

Kit EZ1[®] DSP Virus

O desempenho do sistema EZ1 DSP Virus foi estabelecido em estudos de avaliação de desempenho utilizando plasma, soro, LCR, urina, sangue total, fezes, fluidos de transporte, secreções secas e amostras respiratórias para o isolamento de ácidos nucleicos virais e ADN bacteriano. Os testes foram conduzidos segundo os protocolos descritos na actual versão 4 do manual do EZ1 DSP Virus.

Porém, o desempenho do kit não está garantido para cada espécie de vírus ou bactéria e deve ser validado pelo utilizador. É da responsabilidade do utilizador validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos utilizados no seu laboratório que não estejam abrangidos pelos estudos de avaliação de desempenho da QIAGEN.

Características de desempenho

Soro e plasma

Intervalo linear

O intervalo linear do kit EZ1 DSP Virus foi avaliado para os vírus de RNA-VHC e HIV-1 e o vírus de DNA-VHB. Os testes foram efectuados com diluições de painéis de vírus quantificados realizados em plasma ou soro humanos negativos ao VHB, VHC e HIV-1. Foram testadas séries de diluição com seis títulos de vírus diferentes com 12 replicados cada. O intervalo linear do procedimento do kit EZ1 DSP Virus foi determinado para o VHB, VHC e HIV-1 com os testes de carga viral Abbott RealTime (Figura 1). Foram adicionados controlos internos RealTime (17 μ l cada) directamente a cada amostra de HIV-1 ou VHC antes da extracção. Para o RealTime HBV, o controlo interno 3,4 μ l RealTime HBV foi combinado com RNA portador para cada amostra. Os ácidos nucleicos virais foram extraídos a partir de amostras de 400 μ l e eluídos no tampão de eluição (AVE) de 90 μ l. A PCR foi realizada no Abbott m2000rt.



Tabela 1. Fonte da amostra e testes a jusante utilizados para determinar o intervalo linear dos rendimentos com o protocolo EZ1 DSP Virus

Vírus	Fonte	Ensaio a jusante	Manual do teste utilizado
HIV-1	BBI (Boston Biomedica, Inc., Boston, USA) VIH defeituoso, plasma recalificado da BBI	Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HIV-1
HCV	ProMedDx (ProMedDx LLC Norton, MA, USA) amostra dum paciente, soro humano normal agrupado	Abbott RealTime HCV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HCV
HBV	Teragenix (Teragenix Coporate, Ft. Lauderdale, FL, USA) amostra dum paciente , plasma humano recalificado	Abbott RealTime HBV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HBV

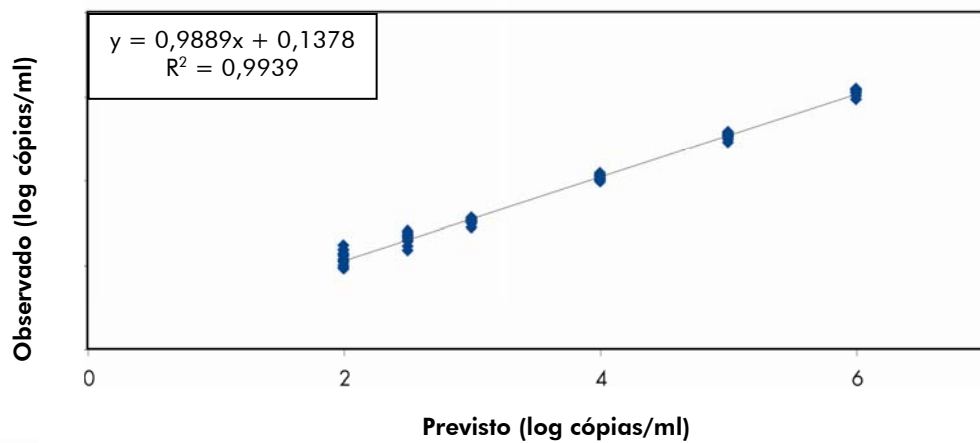
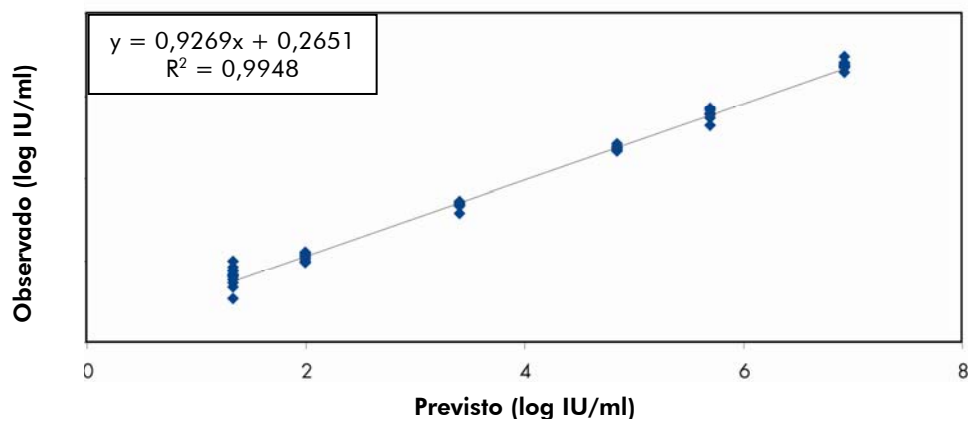
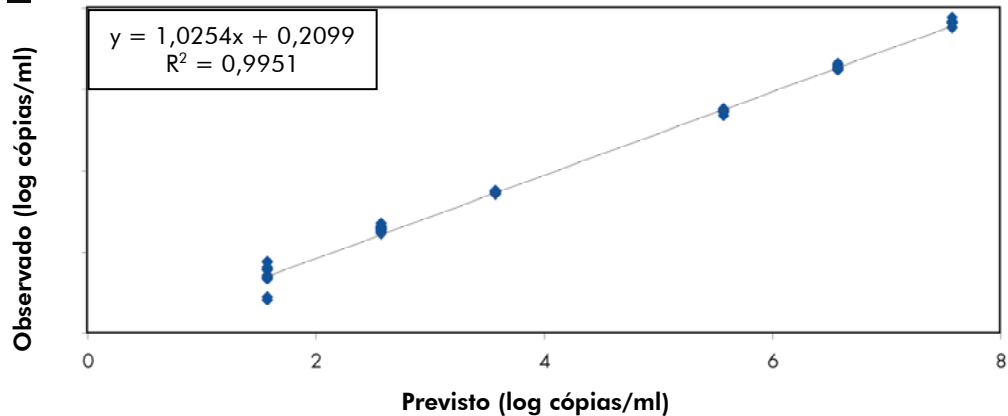
A**B****C**

Figura 1. Intervalo linear dos rendimentos utilizando o protocolo EZ1 DSP Virus. O intervalo linear do protocolo EZ1 DSP Virus foi determinado utilizando series de diluições virais e testes de depistagem da Abbott RealTime (Tabela 1) **A** para HIV-1, **B** para HCV, e **C** para HBV.

