

Kit EZ1[®] DSP Virus

Le prestazioni del kit EZ1 DSP Virus sono state stabilite mediante studi di valutazione delle prestazioni usando plasma, siero, FCS, urina, sangue intero, feci, mezzi di trasporto, tamponi asciutti e campioni respiratori per isolare gli acidi nucleici virali e il DNA batterico. I test sono stati condotti secondo i protocolli descritti nell'attuale versione 4 del Manuale del kit EZ1 DSP Virus.

Non si garantiscono, tuttavia, le prestazioni del kit per ogni specie virale o batterica, pertanto l'utente è tenuto a convalidare le prestazioni del kit. È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia coperta dagli studi QIAGEN di valutazione delle prestazioni.

Prestazioni caratteristiche

Siero e plasma

Intervallo lineare

L'intervallo lineare per il kit EZ1 DSP Virus è stato stimato per i virus a RNA HCV e HIV-1 e il virus a DNA HBV. I test sono stati eseguiti con diluizioni di pannelli di virus quantificati realizzati in plasma o siero umano negativo a HBV, HCV e HIV-1. Le serie di diluizione con sei titoli di virus diversi sono state testate con 12 replicati per ogni serie. L'intervallo lineare del kit EZ1 DSP Virus è stato stabilito per HBV, HCV, e HIV-1 con i test Abbott RealTime per determinare la carica virale (Tabella 1, Figura 1). I controlli interni RealTime (17 μ l ciascuno) sono stati aggiunti direttamente ad ogni campione HIV-1 e HCV prima di essere estratti. Per RealTime HBV, 3,4 μ l di controllo interno RealTime HBV sono stati combinati con RNA carrier per ogni campione. Gli acidi nucleici virali sono stati estratti da campioni da 400 μ l ed eluiti in un tampone di eluizione di 90 μ l (AVE). La PCR è stata eseguita su Abbott *m2000rt*.



Tabella 1. Origine del campione e test a valle utilizzati per determinare l'intervallo lineare delle rese con il protocollo EZ1 DSP Virus

Virus	Source	Downstream assay	Assay manual used
HIV-1	BBI (Boston Biomedica, Inc., Boston, USA) HIV difettivo, plasma ricalcificato BBI	Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HIV-1
HCV	ProMedDx (ProMedDx LLC Norton, MA, USA) campione paziente, siero umano normalmente catalogato	Abbott RealTime HCV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HCV
HBV	Teragenix (Teragenix Corporation, Ft. Lauderdale, FL, USA) campione paziente, plasma umano ricalcificato	Abbott RealTime HBV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HBV

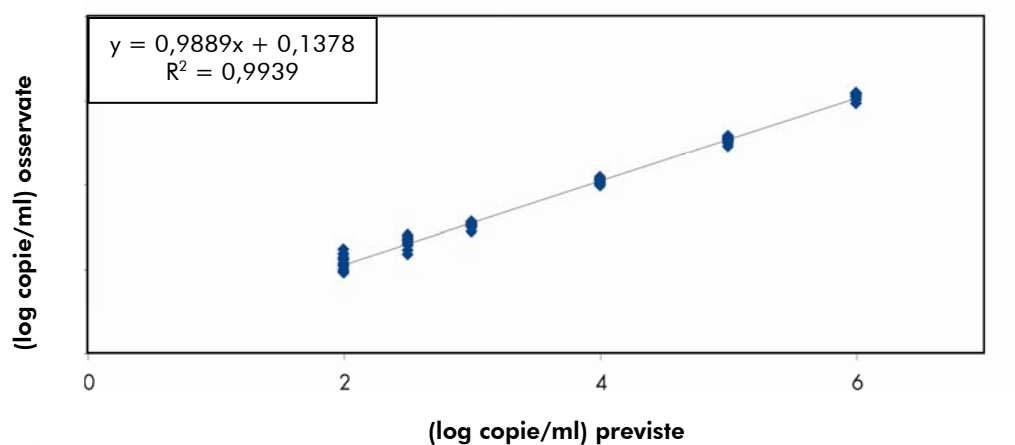
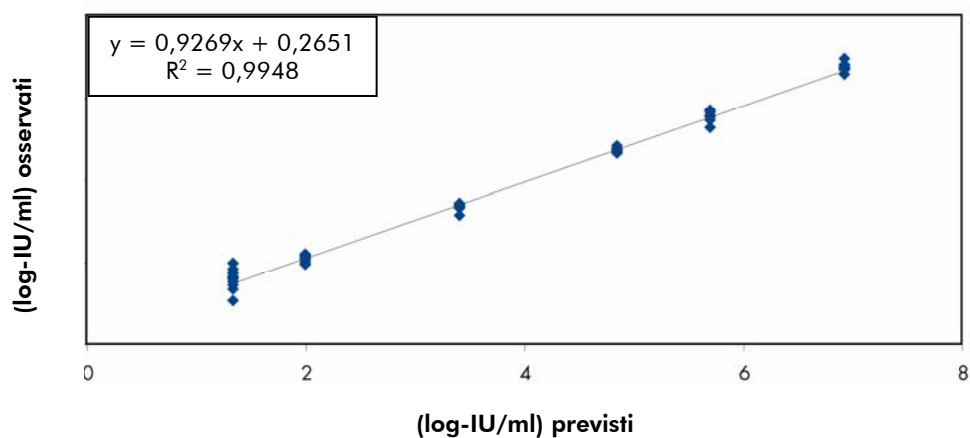
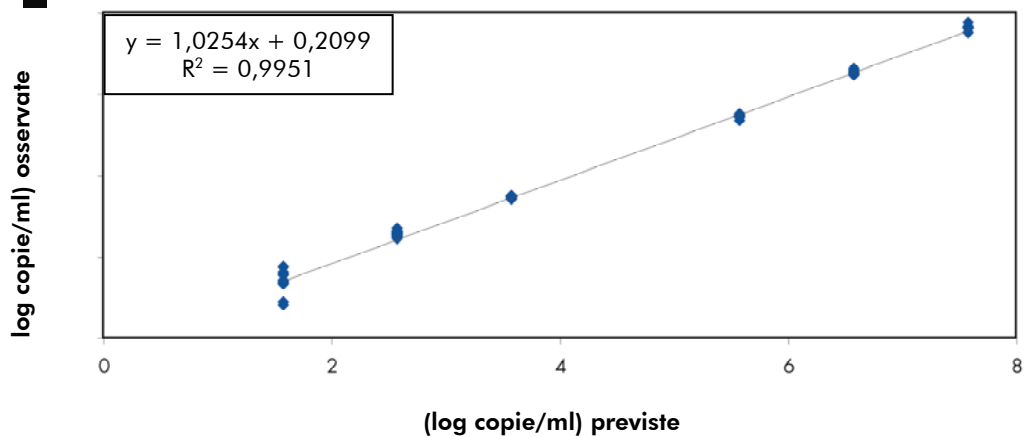
A**B****C**

Figura 1. Intervallo lineare delle rese con l'uso del protocollo EZ1 DSP Virus. L'intervallo lineare del protocollo EZ1 DSP Virus è stato stabilito usando le serie di diluizioni virali e test Abbott RealTime (Tabella1) **A** per HIV-1, **B** per HCV e **C** per HBV.

