSP Virus Kits wurde für die Isolierung der HSV-1- und *Chlamydia-trachomatis*-Nukleinsäuren (*C. trachomatis*) aus PreservCyt® Medium (Cytoc Corporation, Bestellnr. 0200011) ermittelt. Dazu wurden Verdünnungsreihen von zuvor quantifizierten Virus-Standards in Transportmedium hergestellt. Die Tests mit sechs verschiedenen Konzentrationsstufen wurden jeweils als 5- oder 6-fach-Bestimmung durchgeführt. Der lineare Wertebereich des EZ1 DSP Virus Kits wurde vergleichend zu einer Referenzmethode mit dem artus® HSV1/2 TM PCR Assay bzw. mit dem artus® *C. trachomatis* TM PCR Assay bestimmt (siehe Abbildung 8). Die Präparation der viralen Nukleinsäuren wurde mit 200- $\mu$ l-Proben durchgeführt; die Elution erfolgte mit 90  $\mu$ l Elutionspuffer (AVE).



**Abbildung 8. Linearer Wertebereich der Ausbeute bei der Isolierung von HSV-1- bzw. C. trachomatis-Nukleinsäure aus Transportmedium nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll in Kombination mit dem artus® C. trachomatis PCR Assay (A) bzw. dem artus® HSV1/2 TM PCR (B) Assay. Die Untersuchung wurde im Vergleich zu einer Referenzmethode durchgeführt.**

## Präzision

Die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (CVs) bei Transportmedien als Ausgangsmaterial wurden für HSV-1 und C. trachomatis mit dem artus® HSV1/2 TM PCR Assay bzw. mit dem artus® C. trachomatis TM PCR Assay bestimmt. Die Präparation der viralen und bakteriellen DNA wurde mit 400- $\mu$ l-Proben des Transportmediums durchgeführt; die Elution erfolgte mit 60  $\mu$ l Elutionspuffer (AVE). Die Präparation erfolgt mit fünf Transportmedien, jeweils als 12-fach-Bestimmung, in sechs EZ1-Protokolldurchläufen an drei Tagen und mit drei verschiedenen Chargen des EZ1 DSP Virus Kits. Alle Proben wurden dann im selben PCR-Lauf analysiert. Die Laborpräzision für C. trachomatis (siehe Tabelle 13) und HSV-1 (siehe Tabelle 14) wurde unter

Berücksichtigung aller Wiederholproben für jedes Transportmedium (verschiedene EZ1-Läufe, Tage und Chargen) berechnet.

**Tabelle 13. Präzision bei der Isolierung der *C.-trachomatis*-Nukleinsäure aus Transportmedien nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll in Kombination mit dem artus® *C. trachomatis* RG PCR Assay**

Medium	Präparationen (n)	Nominaler Titer log TCID <sub>50</sub> /0,2 ml	Gemessener Titer Kopien/ml	Laborpräzision CV Kopien/ml (%)	Gemessener Titer log Kopien/ml	SD (log Kopien/ml)
<sup>1</sup> QIAGEN STM	12	3,75	61.623	10	4,79	0,05
<sup>2</sup> Remel M4RT®	12	3,75	79.630	10	4,90	0,05
<sup>3</sup> PreservCyt®	12	3,75	54.749	9	4,74	0,04
<sup>4</sup> BD Surepath®	12	3,75	56.312	18	4,74	0,08
<sup>5</sup> Copan UTM	12	3,75	76.099	9	4,88	0,04

<sup>1</sup> QIAGEN GmbH, Kat.-Nr. 5123-1220; <sup>2</sup> Thermo Fisher Scientific Group, Bestellnr. R12505; <sup>3</sup> Cytoc Corp., Bestellnr. 0200011; <sup>4</sup> Becton, Dickinson and Company, Bestellnr. GYN-0001-V; <sup>5</sup> Copan Diagnostics Inc., Kat.-Nr. 330C

**Tabelle 14. Präzision bei der Isolierung der HSV-1-Nukleinsäure aus Transportmedien nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll in Kombination mit dem artus® HSV1/2 RG PCR Assay**

