

Kit EZ1[®] DSP Virus

El rendimiento del kit EZ1 DSP Virus se ha establecido en estudios de evaluación del rendimiento en los que se han utilizado plasma, suero, LCR, orina, sangre completa, heces, medios de transporte, torundas desecadas y muestras respiratorias para llevar a cabo el aislamiento de ácidos nucleicos virales y ADN bacteriano. Las pruebas se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos en la versión 4 actual del Manual para el kit EZ1 DSP Virus.

Sin embargo, no se garantiza el rendimiento del kit para cada especie viral o bacteriana y debe ser validado por el usuario. Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema para cualquier procedimiento utilizado en su laboratorio que no esté cubierto por los estudios de evaluación del rendimiento de QIAGEN.

Características de rendimiento

Suero y plasma

Rango lineal

El rango lineal para el kit EZ1 DSP Virus se evaluó para los virus ARN VIH-1 y VHC y el virus ADN VHB. Las pruebas se realizaron con diluciones de paneles de virus cuantificados en suero o plasma humanos negativos para el VIH-1, VHB y VHC. Se analizaron series de diluciones con seis diferentes títulos de virus con 12 réplicas cada uno.

Se ha determinado el rango lineal del procedimiento del kit EZ1 DSP Virus para VHB, VHC y VIH-1 con los ensayos de carga viral Abbott RealTime (Tabla 1, Figura 1). Se agregaron controles internos RealTime (17 μ l cada uno) directamente a cada muestra de VHC ó VIH-1 antes de la extracción. Para el ensayo RealTime HBV, se combinaron 3,4 μ l de control interno RealTime HBV con el ARN transportador para cada muestra. Se purificaron los ácidos nucleicos virales a partir de 400 μ de muestras y se eluyeron en 90 μ l de tampón de elución (AVE). La PCR se realizó en el Abbott m2000rt.



Tabla 1. Procedencia de las muestras y ensayos posteriores aplicados a la determinación del rango lineal con el protocolo del EZ1 DSP Virus

Virus	Fuente	Ensayo posterior	Manual de ensayo utilizado
VIH-1	BBI (Boston Biomedica, Inc., Boston, USA) recalificado defectuoso BBI, VIH	Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular Inc.) plasma	Abbott RealTime HIV-1
VHC	ProMedDx (ProMedDx LLC Norton, MA, USA) un paciente, normal agrupado	Abbott RealTime HCV (Abbott Molecular Inc.) muestra de suero humano	Abbott RealTime HCV
VHB	Teragenix Corporation, Ft. FL, USA) muestra de un paciente, plasma recalificado	Abbott RealTime HBV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HBV