Precisione

Le deviazioni standard insieme ai coefficienti delle variazioni (CVs) sono state accertate per le serie di diluizioni per HIV-1, HCV e HBV nell'intervallo lineare di adeguati test a valle. Per l'analisi di precisione, gli stessi test a valle sono stati usati per determinare l'intervallo lineare (Tabella 1, pagina 2). I dati di precisione inter-test vengono mostrati nelle tabelle 2-4. Per ogni membro del gruppo, dodici replicati sono stati estratti in dodici corse separate sul BioRobot EZ1 DSP. La PCR è stata eseguita in due corse di sei replicati ciascuna su Abbott *m2000rt*.

Tabella 2. Precisione inter-test del protocollo EZ1 DSP Virus con l'uso del test Abbott RealTime HIV-1

Membro del gruppo	n	Copie/ml	CV (%)	Copie del log/ml	SD (copie del log/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

Tabella 3. Precisione inter-test del protocollo EZ1 DSP Virus con l'uso del test Abbott RealTime HCV

Membro del gruppo	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

Tabella 4. Precisione inter-test del protocollo EZ1 DSP Virus con l'uso del test Abbott RealTime HBV

Membro del gruppo	n	Copie/ml	CV (%)	Copie del log/ml	SD (copie del log/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 di rilevazione

Il limite di rilevazione è stato determinato per il 95% del valore probit per il sistema EZ1 DSP Virus con l'uso dello standard virale internazionale HIV-1 WHO 97/656, dello standard virale internazionale HBV WHO 97/746 e del supernatante di coltura cellulare quantificato CMV. Il limite di rilevazione è stato determinato con l'elaborazione di una serie di diluizioni di appositi virus. I virus sono stati diluiti in un pool di plasma normale umano EDTA HIV-, HBV-, e CMV-negativo. Ogni fase di diluizione è stata preparata in almeno tre diverse corse con almeno sei replicati per diluizione. 400 µl di plasma è stato utilizzato per la preparazione dei campioni sul BioRobot EZ1 DSP con eluizione da 60 µl.

I kit *artus*[®] HBV PCR sono stati usati per rilevare il DNA HBV, mentre i kit *artus* CMV PCR sono stati usati per rilevare il DNA CMV. I campioni sono stati analizzati su uno strumento LightCycler[®] 1.2 (Roche), un Rotor-Gene[®] 3000 (Corbett-Research) e un ABI PRISM[®] 7000 SDS (Applied Biosystems). Il test COBAS[®] AmpliCor[®] HIV-1Monitor[®] (versione 1.5) è stato utilizzato per rilevare l'RNA HIV con l'uso dell'analizzatore COBAS AmpliCor. I dati abbinati per tutti i campioni sono stati stimati con l'uso dell'analisi probit. I dati sono riportati nelle tabelle 5–6, con esempi di probit nelle Figure 2–3.

Tabella 5. Limite di rilevazione di DNA HBV e CMV con l'uso del sistema EZ1 DSP Virus e dei kit *artus* PCR

Virus	Titolo d'ingresso	Hit (LightCycler)	Hit (Rotor-Gene)	Hit (ABI PRISM)
HBV	95% del valore probit (IU/ml)	45,7	14,4	13,2
	Intervallo di confidenza (IU/ml)	28-102	9,5-26,5	9,0-23,1
CMV	95% del valore probit (copie/ml)	67,2	21,8	38,3
	Intervallo di confidenza (copie/ml)	41,8-142	14,5-44,1	21,5-89,8

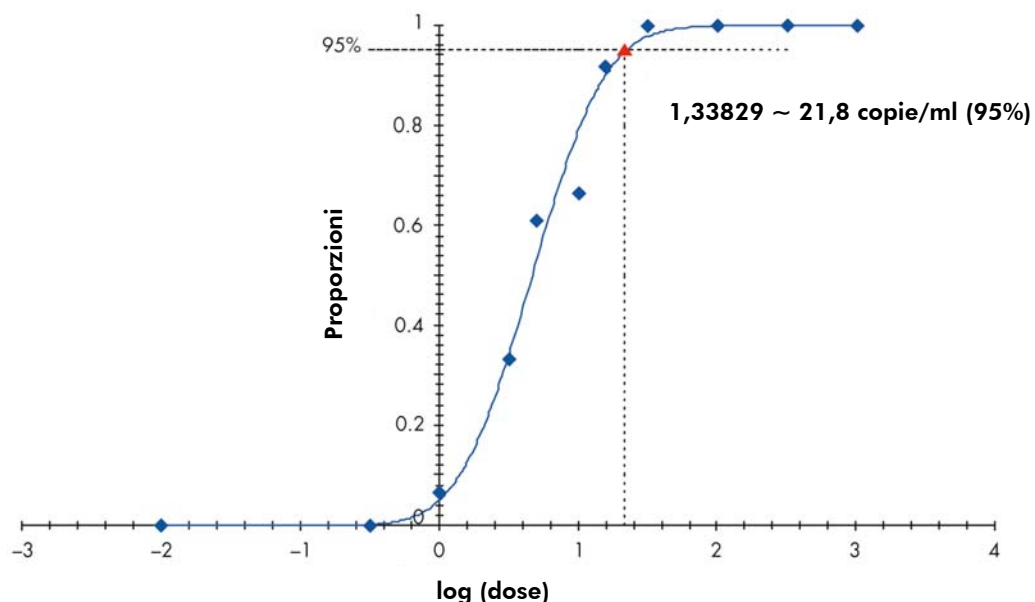


Figura 2. Analisi del probit per rilevare il DNA CMV con l'uso del sistema EZ1 DSP Virus e del kit *artus* CMV RG PCR. Gli acidi nucleici virali sono stati purificati con l'uso del sistema EZ1 DSP Virus ed il kit *artus* CMV PCR RG è stato utilizzato per rilevare il DNA CMV sul Rotor-Gene 3000. Il 95% del valore probit era pari a 21,8 copie/ml.