Medium	Präparationen (n)	Nominaler Titer log TCID <sub>50</sub> /0,2 ml	Gemessener Titer Kopien/ml	Laborpräzision CV Kopien/ml (%)	Gemessener Titer log Kopien/ml	SD (log Kopien/ml)
<sup>1</sup> QIAGEN STM	12	4,25	16.615	47	4,17	0,21
<sup>2</sup> Remel M4RT®	12	4,25	17.433	38	4,21	0,20
<sup>3</sup> PreservCyt®	12	4,25	13.494	41	4,09	0,19
<sup>4</sup> BD Surepath®	12	4,25	17.013	58	4,16	0,28
<sup>5</sup> Copan UTM	12	4,25	15.999	39	4,17	0,18

<sup>1</sup> QIAGEN GmbH, Kat.-Nr. 5123-1220; <sup>2</sup> Thermo Fisher Scientific Group, Bestellnr. R12505; <sup>3</sup> Cytoc Corp., Bestellnr. 0200011; <sup>4</sup> Becton, Dickinson and Company, Bestellnr. GYN-0001-V; <sup>5</sup> Copan Diagnostics Inc., Kat.-Nr. 330C

## Klinische Leistungsfähigkeit (HPV)

Aliquots von DNA, die aus insgesamt 108 Proben – davon 50 in STM gesammelte HC2-positive Proben, 50 in PreservCyt® gesammelte HC2-positive Proben sowie 8 HC2-negative Proben in STM – wurden mit dem *digene*® HPV Genotyping RH Test (Kat.-Nr. 613413) und dem *digene*® HPV Genotyping LQ Test (Kat.-Nr. 613215) im Vergleich zur RLB-Methode der Freien Universität Amsterdam\* analysiert.

Die Ergebnisse wurden wie folgt klassifiziert: identisch (100%ige Übereinstimmung der Genotypen), kompatibel (mindestens ein Genotyp gleich bestimmt) oder widersprüchlich (keine übereinstimmenden Genotypen). Diskrepanzen (nicht übereinstimmende Genotypisierungsergebnisse) wurden geklärt, indem beide Assays wiederholt wurden. Bei weiterhin bestehender Diskrepanz wurde nachfolgend eine weitere Analyse mit einem dritten empfindlichen HPV-Detektions- und Genotypierungs-Assay [SPF10-LiPA25 (Version1)] durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten ein insgesamt sehr niedriges Diskrepanzniveau (2 %) nach Klärung von anfänglich nicht übereinstimmenden Ergebnissen, die mit beiden Genotypierungs-Assays im Vergleich zur Referenzmethode erhalten worden waren (siehe Tabelle 15.)

**Tabelle 15. Vergleich des *digene* HPV Genotyping RH Tests (A) und des *digene* HPV Genotyping LQ Tests (B) mit dem RLB-System der Freien Universität Amsterdam\* bei Isolierung der HPV-Nukleinsäure aus Transportmedium nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll**

Art des Ergebnisses	A	B
	% der klinischen Proben	% der klinischen Proben
Identisch	80	58
Kompatibel	18	12
Nicht übereinstimmend	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.

## Klinische Leistungsfähigkeit (Influenza A)

Zum Nachweis der klinischen Leistungsfähigkeit wurden 102 charakterisierte Nasen-/Rachen-Abstrichproben, gesammelt in UTM (Copan Diagnostics Inc., Kat.-Nr. 330C), unter Verwendung des EZ1 DSP Virus Kits für die Nukleinsäure-Isolierung evaluiert. Influenza-A-RNA wurde mithilfe des *artus*<sup>®</sup> Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR Kits und des für den Notfalleinsatz zugelassenen Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR Tests (siehe Tabelle 16) detektiert.