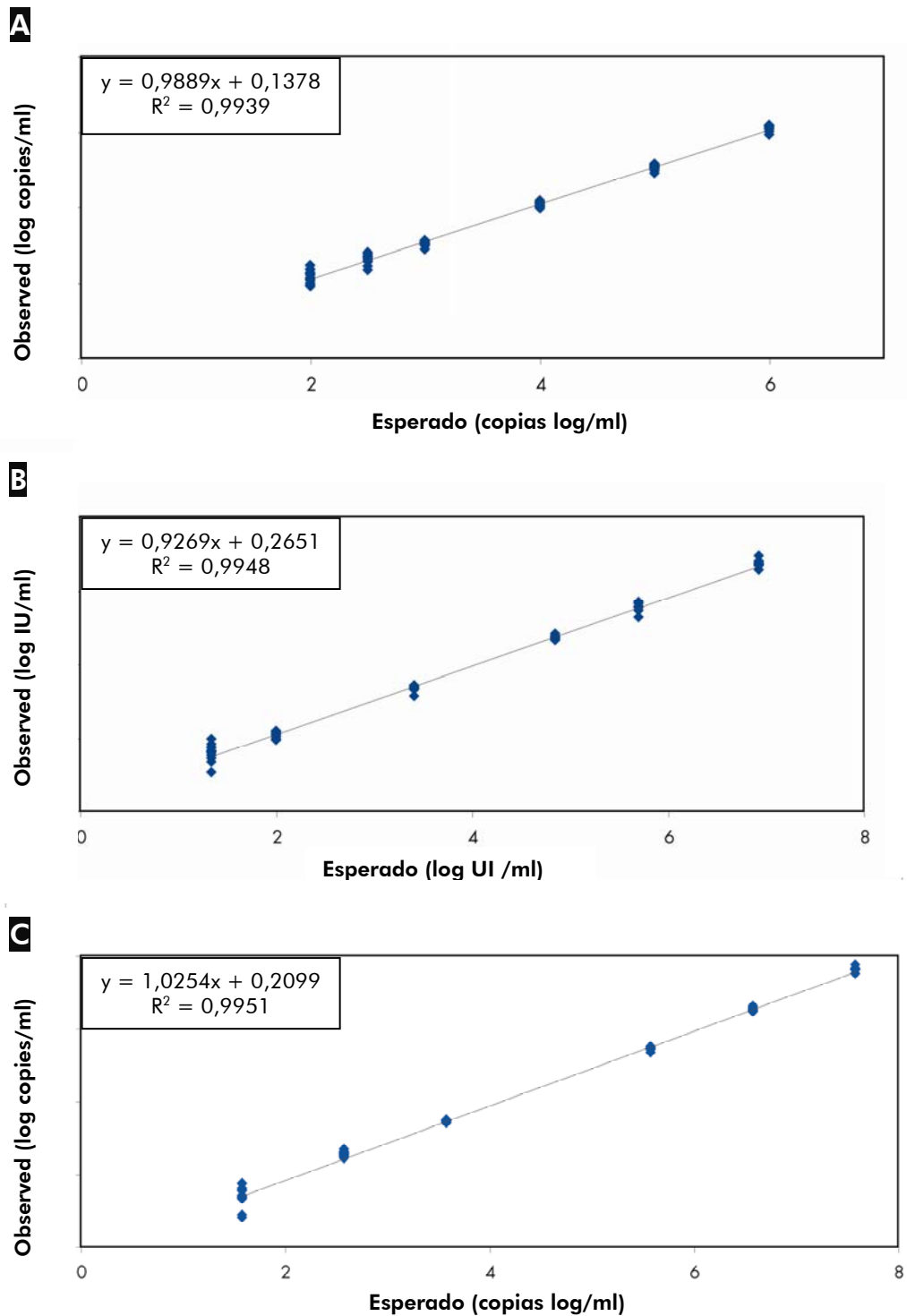


Figura 1. Rango lineal utilizando el protocolo del EZ1 DSP Virus. El rango lineal del protocolo del EZ1 DSP Virus se determinó utilizando series de dilución viral y ensayos con el Abbott RealTime (tabla 1) **A** para VIH-1, **B** para VHC, y **C** para VHB.

Precisión

Las desviaciones estándar y los coeficientes de variación (CVs) se determinaron para las series de diluciones de VIH-1, VHC y VHB en el rango lineal de los ensayos posteriores adecuados. Para el análisis de precisión, se utilizaron los mismos ensayos posteriores que en el caso de la determinación del rango lineal (Tabla 1, página 2). Los datos de precisión para el inter-ensayo se muestran en las tablas 2–4. Para cada miembro del panel, se analizaron 12 réplicas en 12 series analíticas independientes en el BioRobot EZ1 DSP. La PCR se realizó en 2 series analíticas de 6 réplicas cada una en el Abbott m2000rt.