Tabella 6. Limite di rilevazione dell'RNA HIV con l'uso del sistema EZ1 DSP Virus e del test di monitoraggio COBAS AmpliCor HIV-1, versione 1.5

Titolo d'ingresso (IU/ml)	Hit
95% del valore probit (IU/ml)	114,5
Intervallo di confidenza (IU/ml)	82,9–194,3

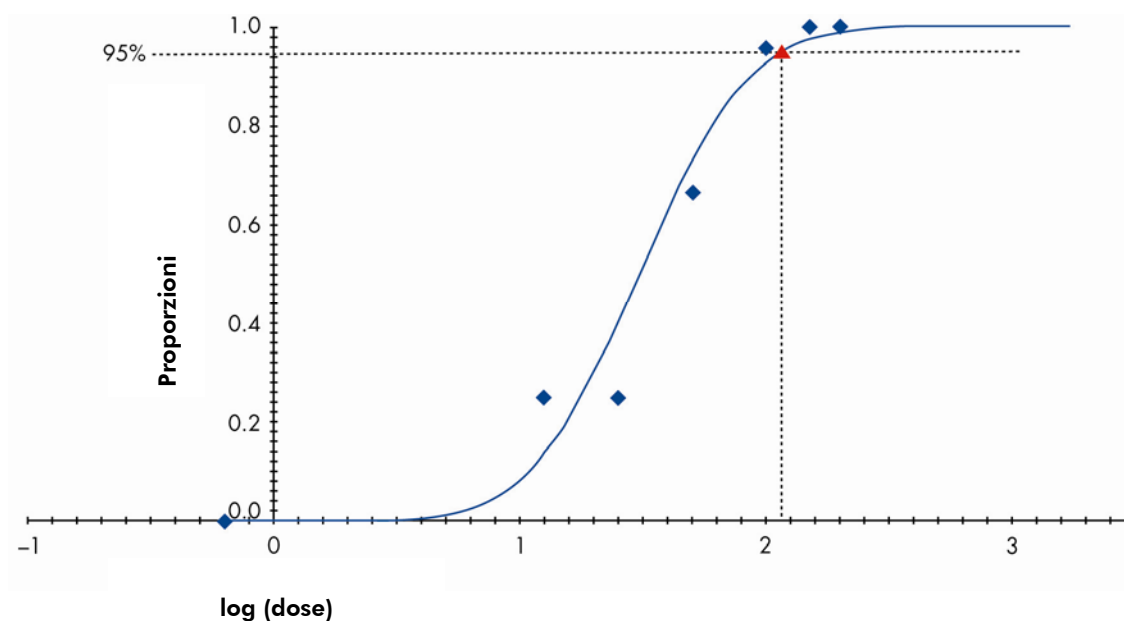


Figura 3. Analisi del probit per la rilevazione dell'RNA HIV con l'uso del sistema EZ1 DSP Virus e del test di monitoraggio COBAS AmpliCor HIV-1, versione 1.5. Gli acidi nucleici virali sono stati purificati con l'uso del sistema EZ1 DSP Virus, con 400 µl di campione immesso e 60 µl di eluizione. Il test di monitoraggio COBAS AmpliCor HIV-1 è stato usato per il rilevamento dell'RNA HIV sull'analizzatore COBAS AmpliCor in modalità ultrasensibile. Il 95% del valore probit è stato pari a 114,5 IU/ml.

Esclusione del trascinamento tra campioni

Su ciascuno strumento BioRobot EZ1 DSP, EZ1 Advanced, e EZ1 Advanced XL sono state eseguite nove corse per valutare il rischio di eventi di contaminazione incrociata durante e tra le varie procedure EZ1 DSP Virus. I test sono stati eseguiti con l'uso di un campione paziente di parvovirus B19 quantificato. La carica virale dei campioni positivi utilizzati per i test di trascinamento era $1,0 \times 10^8$ IU/ml. Per la diluizione di campioni positivi e come campioni di controllo negativo è stato utilizzato un pool di plasma umano EDTA negativo per parvovirus B19.

Per rilevare il trascinamento tra campioni, sono state eseguite su ciascuno strumento due corse con una disposizione a scacchiera alterna di campioni altamente positivi e negativi. Una corsa ogni tre è stata eseguita utilizzando tutti i campioni negativi per monitorare il possibile trascinamento corsa-

a-corsa. La preparazione di questo campione è stata ripetuta per tre volte con l'esito di un totale di nove corse per ogni strumento. Il DNA del parvovirus B19 è stato rilevato e quantificato con l'uso del kit *artus* Parvo B19 RG PCR con contrassegno CE-IVD sul Rotor-Gene 3000. Il limite di rilevazione analitico del kit *artus* Parvo B19 RG PCR è stato stabilito in 0,2 IU/ μ l nell'eluito ($p = 0,05$). Ciò indica che la probabilità di rilevare 0,2 IU/ μ l nell'eluito è del 95%.

Tutti i campioni altamente positivi sono risultati positivi con l'uso del kit *artus* Parvo B19 RG PCR. Tutti i campioni negativi, nelle esecuzioni a scacchiera e nelle esecuzioni in cui erano presenti solo campioni negativi, non hanno fornito risposta (Tabella 7 mostra i risultati sul BioRobot EZ1 DSP). Questi esperimenti dimostrano che il protocollo EZ1 DSP Virus non provoca un trascinarsi tra campioni in queste condizioni.

Tabella 7. Test per la contaminazione incrociata e valori C_T per il rilevamento del DNA del parvovirus B19 con l'uso del BioRobot EZ1 DSP

Corsa	Posizione					
	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

Valore medio C_T di tutti i campioni = $15,40 \pm 0,18$ (CV = 1,14%)

X: non rispondente dopo 45 cicli PCR.

Stabilità

È stata determinata la stabilità di RNA e DNA virale negli eluiti generati con il kit EZ1 DSP Virus. Il plasma umano EDTA è stato arricchito con materiale standard 1×10^3 IU/ml HCV AcroMetrix OptiQuant® HCV RNA e Parvo B19 VQC. A seconda del momento di test e della condizione di incubazione, sono stati elaborati 18 replicati con l'uso del sistema EZ1 DSP Virus. Gli eluiti contenenti DNA Parvo B19 e RNA HCV sono stati incubati fino a 6 ore a 30°C, fino a 14 giorni a 4°C, fino a 12 settimane a -20°C e fino a 9 mesi a -80°C. Lo studio è ancora in corso. Gli eluiti sono stati analizzati usando un metodo HCV RT-PCR interno convalidato e il sistema *artus* Parvo

B19 RG PCR. È stato osservato un errore RT-PCR su 18 replicati per RNA HCV dopo la conservazione a 4°C per 14 giorni (Figura 4).