**Tabelle 16. Vergleich des *artus*<sup>®</sup> Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR Kits mit dem für Notfalleinsätze zugelassenen Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR Test nach Verwendung des EZ1 DSP Virus Kit für die Isolierung der saisonalen Influenza-A- und der 2009-H1N1-Influenza-Virus-RNA aus Nasen-/Rachen-Abstrichproben**

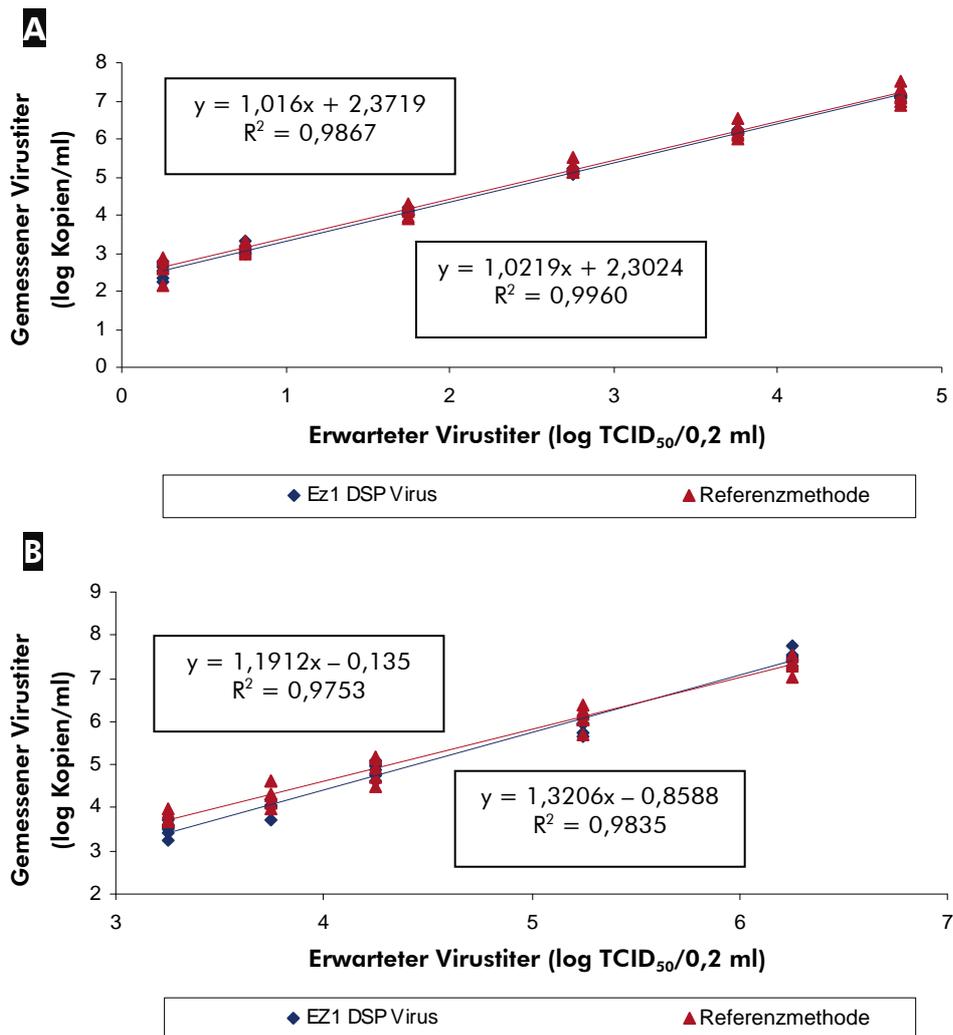
		Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR			
		Positiv für saisonale Infl. A	Positiv für 2009 H1N1	Negativ	Gesamt
<i>artus</i> <sup>®</sup> Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR	Positiv für saisonale Infl. A	5	0	2	7
	Positiv für 2009 H1N1	0	27	1	28
	Negativ	0	0	67	67
	<b>Gesamt</b>	5	27	70	102