Precisão

Os desvios padrão e os coeficientes de variação (CVs) foram determinados para séries de diluição de HIV-1, HCV e HBV no intervalo linear dos testes a jusante apropriados. Para a análise da precisão ou para obter mais precisão, foram utilizados os mesmos testes a jusante utilizados para a determinação do intervalo linear (Tabela 1). Os dados do inter-teste de precisão são apresentados nas Tabelas 2–4. Para cada membro do painel, foram extraídos 12 replicados em 12 execuções separadas no BioRobot EZ1 DSP. O PCR foi realizado em 2 execuções de 6 replicados cada no Abbott m2000rt.

Tabela 1. Precisão inter-teste do protocolo EZ1 DSP Virus utilizando o teste Abbott RealTime HIV-1

Membro do painel	n	Cópias/ml	CV (%)	log cópias/ml	SD (log cópias/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

Tabela 2. Precisão inter-teste do protocolo EZ1 DSP Virus utilizando o teste de depistagem Abbott RealTime HCV-1

Membro do painel	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

Tabela 4. Precisão inter-teste do protocolo EZ1 DSP Virus utilizando o teste de depistagem Abbott RealTime HBV-1

Membro do painel	n	Cópias/ml	CV (%)	log cópias/ml	SD (log cópias/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

Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado pelo valor probit de 95 % para o sistema DSP EZ1 virus utilizando o padrão internacional da OMS para o vírus HIV-1 97/656, o padrão internacional da OMS para o vírus HBV 97/746 e pela quantificação do sobrenadante da cultura de células CMV. O limite de detecção foi determinado pelo processamento de séries de diluição dos vírus apropriados. Os vírus foram diluídos em pool de plasma EDTA humano normal HIV-, HBV-, e CMV-negativo. Cada passo da diluição foi preparado em pelo menos 3 execuções independentes com pelo menos 6 replicados por diluição. Foram utilizados 400 µl de plasma para a preparação das amostras no BioRobot EZ1 DSP com eluição em 60 µl.

Foram utilizados kits de PCR *artus*[®] HBV para a detecção de DNA do HBV e kits de PCR *artus* CMV para a detecção de DNA do CMV. As amostras foram analisadas num instrumento LightCycler[®] 1.2 (Roche), num Rotor-Gene[®] 3000 (Corbett Research) e num ABI PRISM[®] 7000 SDS (Applied Biosystems). Foi utilizado o teste COBAS[®] Amplicor[®] HIV-1Monitor[®] (versão 1.5) para a detecção de RNA do HIV utilizando o analisador COBAS Amplicor. Os dados combinados para todas as amostras foram avaliados utilizando a análise ou método probit. Os dados são apresentados nas Tabelas 5–6, com os pontos ou gráficos probit representativos nas Figuras 2–3.

Tabela 3. Limite de detecção de DNA do HBV e CMV utilizando o sistema EZ1 DSP Virus e os kits *artus* PCR

Vírus	Título de entrada	Alvos (LightCycler)	Alvos (Rotor-Gene)	Alvos (ABI PRISM)
HBV	Valor probit de 95% (IU/ml)	45,7	14,4	13,2
	Intervalo de confiança (IU/ml)	28–102	9,5–26,5	9,0–23,1
CMV	Valor probit de 95% (cópias/ml)	67,2	21,8	38,3
	Intervalo de confiança (cópias/ml)	41,8–142	14,5–44,1	21,5–89,8

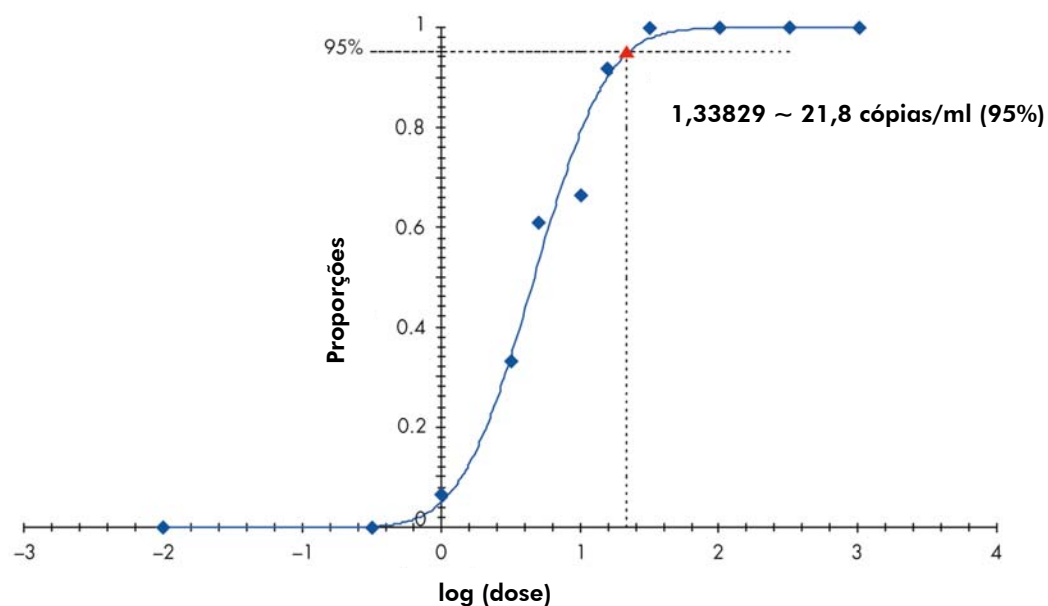


Figura 2. Análise ou método probit para detecção de DNA de CMV utilizando o sistema EZ1 DSP Virus e o kit *artus* CMV RG PCR. Os ácidos nucleicos virais foram purificados utilizando o EZ1 DSP Virus system, e o kit *artus* CMV PCR RG foi utilizado para a detecção de DNA de CMV no Rotor-Gene 3000. O valor probit de 95% foi 21,8 cópias/ml.