Tabla 2. Precisión inter-ensayo del protocolo del EZ1 DSP Virus usando el ensayo para el ensayo Abbott RealTime HIV-1

Miembro de panel	n	Copias/ml	CV (%)	copias log/ml	SD (copias 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

Table 3. Inter-assay precision of the EZ1 DSP Virus protocol using the Abbott RealTime HCV assay

Miembro de panel	n	UI/ml	CV (%)	log UI/ml	SD (log UI/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

Tabla 3. Precisión inter-ensayo del protocolo EZ1 DSP Virus usando el ensayo Abbott RealTime HBV

Miembro de panel	n	Copias/ml	CV (%)	log copias/ml	SD (copias 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

Límite de detección

El límite de detección se determinó para el sistema EZ1 DSP Virus usando el valor probit del 95% utilizando el estándar de virus internacional 97/656 del VIH-1 de la OMS, estándar de virus internacional 97/746 del VHB de la OMS y la cuantificación del CMV a partir de sobrenadante de cultivo celular. El límite de detección se determinó al procesar series de dilución de los virus determinados. Los virus se diluyeron en mezcla de plasma humano con EDTA, negativo para CMV, VHB y VIH. Cada paso de dilución se preparó en por lo menos 3 series analíticas independientes con por lo menos 6 réplicas por dilución. Se utilizaron 400 μ l de plasma para la preparación de muestras en el BioRobot EZ1 DSP con una elución en 60 μ l.

Se utilizaron kits *artus*[®] HBV PCR para la detección del ADN del VHB y kits *artus* CMV PCR para la detección del ADN del CMV. Las muestras se analizaron en un Instrumento LightCycler[®] 1.2 (Roche), un Rotor-Gene[®] 3000 (Corbett-Research) y un ABI PRISM[®] 7000 SDS (Applied Biosystems). Se utilizó la prueba COBAS[®] Amplicor[®] HIV-1Monitor[®] (versión 1.5) para la detección del ARN del VIH utilizando el COBAS Amplicor Analyzer. Los datos combinados para todas las muestras se evaluaron utilizando un análisis probit. Los datos se presentan en las tablas 5–6, con diagramas probit representativos en las figuras 2–3.

Tabla 4. Límite de detección del ADN del VHB utilizando el sistema EZ1 DSP Virus y el kit *artus* HBV PCR

Virus	Entrada	Aciertos (LightCycler)	Aciertos (Rotor-Gene)	Aciertos (ABI PRISM)
HBV	Valor probit 95% (UI/ml)	45,7	14,4	13,2
	Intervalo de confianza (UI/ml)	28–102	9,5–26,5	9,0–23,1
CMV	Valor probit 95% (copias/ml)	67,2	21,8	38,3
	Intervalo de confianza (copias/ml)	41,8–142	14,5–44,1	21,5–89,8