## Getrocknete Abstriche

### Linearer Wertebereich

Der lineare Wertebereich des EZ1 DSP Virus Kits wurde für die Isolierung der HSV-1- und *Chlamydia-trachomatis*-Nukleinsäuren (*C. trachomatis*) aus Puritan Baumwoll-Abstrichtupfern (Puritan Medical Products Co. LLC, Bestellnr. 25-806 1PC) ermittelt. Die Analysen wurden mit Verdünnungen von zuvor quantifiziertem Standard-Probenmaterial durchgeführt. Negativer Humanspeichel wurde mit Erregermaterial versetzt („gespikt“) und auf den Abstrich-Tupfer übertragen. Nach Trocknung wurden die Erreger durch Resuspendieren in 600 µl Puffer ATL\* wieder aus den getrockneten Tupfern isoliert. Die Tests mit sechs verschiedenen Konzentrationsstufen wurden jeweils als 5- oder 6-fach-Bestimmung durchgeführt. Der lineare Wertebereich des EZ1 DSP Virus Kits wurde vergleichend zu einer Referenzmethode mit dem *artus*<sup>®</sup> HSV1/2 TM PCR Assay bzw. mit dem *artus*<sup>®</sup> *C. trachomatis* TM PCR Assay bestimmt (siehe Abbildung 9). Die Isolierung der viralen Nukleinsäuren wurde mit 400-µl-Proben durchgeführt; die Elution erfolgte mit 150 µl Elutionspuffer (AVE).

\*QIAGEN GmbH, Kat.-Nr. 939016



**Abbildung 9. Linearer Wertebereich der Ausbeute bei der Isolierung von *C.-trachomatis*- bzw. HSV-1-Nukleinsäure aus getrockneten Abstrich-Tupfern nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll in Kombination mit dem artus® *C. trachomatis* PCR Assay (A) bzw. dem artus® HSV1/2 TM TM PCR (B) Assay. Die Untersuchung wurde im Vergleich zu einer Referenzmethode durchgeführt.**

## Präzision

Die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (CVs) bei getrockneten Abstrich-Tupfern als Ausgangsmaterial wurden für HSV-1 und *C. trachomatis* mit dem artus® HSV1/2 TM PCR Assay bzw. mit dem artus® *C. trachomatis* TM PCR Assay bestimmt. Beflockte Abstrich-Tupfer von Copan (Copan Italia S.p.A., Kat.-Nr. 502CS0) und Puritan Baumwoll-Abstrich-Tupfer (Puritan Medical Products Co. LLC, Bestellnr. 25-806 1PC) wurden zur oben beschriebenen Präparation und Vorbehandlung getrockneter Abstrich-Tupfer verwendet. Die virale und bakterielle DNA wurde aus

einem Probenvolumen von 400  $\mu$ l isoliert und mit 60  $\mu$ l Elutionspuffer (AVE) eluiert. Die Nukleinsäure-Isolierung erfolgte aus gespikten Speichelproben dreier Spender, jeweils in 8- oder 9-fach-Bestimmung, in sechs EZ1-Protokolldurchläufen an drei Tagen und mit drei verschiedenen Kombinationen aus EZ1 DSP Virus Kit und Puffer ATL. Alle Proben wurden dann im selben PCR-Lauf analysiert. Die Laborpräzision für *C. trachomatis* (siehe Tabelle 17) und HSV-1 (siehe Tabelle 18) wurde unter Berücksichtigung aller Wiederholproben für jeden Spender und Typ des Abstrich-Tupfers (verschiedene EZ1-Läufe, Tage und Chargen) berechnet.

**Tabelle 17. Präzision bei der Isolierung der *C.-trachomatis*-Nukleinsäure aus getrockneten Abstrich-Tupfern nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll in Kombination mit dem artus® *C. trachomatis* RG PCR Assay**

Typ Abstrich- Tupfer	Spender	Präpara- tionen (n)	Nominaler	Gemessener	Laborpräzision	Gemessener	SD
			Titer log TCID <sub>50</sub> / 0,2 ml				
Baumwoll- Tupfer (Puritan)	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
Beflockte Tupfer (Copan)	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