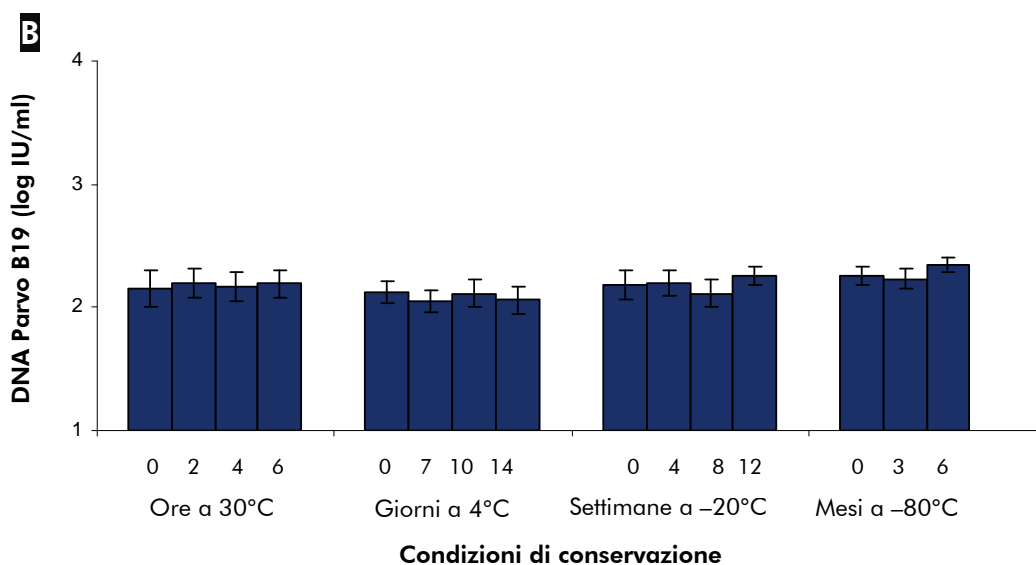
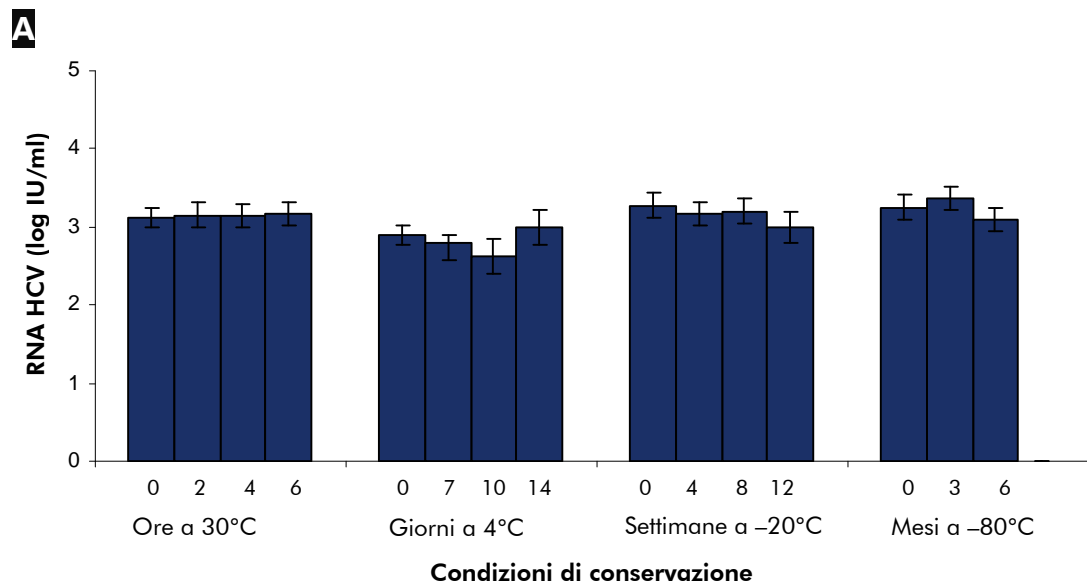


Figura 4. Stabilità degli acidi nucleici virali. È stata determinata la stabilità di RNA e DNA virale negli eluiti generati con l'uso del kit EZ1 DSP Virus per **A RNA HCV e **B** DNA Parvo B19.**

Riproducibilità

La riproducibilità è stata determinata usando 3 strumenti BioRobot EZ1 DSP in 3 giorni diversi (vedi Tabella 8,). Per ogni test (A–G), sono stati elaborati 12 replicati in 2 corse sul sistema BioRobot EZ1 DSP. Il plasma umano EDTA è stato arricchito con 1×10^4 IU/ml AcroMetrix OptiQuant HCV RNA e 1×10^3 IU/ml AcroMetrix OptiQuant HBV DNA. Il DNA HBV è stato determinato usando il kit *artus* HBV RG PCR, mentre l'RNA HCV è stato determinato usando un test HCV RT-PCR interno convalidato.

La procedura automatica è altamente riproducibile, come dimostrato dai risultati confrontabili ottenuti dalla purificazione degli acidi nucleici virali su 3 diversi strumenti BioRobot EZ1 DSP in 3 giorni differenti (Figura 5).

Tabella 8. Test di riproducibilità

Test	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 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

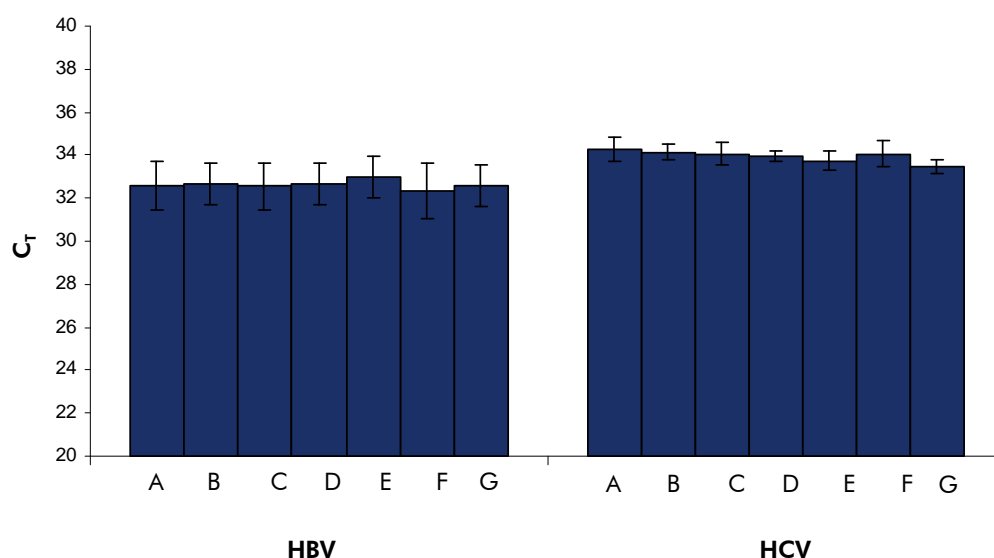


Figura 5. Riproducibilità. La riproducibilità è stata determinata su tre diversi strumenti BioRobot EZ1 DSP in tre giorni diversi.

Urina

Le prestazioni del kit EZ1 DSP Virus per l'uso con campioni di urina sono state valutate mediante confronti con campioni di plasma, utilizzando pool di virus di CMV (virus a DNA) e HCV (virus a RNA), diluiti nel rispettivo materiale campione. I campioni di urina e plasma sono stati trattati secondo il Manuale del kit EZ1 DSP Virus e volumi di campioni equivalenti sono stati estratti con il kit EZ1 DSP Virus. Gli acidi nucleici virali sono stati rilevati con il kit *artus*[®] CMV RG PCR e il kit *artus*[®] HCV RG RT-PCR. La valutazione delle prestazioni del kit EZ1 DSP Virus confrontando urina e plasma ha evidenziato una discrepanza soltanto del ~2% (sulla base dei valori C_T) sia per il virus CMV che HCV (Tabella 9).