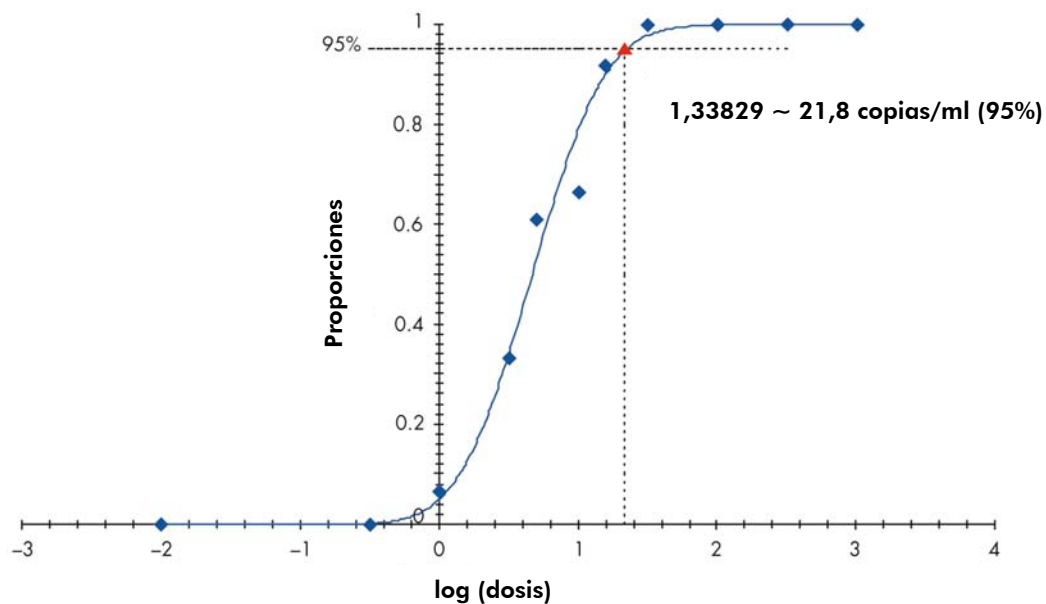


Figura 2. Análisis probit para la detección del ADN del CMV utilizando el sistema EZ1 DSP Virus y el kit *artus* CMV RG PCR. Los ácidos nucleicos virales se purificaron utilizando el sistema EZ1 DSP Virus, y el kit *artus* CMV RG PCR se utilizó para la detección del ADN del CMV con el Rotor-Gene 3000. El valor probit del 95% fue de 21,8 copias/ml.

Tabla 5. Límite de detección del ARN del VIH utilizando el sistema EZ1 DSP Virus y el COBAS Amplificador HIV-1 Monitor Test, versión 1.5

Entrada (UI/ml)	Aciertos
Valor probit del 95% (UI/ml)	114,5
Intervalo de confianza (UI/ml)	82,9–194,3

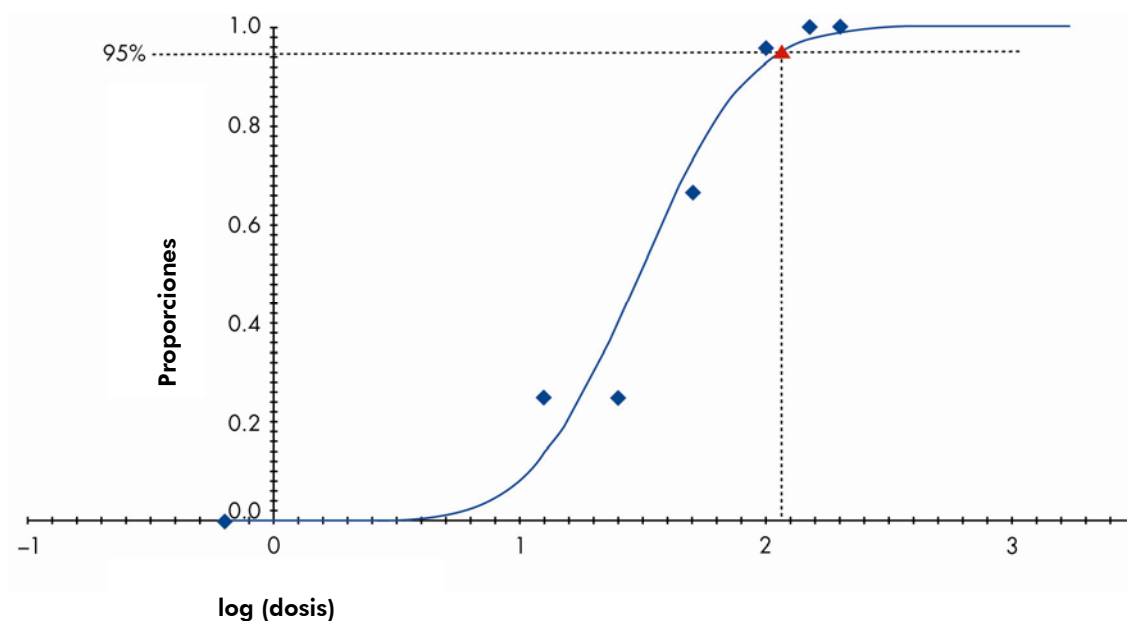


Figura 3. Análisis probit para la detección del ARN del VIH utilizando el sistema EZ1 DSP Virus y el COBAS Amplificador HIV-1 Monitor Test, versión 1.5. Los ácidos nucleicos virales se purificaron utilizando el sistema EZ1 DSP Virus, con un volumen de extracción de 400 μ l y un volumen de elución de 60 μ l. La prueba COBAS Amplificador HIV-1 Monitor se utilizó para la detección del ARN del VIH en el COBAS Amplificador Analyzer en el modo ultrasensitivo. El valor probit del 95% fue de 114,5 UI/ml.