Tabela 4. Limite de detecção de RNA de HIV utilizando o EZ1 DSP Virus system e o teste COBAS AmpliCor HIV-1 Monitor, versão 1.5

Título de entrada (IU/ml)	Alvos
Valor probit de 95% (IU/ml)	114,5
Intervalo de confiança (IU/ml)	82,9–194,3

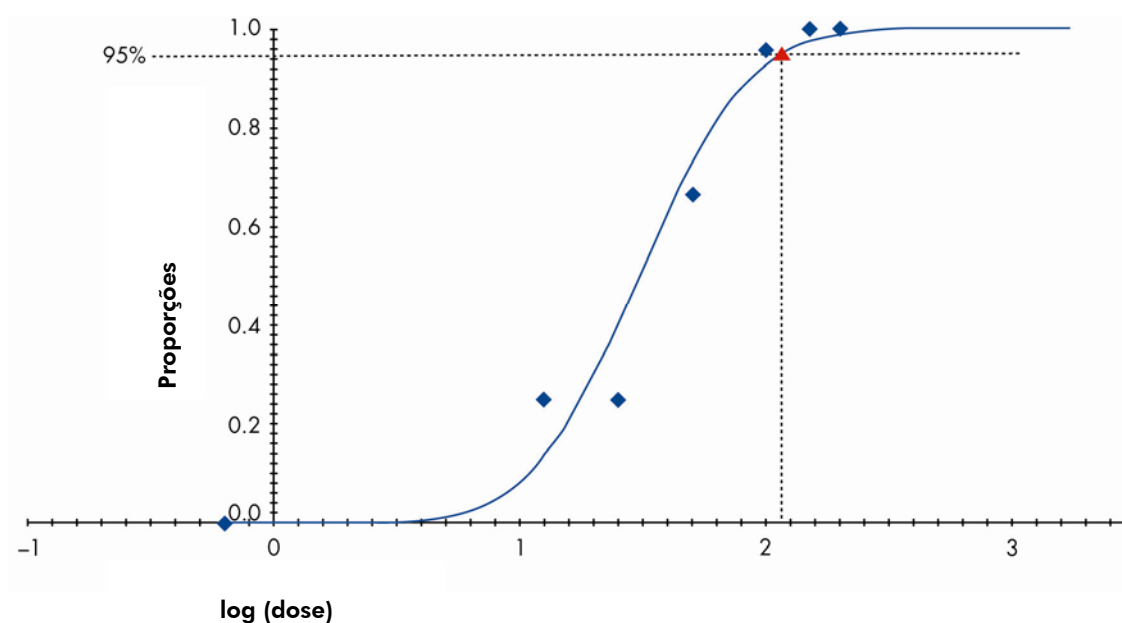


Figura 3. Análise ou método probit para detecção de RNA de HIV utilizando o EZ1 DSP Virus system e o teste COBAS AmpliCor HIV-1 Monitor, versão 1.5. Os ácidos nucleicos virais foram purificados utilizando o EZ1 DSP Virus system, com uma amostra de entrada de 400 µl e 60 µl de eluição. O teste COBAS AmpliCor HIV-1 Monitor foi utilizado para a detecção de RNA de HIV no modo ultrasensível do analisador COBAS AmpliCor. O valor probit de 95% foi 114,5 IU/ml.

Exclusão de “carry-over” de amostras

Foram executadas ou efectuadas nove execuções para cada nos instrumentos BioRobot EZ1 DSP, EZ1 Advanced e EZ1 Advanced XL para avaliar os riscos eventuais de contaminação cruzada durante e entre procedimentos do EZ1 DSP. Os testes foram efectuados utilizando uma amostra de parvovirus B19 quantificada dum paciente. A carga viral de amostras positivas utilizada no teste de “carry-over” foi de $1,0 \times 10^8$ IU/ml. Para a diluição das amostras positivas e das amostras de controlo negativo, foi utilizado um pool de plasma EDTA negativo de parvovirus humano B19.

Para detectar o “carry-over” amostra a amostra foram efectuadas 2 execuções em cada instrumento com uma definição de verificação alternativa de amostras negativas e altamente positivas. Cada terceira execução foi efectuada utilizando todas as amostras negativas para

monitorizar possíveis “carry-over” execução a execução. Esta definição de amostra foi repetida três vezes resultando num total de nove execuções para cada instrumento. O DNA do parvovirus B19 foi detectado e quantificado utilizando o CE-IVD-marked kit *artus* Parvo B19 RG PCR no Rotor-Gene 3000. O limite de detecção analítica do kit *artus* Parvo B19 RG PCR está determinado ser 0,2 IU/ μ l no eluato ($p = 0,05$). Isto indica que existe uma probabilidade de 95% de que sejam detectados no eluato 0,2 IU/ μ l.

Todas as amostras altamente positivas foram detectadas como positivas utilizando o kit *artus* Parvo B19 RG PCR. Todas as amostras negativas, nas execuções “checkerboard” e nas execuções totalmente negativas, não foram reactivas (Tabela 7 apresenta os resultados do BioRobot EZ1 DSP). Estas experiências demonstram que o protocolo do EZ1 DSP Virus não proporciona o “carry-over” de amostras nestas condições.

Tabela 5. Configuração do teste de contaminação cruzada e valores C_T para detecção de DNA de parvovirus B19 utilizando o BioRobot EZ1 DSP

Execução	Posição					
	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

Valor médio de C_T de todas as amostras = $15,40 \pm 0,18$ (CV = 1,14%)

X: Não reactiva após 45 ciclos de PCR.

Estabilidade

Foi determinada a estabilidade do DNA e RNA viral nos eluatos obtidos utilizando o kit EZ1 DSP Virus. O plasma EDTA humano foi fortificado com 1×10^3 IU/ml HCV AcroMetrix OptiQuant® HCV RNA e material padrão Parvo B19 VQC. Foram processados 18 replicados por período de tempo e condições de incubação utilizando o EZ1 DSP Virus system. Os eluatos que contêm DNA de Parvo B19 e RNA de HCV foram incubados até 6 horas a 30 °C, até 14 dias a 4 °C, até 12 semanas a -20 °C e até 9 meses a -80 °C. O estudo ainda está em curso. Os eluatos foram analisados utilizando um HCV RT-PCR validado internamente e o *artus* Parvo B19 RG PCR. Foi observada uma

falha no RT-PCR e 18 replicados para o HCV RNA após armazenamento a 4 °C durante 14 dias (Figura 4).