Tabella 9. Confronto della procedura del kit EZ1 DSP Virus per l'uso con campioni di urina e plasma

Tipo di campione	n	Valore CT	Rapporto urina/plasma (Valore CT)	Copie/ml	Rapporto urina/plasma (Copie/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 intero

Intervallo lineare

L'intervallo lineare per il kit EZ1 DSP Virus è stato stimato utilizzando EBV come virus a DNA. I test sono stati eseguiti con diluizioni di pool di virus quantificati, ottenute in sangue intero umano EBV-negativo. Le serie di diluizioni con sei diversi titoli di virus sono state testate con 4 replicati per ogni serie. Gli acidi nucleici virali sono stati estratti da 200 μ l di sangue intero (miscelato con 200 μ l di tampone ATL*) ed eluiti in 60 μ l di tampone di eluizione (AVE). L'intervallo lineare della procedura del kit EZ1 DSP Virus Kit è stato determinato per EBV con il kit *artus*[®] EBV RG PCR sullo strumento Rotor-Gene Q (Figura 6).

*QIAGEN GmbH, cat. n° 939016

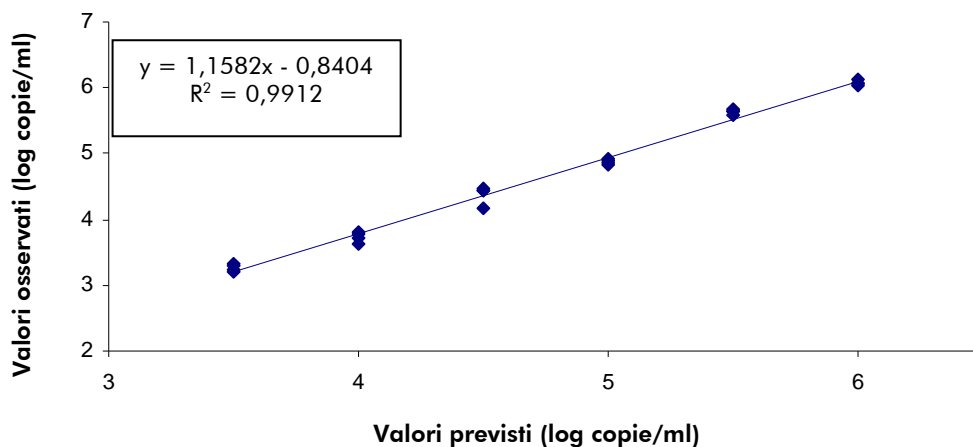


Figura 6. Intervallo lineare delle rese utilizzando il protocollo EZ1 DSP Virus in combinazione con il kit *artus*[®] EBV RG PCR per l'estrazione di EBV da sangue intero.

Precisione

Le deviazioni standard e i coefficienti di variazione (CV) per il sangue intero sono stati determinati per il CMV con il kit *artus*[®] CMV RG PCR sullo strumento Rotor-Gene Q. I dati di precisione inter-test sono riportati nella Tabella 10. Il sangue intero ottenuto da 13 donatori di sangue è stato testato in 5 replicati in sedute separate su EZ1 Advanced XL. Gli acidi nucleici virali sono stati estratti da 200 μ l di sangue intero (miscelato con 200 μ l di tampone ATL*) ed eluiti in 120 μ l di tampone di eluizione (AVE).

*QIAGEN GmbH, cat. n° 939016

Tabella 10. Precisione inter-test del protocollo EZ1 DSP Virus in combinazione con il kit *artus*[®] CMV RG PCR per l'estrazione di CMV da sangue intero.

Donatore	n	Copie/ml	CV (%)	Log copie/ml	DS (log copie/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

Feci

Intervallo lineare

L'intervallo lineare per il kit EZ1 DSP Virus è stato stimato utilizzando Adenovirus 5 come virus a DNA. I test sono stati effettuati con serie di diluizioni di 10 volte del supernatante delle colture cellulari in feci negative all'Adenovirus. Le serie di diluizioni con cinque diverse diluizioni di virus sono state testate con 10 replicati per ogni serie. Gli acidi nucleici virali sono stati estratti da 200 μ l di campioni (risospesi 1:10 in tampone ASL*) ed eluiti in 120 μ l di tampone di eluizione (AVE). L'intervallo lineare della procedura del kit EZ1 DSP Virus è stato determinato in combinazione con il test Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, France, rif. 96-010B) sullo strumento Rotor-Gene Q in un'analisi di confronto con un metodo di estrazione di riferimento (Figura 7).
*QIAGEN GmbH, cat. n° 19082

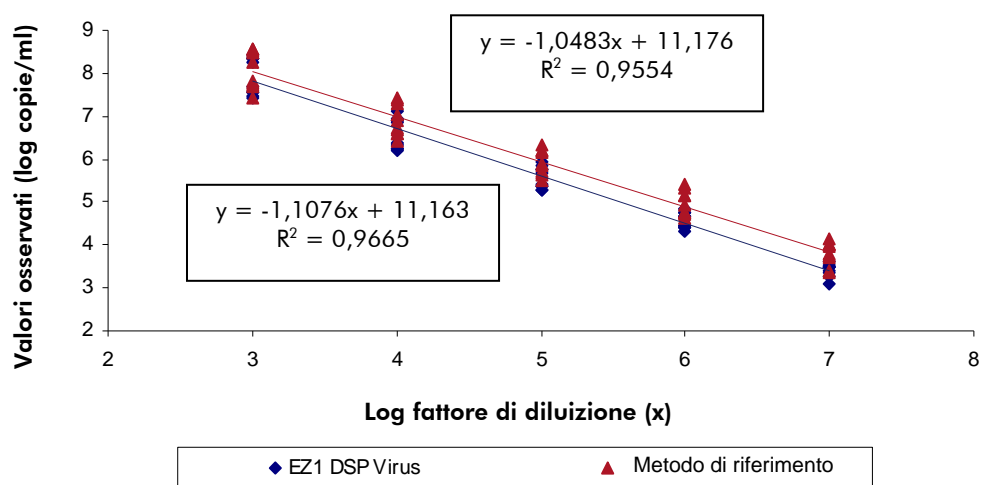


Figura 7. Intervallo lineare delle rese utilizzando il protocollo EZ1 DSP Virus in combinazione con il test Adenovirus R-Gene™ PCR per l'estrazione dell'Adenovirus 5 dalle feci.