Exclusión de transferencia de muestras

Se efectuaron nueve series analíticas (por instrumento) en el BioRobot EZ1 DSP, el EZ1 Advanced y el EZ1 Advanced XL para evaluar el riesgo de casos de contaminación cruzada durante y entre los procedimientos del kit EZ1 DSP Virus. Las pruebas se efectuaron utilizando una muestra cuantificada de un paciente con parvovirus B19. La carga viral de muestras positivas utilizadas para las pruebas de transferencia fue de $1,0 \times 10^8$ UI/ml. Para la dilución de muestras positivas así como de muestras de control negativas, se utilizó una mezcla de plasma con EDTA, negativa para el parvovirus B19 humano.

Para detectar la transferencia entre muestras, se efectuaron 2 series analíticas en cada uno de los instrumentos usando un diseño en tablero de ajedrez alternando muestras negativas y altamente

positivas. Una de cada tres series analíticas se efectuó utilizando únicamente muestras negativas para analizar la posible contaminación entre series. Este diseño se repitió tres veces resultando en un total de nueve series analíticas en cada uno de los instrumentos. El ADN del parvovirus B19 fue detectado y cuantificado utilizando el kit *artus* Parvo B19 RG PCR con marcado CE-IVD en el Rotor-Gene 3000. El límite de detección analítico del kit *artus* Parvo B19 RG PCR es de 0,2 UI/ μ l en el eluato ($p = 0,05$). Esto indica que hay una probabilidad del 95% de detectar 0,2 IU/ μ l en el eluato.

Todas las muestras altamente positivas se detectaron como positivas utilizando el kit *artus* Parvo B19 RG PCR. Ni en las series analíticas con diseño de tablero de ajedrez y ni en las que se utilizaron controles negativos se midieron señales de detección (la tabla 7 muestra los resultados obtenidos en el BioRobot EZ1 DSP). Estos experimentos demuestran que no se produce contaminación cruzada entre las muestras durante la ejecución del protocolo del kit EZ1 DSP Virus en estas condiciones.

Tabla 6. Análisis de contaminación cruzada y valores C_T para la detección del ADN del parvovirus B19 utilizando el BioRobot EZ1 DSP

Serie analítica	Posición					
	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 C_T medio de todas las muestras = $15,40 \pm 0,18$ (CV = 1,14%)

X: Negativa después de 45 ciclos de PCR.

Estabilidad

La estabilidad del ARN y ADN virales se determinó en los eluatos obtenidos utilizando el kit EZ1 DSP Virus. Plasma humano con EDTA se mezcló con 1×10^3 UI/ml de ARN del VHC (AcroMetrix OptiQuant® HCV RNA) y con el estándar del parvovirus B19 (VQC). Se procesaron 18 réplicas por cada intervalo y condición de incubación usando el sistema EZ1 DSP Virus. Los eluatos que

contenían ADN del parvo B19 y ARN del VHC se incubaron 6 horas a 30 °C, 14 días a 4 °C, 12 semanas a -20 °C y 9 meses a -80 °C. Este estudio aún se está realizando actualmente. Los eluatos se analizaron utilizando una RT-PCR validada para el VHC a nivel interno del laboratorio y el *artus* Parvo B19 RG PCR. Una de las 18 réplicas de la RT-PCR para el ARN del VHC no se detectó después de que se almacenara la muestra a 4 °C durante 14 días (figura 4).