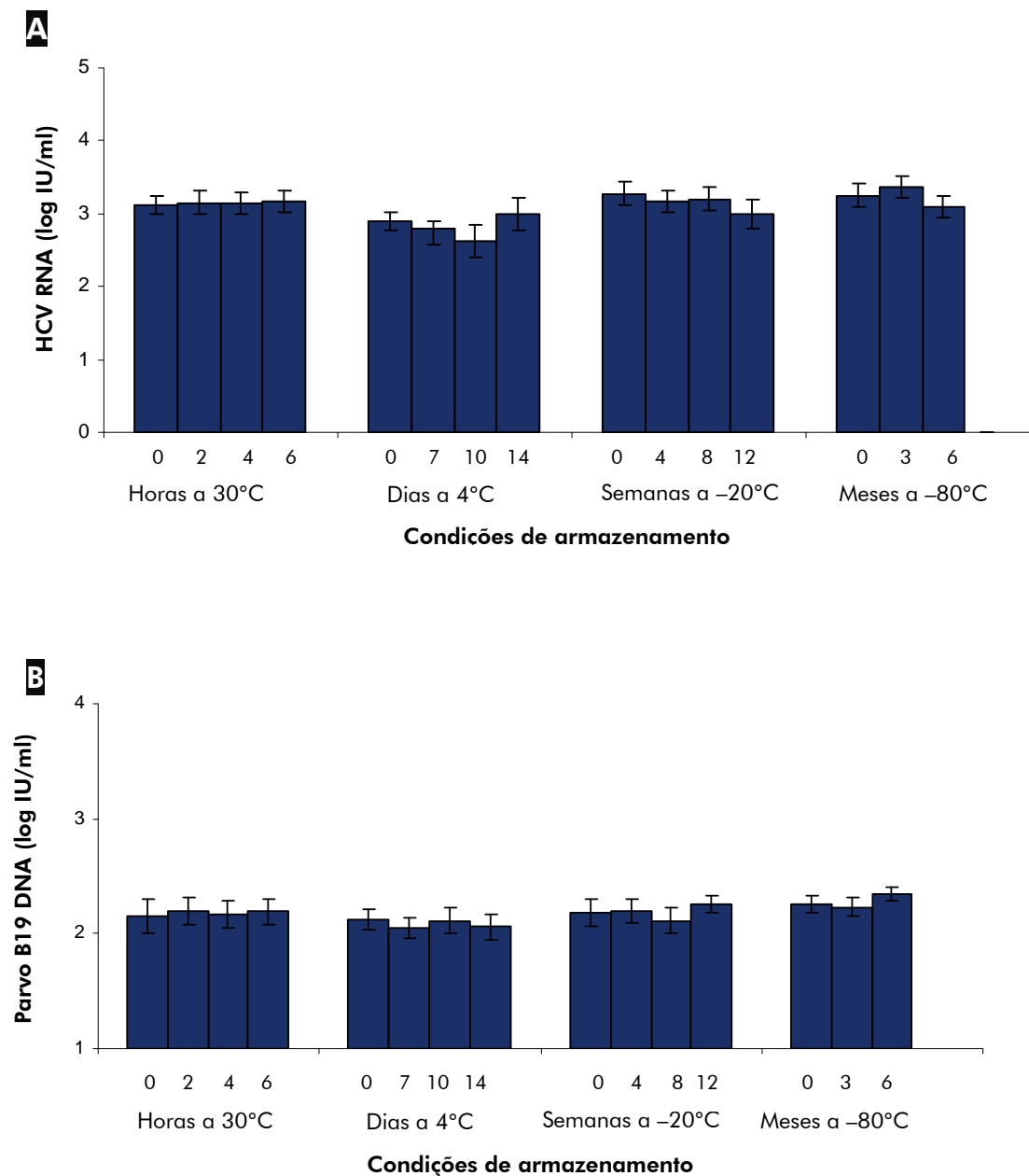


Figura 4. Estabilidade dos ácidos nucleicos virais. A estabilidade do RNA e DNA viral em eluatos obtidos utilizando o kit EZ1 DSP Virus foi determinado ser **A** HCV RNA e **B** Parvo B19 DNA.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi determinada utilizando os 3 instrumentos BioRobot EZ1 DSP a ser executados em 3 dias diferentes (ver Tabela 8). Para cada teste (A–G), foram processados 12 replicados em 2 execuções no BioRobot EZ1 DSP. O plasma EDTA humano foi fortificado com 1x10⁴ IU/ml de AcroMetrix OptiQuant HCV RNA e com 1x10³ IU/ml de AcroMetrix OptiQuant HBV DNA. O HBV DNA foi determinado utilizando o kit *artus* HBV RG PCR e o HCV RNA utilizando um teste HCV RT-PCR validado internamente.

O procedimento automático é altamente reprodutível tal como demonstrado pelos resultados comparáveis da purificação de ácidos nucleicos virais em 3 instrumentos BioRobot EZ1 DSP diferentes em 3 dias diferentes (Figura 5).

Tabela 6. Configuração do teste de reprodutibilidade

Configuração do teste	Dia 1	Dia 2	Dia 3
BioRobot EZ1 DSP I	Teste A	Teste D	Teste F
BioRobot EZ1 DSP II	Teste B	Teste E	
BioRobot EZ1 DSP III	Teste C		Teste G

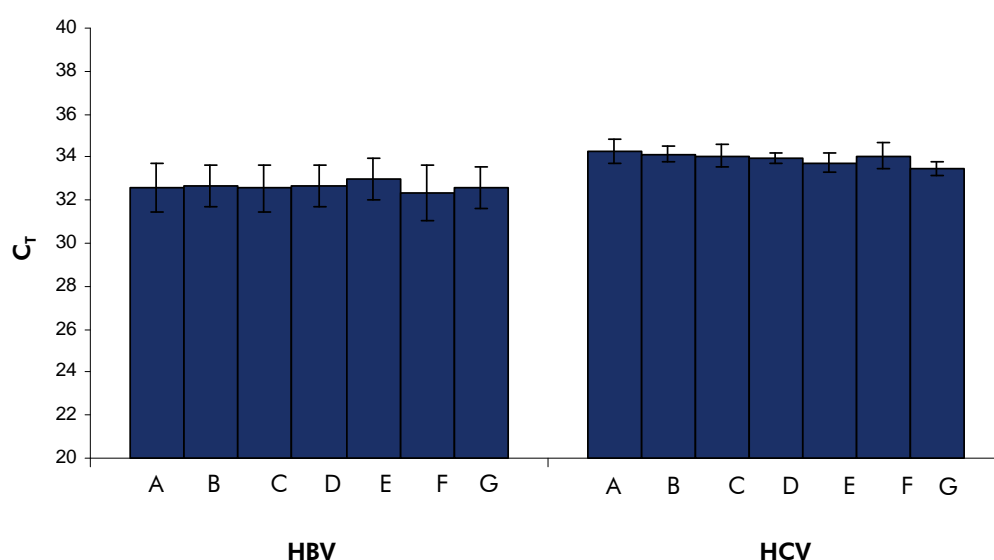


Figura 5. Reprodutibilidade. A reprodutibilidade foi determinada em 3 instrumentos BioRobot EZ1 DSP diferentes em 3 dias diferentes.