Precisione

Le deviazioni standard e i coefficienti di variazioni (CV) per le feci sono stati determinati per l'Adenovirus 5 utilizzando il test Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, France, rif. 96-010B) sullo strumento Rotor-Gene Q. Alle feci negative all'Adenovirus è stato aggiunto supernatante di colture cellulari di Adenovirus 5 e il DNA è stato estratto da 200 μ l di campioni (risospensione 1:10 in tampone ASL*) ed eluito in 120 μ l di tampone di eluizione (AVE). Sette analisi EZ1 con 9 o 10 replicati ciascuna sono state eseguite in tre giornate utilizzando tre strumenti EZ1 Advanced XL e tre combinazioni di lotti del kit EZ1 DSP Virus/tampone ASL. Tutti i campioni sono stati analizzati nella stessa PCR. I dati di precisione (Tabella 11) sono stati calcolati tenendo conto dei risultati di diversi strumenti, giorni, lotti e di tutte le analisi EZ1 nel loro insieme (totale).
*QIAGEN GmbH, cat. n° 19082

Tabella 11. Precisione del protocollo EZ1 DSP Virus in combinazione con il test Adenovirus R-Gene™ PCR per l'estrazione dell'Adenovirus 5 dalle feci.

Seduta	n	Copie/ml	Log copie/ml	DS (log copie/ml)	Intra-test	CV c/ml (%)			Totale
						3 Adv. XL	3 giorni	3 lotti	
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	–	–	–	–

Studio di correlazione

È stato condotto uno studio di correlazione che ha messo a confronto la procedura del kit EZ1 DSP Virus con un metodo di riferimento per l'estrazione del Norovirus del genogruppo II da 66 campioni di feci di pazienti. Gli acidi nucleici virali sono stati estratti da 200 µl di campioni (risospesi 1:10 in tampone ASL*) ed eluiti in 120 µl di tampone di eluizione (AVE). L'analisi è stata effettuata con un test RT-PCR interno per il Norovirus del genogruppo II (Tabella 12).

*QIAGEN GmbH, cat. n° 19082

Tabella 12. Correlazione fra la procedura EZ1 DSP e un metodo di riferimento

		Riferimento		
		Positivo	Negativo	Totale
EZ1 DSP Virus	Positivo	34	15	49
	Negativo	1	16	17
	Totale	35	31	66

Mezzi di trasporto

Intervallo lineare

L'intervallo lineare per il kit EZ1 DSP Virus è stato valutato estraendo HSV-1 e *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) dalla soluzione PreservCyt® (Cytoc Corporation, rif. 0200011). I test sono stati eseguiti con diluizioni di pool di virus quantificati, ottenute in mezzo di trasporto. Le serie di diluizioni con sei diversi titoli di virus sono state testate con 5 o 6 replicati per ogni serie. L'intervallo lineare del kit EZ1 DSP Virus è stato stabilito in un'analisi di confronto con un metodo di riferimento utilizzando il test *artus*® HSV1/2 TM PCR e il test *artus*® *C. trachomatis* TM PCR (Figura 8). Gli acidi nucleici virali sono stati estratti da 200 µl di campioni ed eluiti in 90 µl di tampone di eluizione (AVE).

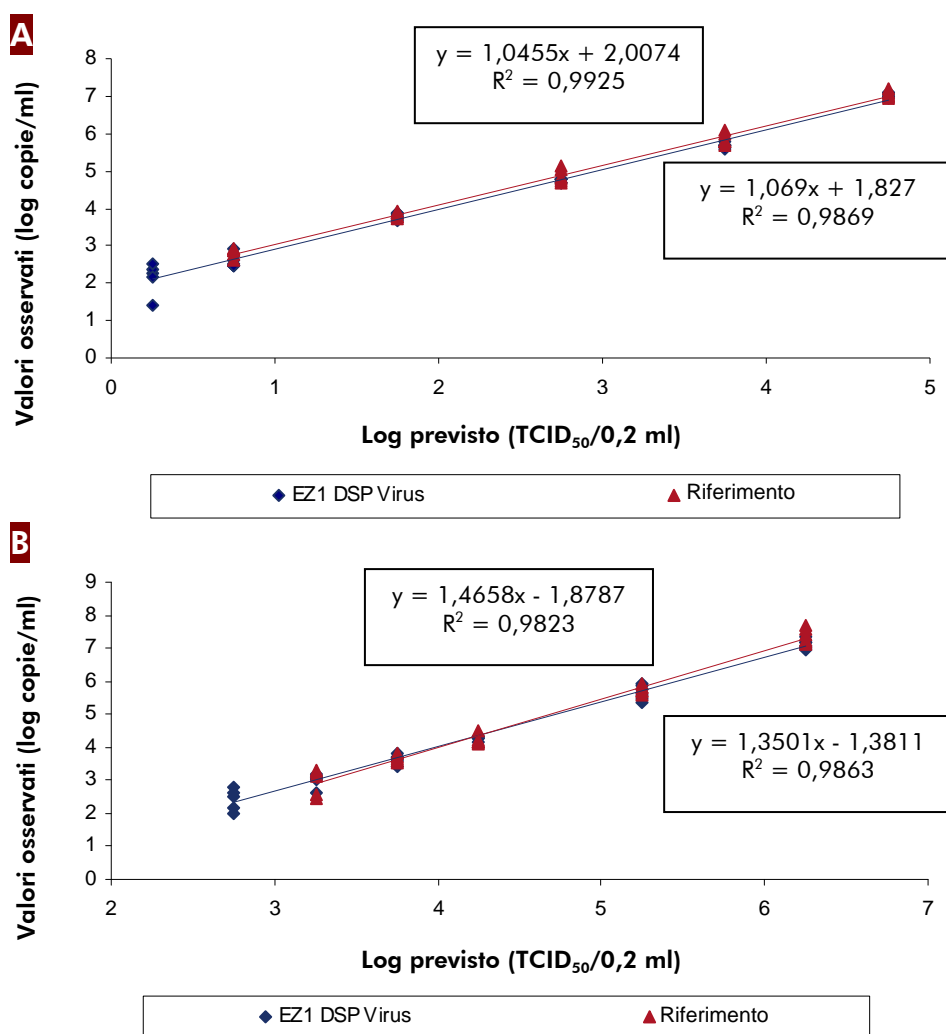


Figura 8. Intervallo lineare di rese utilizzando il protocollo EZ1 DSP Virus in combinazione con il test *artus*® *C. trachomatis* PCR (A) e il test *artus*® HSV1/2 TM TM PCR (B) per

L'estrazione di HSV-1 e C. trachomatis dal mezzo di trasporto. Questo studio è stato effettuato utilizzando come confronto un metodo di riferimento.

Precisione

Le deviazioni standard e i coefficienti di variazione (CV) per i mezzi di trasporto sono stati stabiliti per HSV-1 e C. trachomatis utilizzando il test *artus*[®] HSV1/2 TM PCR e il test *artus*[®] C. trachomatis TM PCR. Il DNA virale e batterico è stato estratto da 400 µl di mezzo di trasporto ed eluito in 60 µl di tampone di eluizione (AVE). Cinque mezzi di trasporto sono stati estratti in 12 replicati ciascuno in sei analisi EZ1, in tre giornate, utilizzando tre lotti di kit EZ1 DSP Virus. Tutti i campioni sono stati analizzati nella stessa PCR. La precisione intermedia per C. trachomatis (Tabella 13) e HSV-1 (Tabella 14) è stata calcolata tenendo conto di tutti i replicati di ogni mezzo di trasporto (diverse analisi EZ1, diversi giorni e lotti).