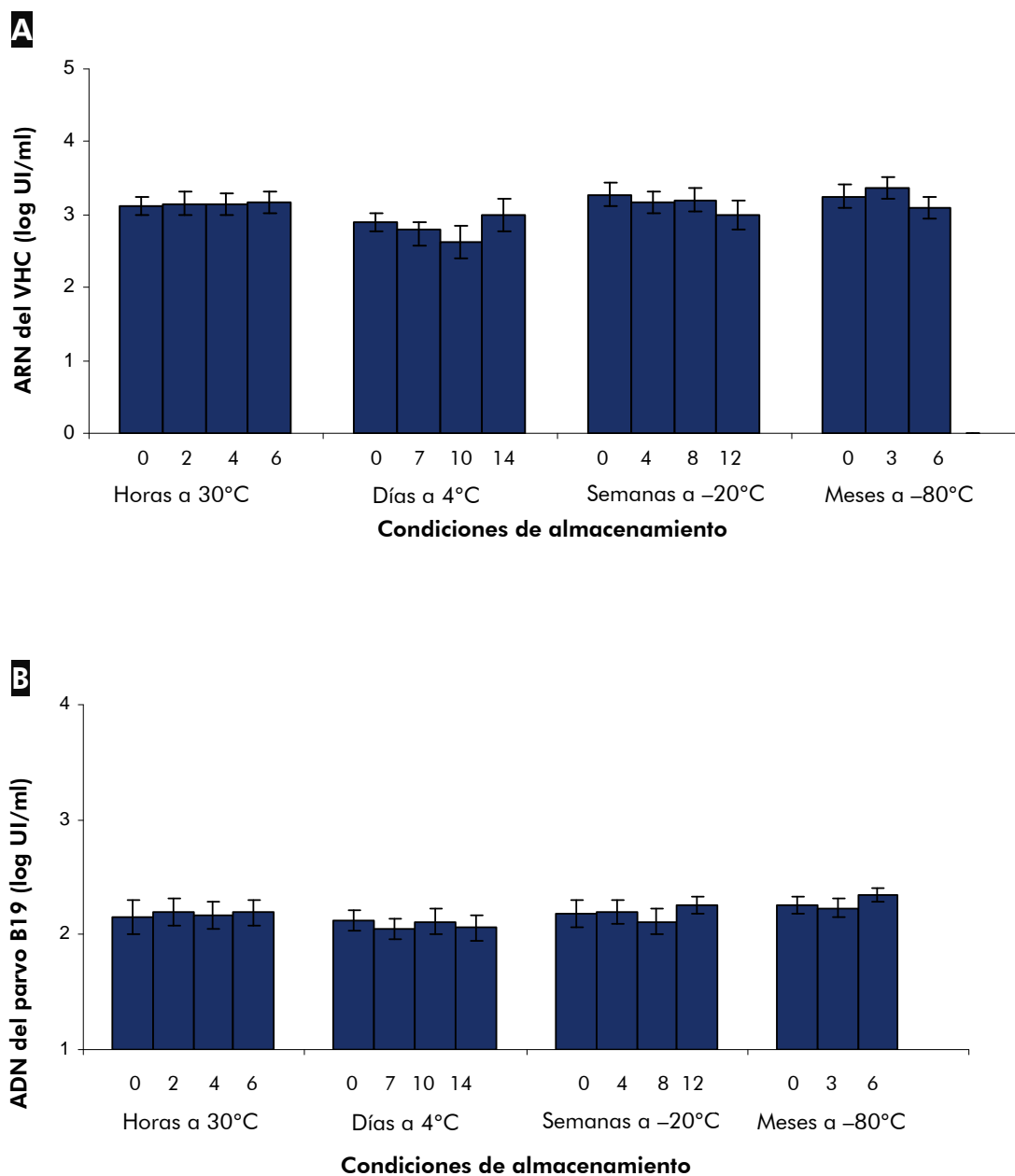


Figura 4. Estabilidad de los ácidos nucleicos virales. Se determinó la estabilidad del ARN y ADN en los eluatos obtenidos usando el kit EZ1 DSP Virus para el **A ARN del VHC y **B** ADN del parvovirus B19.**

Reproducibilidad

La reproducibilidad se determinó usando 3 BioRobot EZ1 DSP diferentes en 3 días distintos (véase la tabla 8). Para cada prueba (A–G) se procesaron 12 réplicas en 2 series analíticas diferentes en el BioRobot EZ1 DSP. Plasma humano con EDTA se mezcló con 1×10^4 UI/ml de ARN del VHC (AcroMetrix OptiQuant HCV RNA) y 1×10^3 UI/ml de ADN del VHB (AcroMetrix OptiQuant HBV DNA). Se determinó el ADN del VHB usando el kit *artus* HBV RG PCR, y para la detección del ARN del VHC se utilizó una RT-PCR validada interna del laboratorio.