Urina

O desempenho do kit EZ1 DSP Virus para utilização com amostras de urina foi avaliado por comparação com o plasma usando painéis de vírus quantificados de CMV (vírus de DNA) e HCV (vírus de RNA) diluído no respectivo material da amostra. As amostras de urina e plasma foram tratadas segundo o manual do kit EZ1 DSP Virus e foram extraídos volumes de amostra equivalentes com o kit EZ1 DSP Virus. Os ácidos nucleicos virais foram detectados usando o kit *artus*[®] CMV RG PCR e o kit *artus*[®] HCV RG RT-PCR. A avaliação de desempenho do kit EZ1 DSP Virus comparando urina e plasma mostrou uma discrepância de apenas ~2 % (com base em valores C_T) para CMV e HCV (tabela 9).

Tabela 9. Comparação do procedimento EZ1 DSP Virus para utilização com amostras de urina e plasma

Tipo de amostra	n	Valor CT	Relação urina/plasma (valor CT)	Cópias/ml	Relação urina/plasma (cópias/ml)
CMV					
Urina	4	31,60	0,98	6.250	1,51
Plasma	5	32,17		4.130	
HCV					
Urina	4	37,83	1,02	278	0,77
Plasma	5	37,25		363	

Sangue total

Intervalo linear

O intervalo linear do kit EZ1 DSP Virus foi avaliado usando EBV como um vírus de DNA. Os testes foram efectuados com diluições de painéis de vírus quantificados realizados em sangue total humano negativo ao EBV. Foram testadas séries de diluição com seis títulos de vírus diferentes com 4 replicados cada. Os ácidos nucleicos virais foram extraídos a partir de 200 μ l de sangue total (misturado com 200 μ l de tampão ATL*) e eluídos em 60 μ l de tampão de eluição (AVE). O intervalo linear do procedimento do kit EZ1 DSP Virus foi determinado para o EBV com o kit *artus*[®] EBV RG PCR no instrumento Rotor-Gene Q (figura 6).

*QIAGEN GmbH, n.º cat. 939016

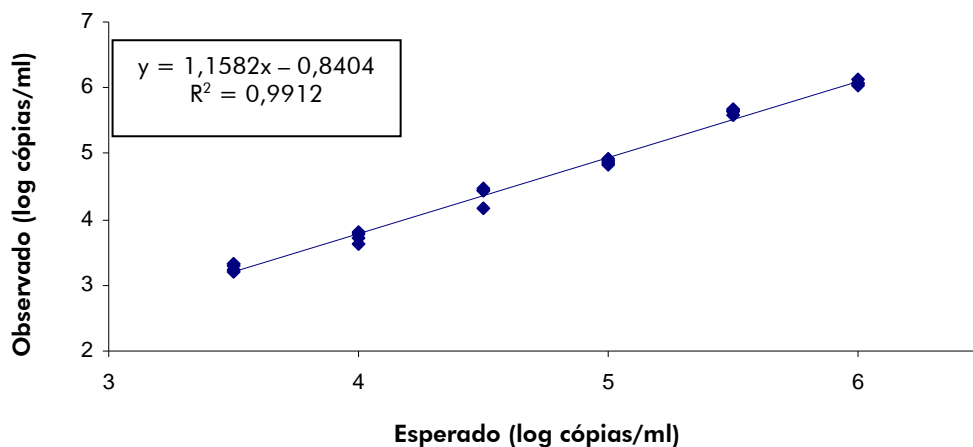


Figura 6. Intervalo linear dos rendimentos utilizando o protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o ensaio *artus*[®] EBV RG PCR para a extracção do EBV do sangue total.

Precisão

Os desvios padrão e os coeficientes de variação (CVs) para o sangue total foram determinados para CMV usando o kit *artus*[®] CMV RG PCR no instrumento Rotor-Gene Q. Os dados do interteste de precisão são apresentados na tabela 10. O sangue total derivado dos 13 dadores de sangue foi testado em 5 replicados em execuções separadas no EZ1 Advanced XL. Os ácidos nucleicos virais foram extraídos a partir de 200 µl de sangue total (misturado com 200 µl de tampão ATL*) e eluídos em 120 µl de tampão de eluição (AVE).

*QIAGEN GmbH, n.º cat. 939016

Tabela 10. Precisão inter-teste do protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o kit *artus*[®] CMV RG PCR para extração do CMV do sangue total

Dador	n	Cópias/ml	CV (%)	log cópias/ml	SD (log cópias/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

Fezes

Intervalo linear

O intervalo linear do kit EZ1 DSP Vírus foi avaliado usando Adenovirus 5 como um vírus de DNA. Os testes foram efectuados com diluições em série de dez vezes de sobrenadante da cultura de células em fezes negativas para Adenovirus. Foram testadas séries de diluição com cinco diluições de vírus diferentes com 10 replicados cada. Os ácidos nucleicos virais foram extraídos a partir de amostras de 200 μl (1:10 ressuspensas em tampão ASL*) e eluídos em 120 μl de tampão de eluição (AVE). O intervalo linear do procedimento do EZ1 DSP Vírus foi determinado em combinação com o ensaio Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, France, ref. 96-010B) no instrumento Rotor-Gene Q em comparação com um método de extração de referência (figura 7).

*QIAGEN GmbH, n.º cat. 19082

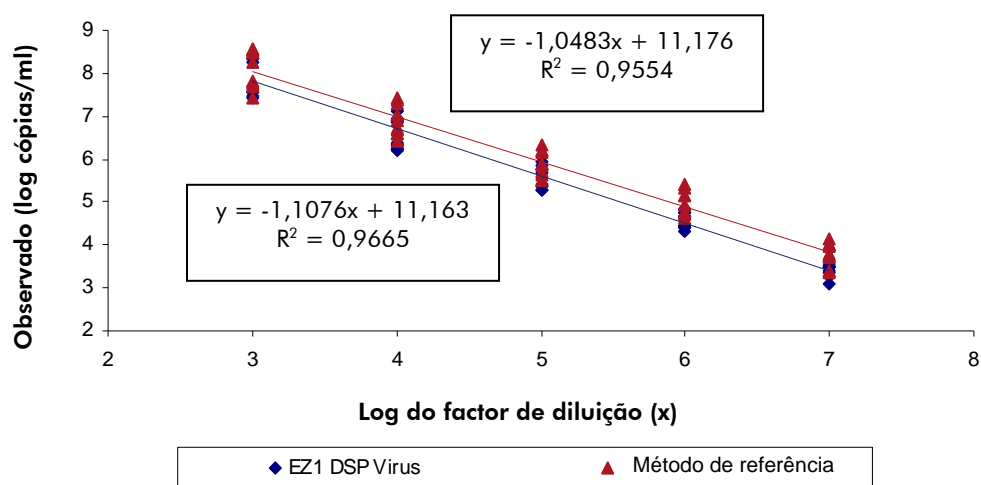


Figure 7. Intervalo linear dos rendimentos utilizando o protocolo EZ1 DSP Vírus em combinação com o ensaio Adenovirus R-Gene™ PCR para a extração do Adenovirus 5 de fezes.