Tabella 13. Precisione del protocollo EZ1 DSP Virus in combinazione con il kit *artus*[®] C. trachomatis RG PCR per l'estrazione del C. trachomatis da mezzi di trasporto.

Mezzo	n	Log TCID ₅₀ nominale / 0,2 ml	Copie osservate/ ml	Precisione intermedia	Log copie osservate/ ml	DS (log copie/ml)
				CV copie/ml (%)		
¹ Mezzo di trasporto campione (STM) QIAGEN	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 Mezzo di trasporto universale (UTM) Copan	12	3,75	76.099	9	4,88	0,04

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

Tabella 14. Precisione del protocollo EZ1 DSP Virus in combinazione con il kit artus® HSV1/2 RG PCR per l'estrazione dell'HSV-1 da mezzi di trasporto.

Mezzo	n	Log TCID ₅₀ nominale / 0,2 ml	Copie osservate/ ml	Precisione intermedia	Log copie osservate/ ml	DS (log copie/ml)
				CV copie/ml (%)		
¹ Mezzo di trasporto campione (STM) QIAGEN	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 Mezzo di trasporto universale (UTM) Copan	12	4,25	15.999	39	4,17	0,18

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

Prestazioni cliniche (HPV)

Aliquote di DNA purificato ottenuto da 108 campioni, comprendenti 50 campioni HC2-positivi raccolti in mezzo di trasporto del campione (Specimen Transport Medium - STM), 50 campioni HC2-positivi raccolti in soluzione PreservCyt® e 8 campioni HC2-negativi raccolti in STM (Specimen Transport Medium - STM), sono stati testati con il test *digene*® HPV Genotyping RH (cat. n° 613413) e il test *digene*® HPV Genotyping LQ (cat. n° 613215) in un'analisi di confronto con il sistema Free University RLB*.

I risultati sono stati classificati come identici (genotipi conformi al 100%), compatibili (almeno un genotipo in comune) o discrepanti (nessun genotipo conforme). Le discrepanze (risultati di genotipizzazione discrepanti) sono state risolte ripetendo entrambi i test e, in caso di discrepanze persistenti, mediante successiva analisi con un terzo test di genotipizzazione e rilevazione dell'HPV sensibile [SPF10-LiPA25 (versione 1)].

I risultati hanno mostrato per entrambi i test di genotipizzazione un livello molto basso di campioni discrepanti (2%) in seguito a risoluzione dei campioni inizialmente discrepanti, in un'analisi di confronto con il metodo di riferimento (Tabella 15).

Tabella 15. Confronto del test digene HPV Genotyping RH (A) e del test digene HPV Genotyping LQ con il sistema Free University RLB* utilizzando la procedura del kit EZ1 DSP Virus per l'estrazione di HPV dal mezzo di trasporto

Tipo di risultato	A % di campioni clinici	B % di campioni clinici
Identico	80	58
Compatibile	18	12
Discrepante	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.

Prestazioni cliniche (Influenza A)

Per dimostrare le prestazioni cliniche, 102 campioni di tampone nasofaringeo caratterizzati, raccolti in mezzo di trasporto universale (Universal Transport Medium - UTM) (Copan Diagnostics Inc., cat. n° 330C), sono stati testati utilizzando il kit EZ1 DSP Virus per l'estrazione degli acidi nucleici. L'RNA dell'Influenza A è stato rilevato utilizzando il kit *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR e il test approvato EUA Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR (Tabella 16).

Tabella 16. Confronto fra il kit *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR e il test approvato EUA Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR, utilizzando il kit EZ1 DSP Virus per l'estrazione del virus dell'influenza A stagionale e dell'influenza 2009 H1N1 da tamponi nasofaringei

		Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR			Totale
		Positivo all'infl. A stagionale	Positivo a 2009 H1N1	Negativo	
<i>artus</i> [®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR	Positivo all'infl. A stagionale	5	0	2	7
	Positivo a 2009 H1N1	0	27	1	28
	Negativo	0	0	67	67
Totale		5	27	70	102

Tamponi asciutti

Intervallo lineare

L'intervallo lineare per il kit EZ1 DSP Virus è stato valutato estraendo HSV-1 e *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) da tamponi in cotone Puritan (rif. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC). I test sono stati effettuati con diluizioni di materiale standard quantificato. È stato aggiunto materiale patogeno a saliva umana e il tutto trasferito su tampone. In seguito a disidratazione, i patogeni sono stati reisolati dal tampone asciutto mediante risospensione in 600 μ l di tampone ATL*. Le serie di diluizioni con sei diversi titoli di virus sono state testate con 5 o 6 replicati per ogni serie. L'intervallo lineare del kit EZ1 DSP Virus è stato stabilito in un'analisi di confronto con un metodo di riferimento utilizzando il test *artus*[®] HSV1/2 TM PCR e il test *artus*[®] C. trachomatis TM PCR (Figura 9). Gli acidi nucleici virali sono stati estratti da 400 μ l di campioni ed eluiti in 150 μ l di tampone di eluizione (AVE).