**Tabelle 18. Präzision bei der Isolierung der HSV-1-Nukleinsäure aus getrockneten Abstrich-Tupfern nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll in Kombination mit dem artus® HSV1/2 RG PCR Assay**

Typ Abstrich- Tupfer	Spender	Präpara- tionen (n)	Nominaler	Gemessener	Laborpräzision	Gemessener	SD
			Titer log TCID <sub>50</sub> / 0,2 ml				
Baumwoll- Tupfer (Puritan)	1	9	3,75	5843	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
Beflockte Tupfer (Copan)	1	8	3,75	6215	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

## Respiratorische Proben (Sputum)

### Korrelationsbestimmung

Für das EZ1 DSP Virus-Protokoll wurde eine Untersuchung der Korrelation im Vergleich zu einer Referenzmethode für die Isolierung der *Mycobacterium-tuberculosis*-Nukleinsäure aus negativen humanen Sputumproben durchgeführt. Eine Verdünnungsreihe mit vier verschiedenen Virustitern wurde als Einfachbestimmung im Vergleich zur Referenzmethode analysiert. Die bakterielle DNA wurde aus 200 µl Sputum, das mit Sputasol (Oxoid Limited, Bestellnr. SR0233) und Lysozym (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. L6876) – wie im EZ1 DSP Virus Handbuch Version 4 beschrieben – vorbehandelt worden war, isoliert und mit 90 µl Elutionspuffer (AVE) eluiert. Der anschließende Nachweis wurde mit dem *artus*<sup>®</sup> M. tuberculosis RG PCR Assay (siehe Abbildung 10).

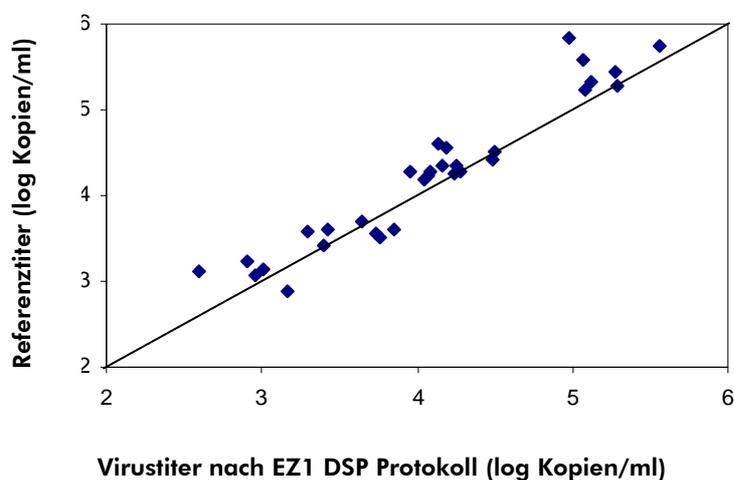


Abbildung 10. Korrelation zwischen der Nukleinsäure-Isolierung nach dem EZ1 DSP Virus-Protokoll und einer Referenzmethode.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit-Handbuch oder Geräte-Handbuch. QIAGEN Kit- und Geräte-Handbücher stehen unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) zur Verfügung oder können Sie vom QIAGEN Technischen Service oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor anfordern.

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

Februar 2011 © 2011 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

Australien ■ 1-800-243-800

Belgien ■ 0800-79612

China ■ 021-51345678

Dänemark ■ 80-885945

Deutschland ■ 02103-29-12000

Finnland ■ 0800-914416

Frankreich ■ 01-60-920-930

Hongkong ■ 800 933 965

Irland ■ 1800 555 049

Italien ■ 800 787980

Japan ■ 03-5547-0811

Kanada ■ 800-572-9613

Luxemburg ■ 8002 2076

Niederlande ■ 0800 0229592

Norwegen ■ 800-18859

Österreich ■ 0800/281010

Schweden ■ 020-790282

Schweiz ■ 055-254-22-11

Singapur ■ 65-67775366

Spanien ■ 91-630-7050

Südkorea ■ 1544 7145

UK ■ 01293-422-911

USA ■ 800-426-8157



---

Sample & Assay Technologies