Precisão

Os desvios padrão e os coeficientes de variação (CVs) para fezes foram determinados para o Adenovirus 5 usando o ensaio Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, France, ref. 96-010B) no instrumento Rotor-Gene Q. As fezes negativas para Adenovirus foram fortificadas com sobrenadante da cultura de células Adenovirus 5 e foi extraído DNA viral de amostras de 200 μl (1:10 ressuspensão em tampão ASL*) e eluído em 120 μl de tampão de eluição (AVE). Foram realizadas sete execuções EZ1 com 9 ou 10 replicados, cada uma realizada em três dias, com três instrumentos EZ1 Advanced XL e três combinações de lote kit EZ1 DSP Vírus/tampão ASL. Todas as amostras foram analisadas na mesma execução PCR. Os dados de precisão (tabela 11) foram calculados tendo em conta resultados de vários instrumentos, dias, lotes e todas as execuções EZ1

Tabela 11. Precisão do protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o ensaio Adenovirus R-Gene™ PCR para extração do Adenovirus 5 de fezes

Execução	n	Cóp/ml	log cóp/ml	SD (log cóp/ml)	Intra- ensaio	CV c/ml (%)			Total
						3 EZ1 Adv. XL	3 dias	3 lotes	
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	–	–	–	–

Estudo de correlação

Foi levado a cabo um estudo de correlação para o procedimento EZ1 DSP Virus em comparação com um método de referência para a extração do Norovirus Genogroup II de 66 amostras de fezes de pacientes. Os ácidos nucleicos virais foram extraídos a partir de amostras de 200 µl (1:10 ressuspensas em tampão ASL*) e eluídos em 120 µl de tampão de eluição (AVE). A análise foi feita com um ensaio RT PCR interno quanto a Norovirus Genogroup II (tabela 12).

*QIAGEN GmbH, n.º cat. 19082

Tabela 12. Correlação do procedimento EZ1 DSP Virus com um método de referência

EZ1 DSP Virus		Referência		Total
		Positivo	Negativo	
	Positivo	34	15	49
	Negativo	1	16	17
	Total	35	31	66

Fluidos de transporte

Intervalo linear

O intervalo linear do kit EZ1 DSP Virus foi avaliado extraindo HSV-1 e *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) do PreservCyt® medium (Cytoc Corporation, ref. 0200011). Os testes foram efectuados com diluições de painéis de vírus quantificados realizados em fluido de transporte. Foram testadas séries de diluição com seis títulos de vírus diferentes em 5 ou 6 replicados cada. O intervalo linear do kit EZ1 DSP Virus foi determinado em comparação com um método de referência com os ensaios *artus*® HSV1/2 TM PCR e *artus*® *C. trachomatis* TM PCR (figura 8). Os ácidos nucleicos virais foram extraídos a partir de amostras de 200 µl e eluídos em 90 µl de tampão de eluição (AVE).

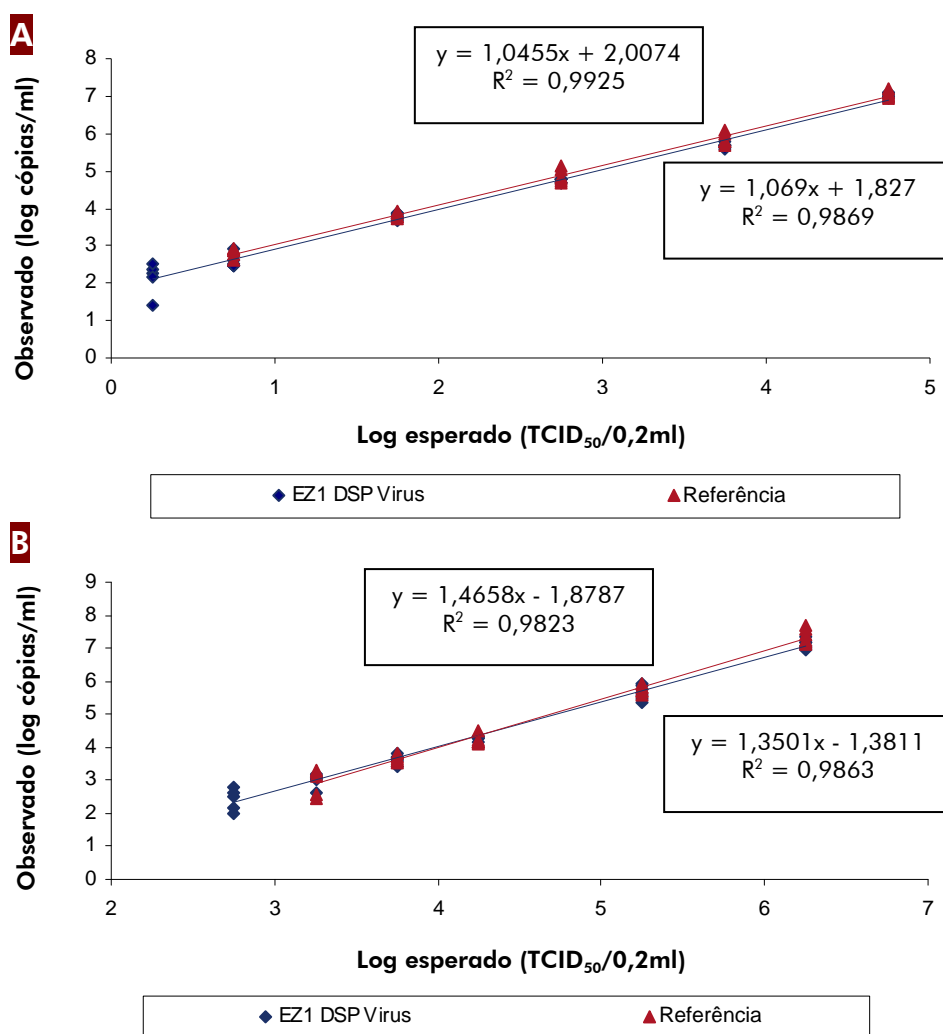


Figura 8. Intervalo linear dos rendimentos utilizando o protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com os ensaios *artus*® *C. trachomatis* PCR (A) e o *artus*® HSV1/2 TM TM PCR

B para a extração de HSV-1 e *C. trachomatis* do fluido de transporte. O estudo foi feito em comparação com um método de referência.