*QIAGEN GmbH, cat. n° 939016

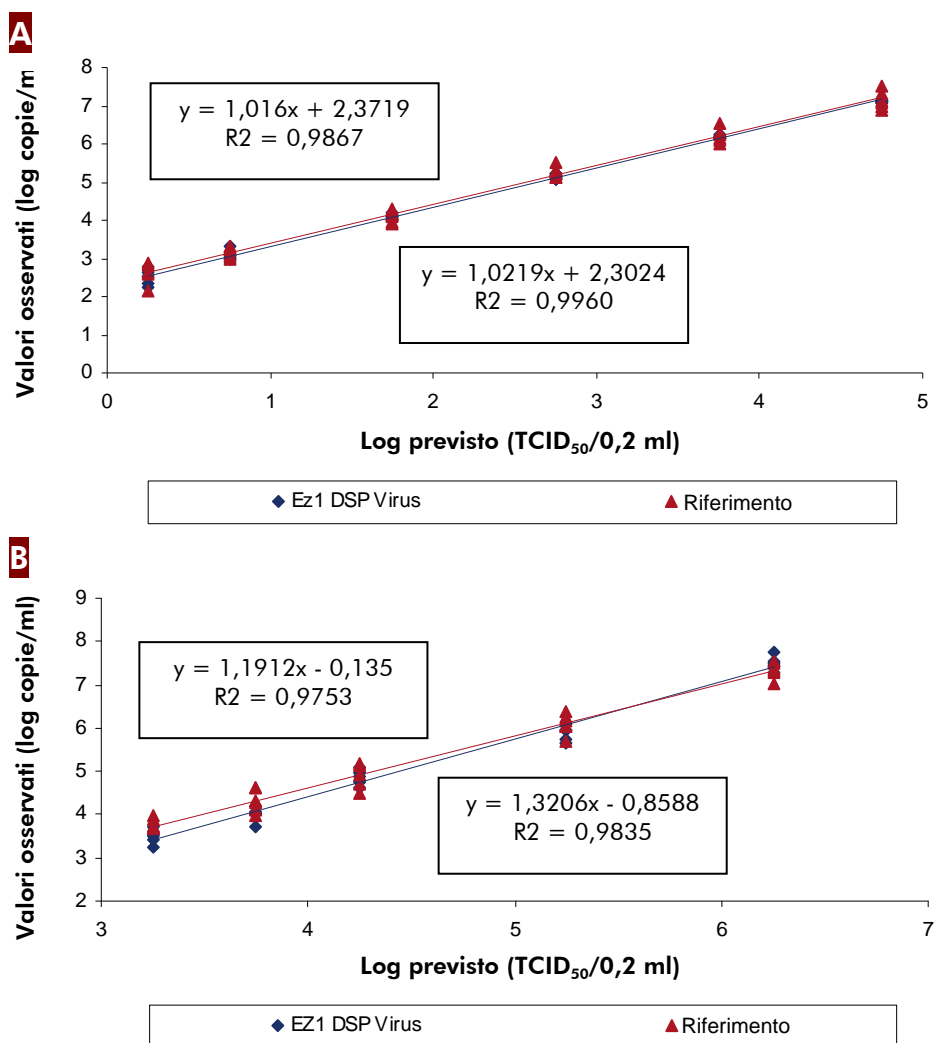


Figura 9. Intervallo lineare di rese utilizzando il protocollo EZ1 DSP Virus in combinazione con il test *artus*[®] *C. trachomatis* PCR (A) e il test *artus*[®] HSV1/2 TM TM PCR (B) per l'estrazione di *C. trachomatis* e HSV-1 da tamponi in cotone asciutti. Questo studio è stato effettuato utilizzando come confronto un metodo di riferimento.

Precisione

Le deviazioni standard e i coefficienti di variazione (CV) per i tamponi asciutti sono stati stabiliti per HSV-1 e *C. trachomatis* utilizzando il test *artus*[®] HSV1/2 TM PCR e il test *artus*[®] *C. trachomatis* TM PCR. Tamponi floccati Copan (cat. n° 502CS0, Copan Italia S.p.A.) e tamponi in cotone Puritan (rif. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC). I tamponi asciutti sono stati preparati e pretrattati come descritto sopra e il DNA virale e batterico è stato estratto da un volume di campioni di 400 µl ed eluito in 60 µl di tampone di eluizione (AVE). L'estrazione è stata effettuata da tre donatori di saliva con 8 o 9 replicati ciascuno, in sei analisi EZ1, in tre giornate e con tre combinazioni di lotti

del kit EZ1 DSP Virus Kit/tampone ATL. Tutti i campioni sono stati analizzati nella stessa PCR. La precisione intermedia per *C. trachomatis* (Tabella 17) e HSV-1 (Tabella 18) è stata calcolata tenendo conto di tutti i replicati di ogni donatore e tipo di tampone (diverse analisi EZ1, giorni e lotti).

Tabella 17. Precisione del protocollo EZ1 DSP Virus in combinazione con il kit artus® C. trachomatis RG PCR per l'estrazione del C. trachomatis da tamponi asciutti.

Tipo di tampone	Donatore	n	Log TCID ₅₀ nominale/ 0,2 ml	Copie osservate/ml	Precisione intermedia CV copie/ml (%)	Log copie osservate/ml	DS (log copie/ml)
Tamponi in cotone 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
Tamponi floccati 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

Tabella 18. Precisione del protocollo EZ1 DSP Virus in combinazione con il kit artus® HSV1/2 RG PCR per l'estrazione dell'HSV-1 da tamponi asciutti.

Tipo di tampone	Donatore	n	Log TCID ₅₀ nominale/ 0,2 ml	Copie osservate/ml	Precisione intermedia CV copie/ml (%)	Log copie osservate/ml	DS (log copie/ml)
Tamponi in cotone Puritan	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
Tamponi floccati Copan	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

Campioni respiratori (espettorato)

Studio di correlazione

Uno studio di correlazione è stato condotto per il kit EZ1 DSP Virus per l'estrazione di *Mycobacterium tuberculosis* da espettorato umano negativo. Una serie di diluizioni con 4 diversi titoli di virus è stata testata in singoli replicati in un'analisi di confronto con un metodo di riferimento. Il DNA batterico è stato estratto da 200 μl di espettorato, pretrattato con Sputasol (Oxoid Limited, rif. SR0233) e lysozyme (Sigma-Aldrich, cat. n° L6876), come descritto nel Manuale del kit EZ1 DSP Virus, versione 4, ed eluito in 90 μl di tampone di eluizione (AVE). L'analisi è stata effettuata con il test *artus*[®] *M. tuberculosis* RG PCR (Figura 10).

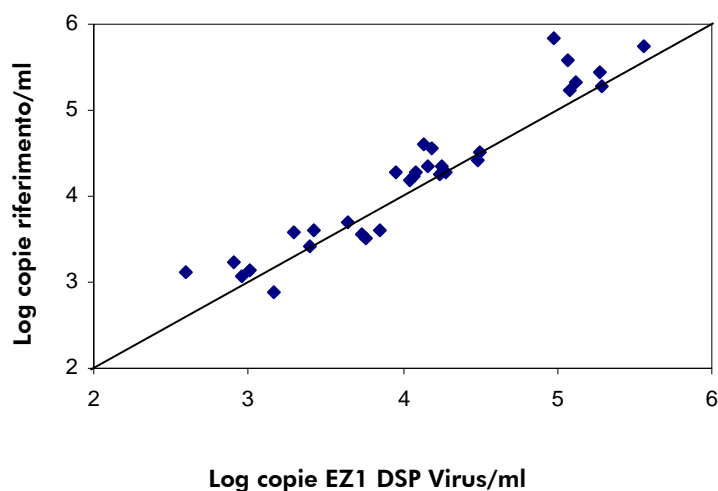


Figura 10. Correlazione fra la procedura del kit EZ1 DSP e un metodo di riferimento.

Per informazioni di licenza aggiornate o per le clausole di responsabilità specifiche del prodotto, fare riferimento al manuale del kit QIAGEN o al manuale utente. I manuali del kit QIAGEN e i manuali utente sono disponibili sul sito www.qiagen.com o possono essere richiesti al centro di assistenza tecnica QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, *artus*®, EZ1®, Rotor-Gene® (Gruppo QIAGEN Group); 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® (Cytoc Corp.); Surepath® (Becton, Dickinson and Company)

Febbraio-11 © 2011 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

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