Precisão

Os desvios padrão e os coeficientes de variação (CVs) para fluidos de transporte foram determinados para HSV-1 e *C. trachomatis* usando os ensaios *artus*[®] HSV1/2 TM PCR e *artus*[®] *C. trachomatis* TM PCR. Foi extraído DNA viral e bacteriano de 400 µl de fluido e eluído em 60 µl de tampão de eluição (AVE). Foram extraídos cinco fluidos de transporte em 12 replicados cada em seis execuções EZ1, em três dias e com três lotes de kit EZ1 DSP Virus. Todas as amostras foram analisadas na mesma execução PCR. A precisão intermédia do *C. trachomatis* (tabela 13) e HSV-1 (tabela 14) foi calculada tendo em conta todos os replicados de cada fluido de transporte (execuções EZ1, dias e lotes diferentes).

Tabela 13. Precisão do protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o kit *artus*[®] *C. trachomatis* RG PCR para a extração do *C. trachomatis* do fluido de transporte

Fluido	n	Nominal log TCID ₅₀ / 0,2ml	Cóp/ml observada	Precisão intermédia CV cóp/ml (%)	Log cóp/ml observado	SD (log cóp/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, n.º cat. 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., n.º cat. 330C

Tabela 14. Precisão do protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o kit artus® HSV1/2 RG PCR para a extração do HSV-1 do fluido de transporte

Fluido	n	Nominal log TCID₅₀/ 0,2ml	Cóp/ml observada	Precisão intermédia CV cóp/ml (%)	Log cóp/ml observado	SD (log cóp/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, n.º cat. 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., n.º cat. 330C

Desempenho clínico (HPV)

Foram testadas alíquotas de DNA purificadas de um total de 108 amostras compreendendo 50 amostras HC2 positivas colhidas em STM, 50 amostras HC2 positivas colhidas em PreservCyt® e 8 amostras HC2 negativas em STM com o teste *digene*® HPV Genotyping RH (n.º cat. 613413) e o teste *digene*® HPV Genotyping LQ (n.º cat. 613215) em comparação com o sistema Free University RLB*.

Os resultados foram pontuados ou como idênticos (genótipos 100% coincidentes), compatíveis (pelo menos, um genótipo em comum) ou discordantes (nenhum genótipo coincidente). As discrepâncias (resultados de genotipagem discordantes) foram resolvidas repetindo ambos os ensaios e, em caso de discrepâncias persistentes, pela análise subsequente com um terceiro ensaio de detecção de sensibilidade HPV e de genotipagem [SPF10-LiPA25 (versão 1)].

Os resultados mostraram um nível muito baixo de amostras discrepantes (2%) depois da resolução de amostras discrepantes iniciais para ambos os ensaios de genotipagem relativamente ao método de referência (tabela 15.)

Tabela 15. Comparação do teste *digene* HPV Genotyping RH (A) e do teste *digene* HPV Genotyping LQ com o sistema Free University RLB* usando o procedimento EZ1 DSP Virus para a extração do HPV do fluido de transporte

Tipo de resultado	A % de amostras clínicas	B % de amostras clínicas
Idêntico	80	58
Compatível	18	12
Discrepante	2	2

* van den Brule, A. J., Pol R., Franssen-Daalmeijer, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J., and Snijders, P. J. (2002) GP5+/6+ PCR seguido pela análise de reverse line blot permite uma identificação rápida e de elevada capacidade de genótipos de vírus do papiloma humano. J Clin Microbiol 40, 779.

Desempenho clínico (Influenza A)

Para demonstrar o desempenho clínico, foram avaliadas 102 amostras caracterizadas de secreção nasofaríngea colhidas em UTM (Copan Diagnostics Inc., cat. no. 330C) usando o kit EZ1 DSP Virus para extração de ácidos nucleicos. O RNA da Influenza A foi detectado usando o kit *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR e teste Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR com aprovação EUA (tabela 16).

Tabela 16. Comparação do kit *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR com o teste Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR com aprovação EUA usando o kit EZ1 DSP Virus para a extração da Influenza A sazonal e vírus 2009 H1N1 Influenza das secreções nasofaríngeas

		Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR			
		Infl.A sazonal positiva	2009 H1N1 positivo	Negativo	Total
<i>artus</i> [®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR	Infl.A sazonal positiva	5	0	2	7
	2009 H1N1 positivo	0	27	1	28
	Negativo	0	0	67	67
	Total	5	27	70	102

Secreções secas

Intervalo linear

O intervalo linear do kit EZ1 DSP Virus foi avaliado extraindo HSV-1 e *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) de Puritan Cotton Swabs (ref. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC). Os testes foram realizados com diluições de material standard quantificado. A saliva humana negativa foi fortificada com material patogénico e transferida para o cotonete. Depois da desidratação, os agentes patogénicos foram reisolados da secreção seca por ressuspensão em 600 µl de tampão ATL*. Foram testadas séries de diluição com seis títulos de vírus diferentes em 5 ou 6 replicados cada. O intervalo linear do kit EZ1 DSP Virus foi determinado em comparação com um método de referência com os ensaios *artus*[®] HSV1/2 TM PCR e *artus*[®] C. trachomatis TM PCR (figura 9). Os ácidos nucleicos virais foram extraídos a partir de amostras de 400 µl e eluídos em 150 µl de tampão de eluição (AVE).

*QIAGEN GmbH, n.º cat. 939016

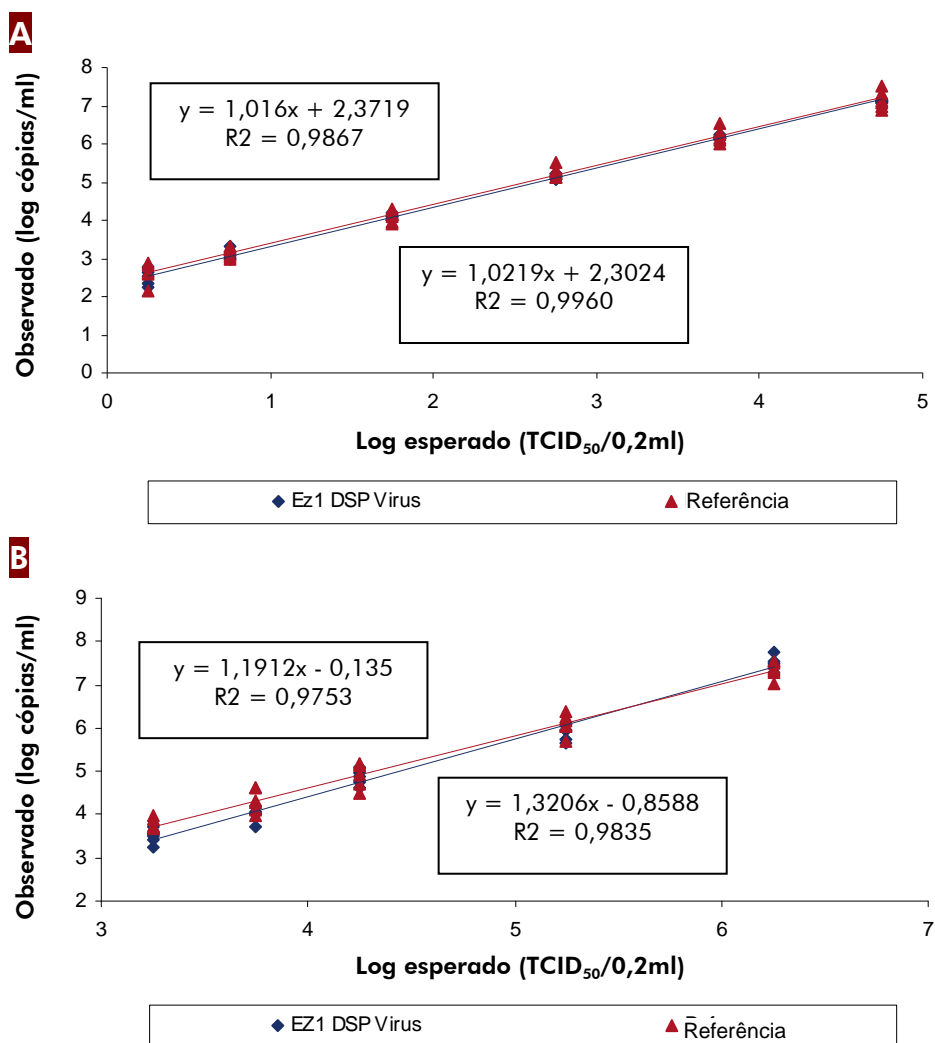


Figura 9. Intervalo linear dos rendimentos utilizando o protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com os ensaios *artus*[®] *C. trachomatis* PCR (A) e *artus*[®] HSV1/2 TM TM PCR (B) para a extração de *C. trachomatis* e HSV-1 de cotonetes secos. O estudo foi feito em comparação com um método de referência.

Precisão

Os desvios padrão e os coeficientes de variação (CVs) para cotonetes secos foi determinado para HSV-1 e *C. trachomatis* usando os ensaios *artus*[®] HSV1/2 TM PCR e *artus*[®] *C. trachomatis* TM PCR. Foram preparados e pré-tratados cotonetes secos Copan Flocked Swabs (cat. no. 502CS0, Copan Italia S.p.A.) e Puritan Cotton Swabs (ref. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC) tal como acima descrito e foi extraído DNA viral e bacteriano de 400 µl de volume de amostra e eluído em 60 µl de tampão de eluição (AVE). A extração foi feita com três dadores de saliva em 8 ou 9 replicados cada, em seis execuções EZ1, em três dias e com três combinações de lote kit EZ1 DSP

Virus/tampão ATL. Todas as amostras foram analisadas na mesma execução PCR. A precisão intermédia do *C. trachomatis* (tabela 17) e HSV-1 (tabela 18) foi calculada tendo em conta todos os replicados de cada dador e tipo de secreção (execuções EZ1, dias e lotes diferentes).

Tabela 17. Precisão do protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o kit artus® C. trachomatis RG PCR para a extração de C. trachomatis de secreções secas

Tipo de cotonete	Dador	n	Log nominal TCID ₅₀ / 0,2 ml	Cóp/ml observada	Precisão intermédia CV cóp/ml (%)	Log cóp/ml observado	SD (log cópias/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

Tabela 18. Precisão do protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o kit artus® HSV1/2 RG PCR para a extração de HSV-1 de secreções secas

Tipo de cotonete	Dador	n	Log nominal TCID ₅₀ / 0,2 ml	Cóp/ml observada	Precisão intermédia CV cóp/ml (%)	Log cóp/ml observado	SD (log cópias/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 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

Amostras respiratórias (expectoração)

Estudo de correlação

Foi levado a cabo um estudo de correlação para o EZ1 DSP Vírus para a extracção de *Mycobacterium tuberculosis* de expectoração humana negativa. Foi testada uma série de diluição com 4 títulos de vírus diferentes em replicados únicos em comparação com um método de referência. Foi extraído DNA bacteriano de 200 μ l de expectoração, pré-tratado com Sputasol (Oxoid Limited, ref. SR0233) e lisozima (Sigma-Aldrich, n.º cat. L6876), tal como descrito na versão 4 do manual do EZ1 DSP Vírus, e eluído em 90 μ l de tampão de eluição (AVE). A análise foi feita com o ensaio *artus*® M. tuberculosis RG PCR (figura 10).

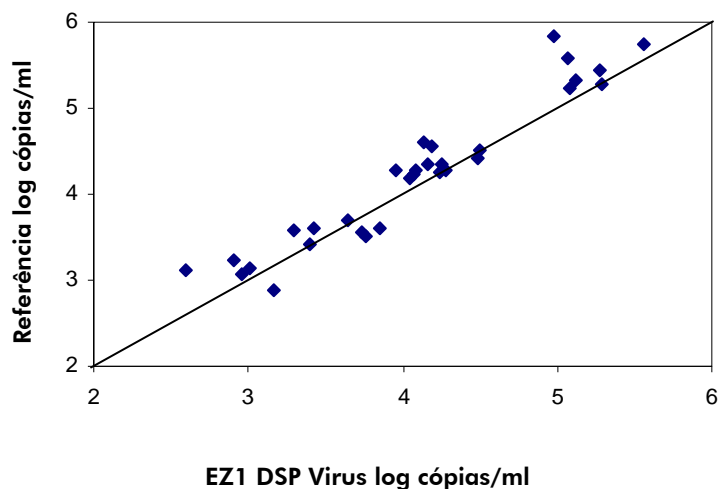


Figura 10. Correlação do procedimento EZ1 DSP Vírus com um método de referência.

Para informações de licenciamento actualizadas e declarações específicas de produtos consulte o manual do kit QIAGEN respectivo ou o manual do utilizador. Os manuais dos kits e os manuais do utilizador da QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos aos serviços de Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas registadas: QIAGEN®, *artus*®, EZ1®, Rotor-Gene® (Grupo QIAGEN); ABI PRISM® (Applied Biosystems); COBAS®, AMPLICOR® (Roche Molecular Systems, Inc., licensed to Roche Diagnostic Systems, Inc.); LightCycler® (Roche); MONITOR® (Roche Group); OptiQuant® (AcroMetrix Corporation); Adenovirus R-Gene™ (Argene, Inc.); Remel M4RT® (Thermo Fisher Scientific Group); PreservCyt® (Cytac Corp.); Surepath® (Becton, Dickinson and Company)

Fevereiro-11 © 2011 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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