El procedimiento automatizado presenta una alta reproducibilidad, tal como se muestra en la comparación de resultados de la purificación de ácidos nucleicos virales en 3 BioRobot EZ1 DSP diferentes en 3 días distintos (figura 5).

Tabla 8. Preparación de la prueba de reproducibilidad

Preparación de la prueba	Día 1	Día 2	Día 3
BioRobot EZ1 DSP I	Prueba A	Prueba D	Prueba F
BioRobot EZ1 DSP II	Prueba B	Prueba E	
BioRobot EZ1 DSP III	Prueba C		Prueba G

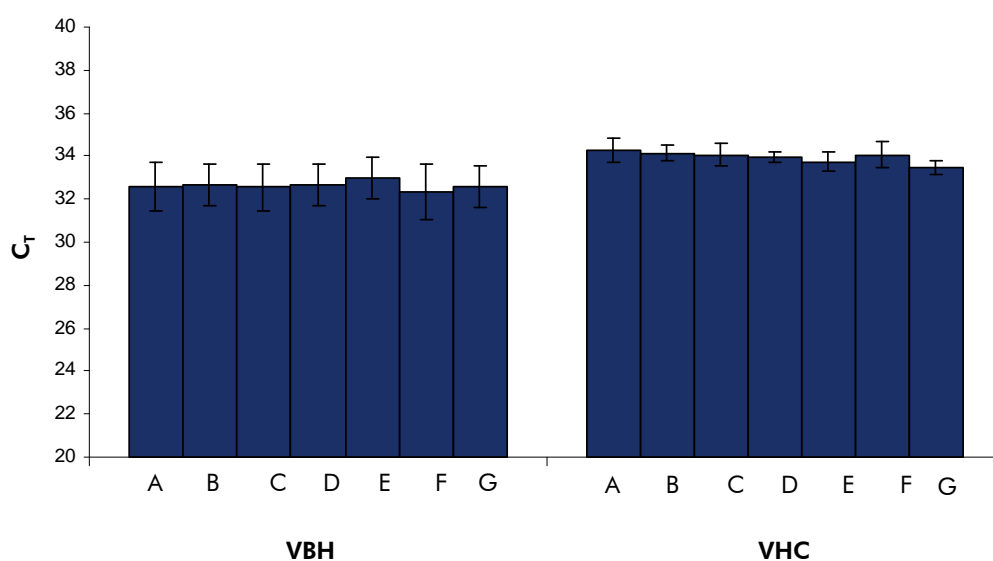


Figura 5. Reproducibilidad. La reproducibilidad se determinó en tres BioRobot EZ1 DSP diferentes y en tres días distintos.

Orina

El rendimiento del kit EZ1 DSP Virus para su uso con muestras de orina se evaluó por comparación con el plasma utilizando paneles de virus cuantificados de CMV (virus de ADN) y VHC (virus de ARN) diluidos en el material de muestra respectivo. Se trataron muestras de orina y de plasma de acuerdo con el Manual para el kit EZ1 DSP Virus y se extrajeron volúmenes de muestra equivalentes con el kit EZ1 DSP Virus. Los ácidos nucleicos virales se detectaron utilizando los kits *artus*[®] CMV RG PCR y *artus*[®] HCV RG RT-PCR. La evaluación del rendimiento del kit EZ1 DSP Virus comparando orina y plasma mostró una discrepancia de sólo ~ 2% (basada en los valores de C_T) para ambos virus, CMV y VHC (tabla 9).

Tabla 9. Comparación del procedimiento EZ1 DSP Virus para su uso con muestras de orina y plasma.

Tipo de muestra	n	Valor de CT	Cociente orina/plasma (valor de CT)	Copias/ml	Cociente orina/plasma (copias/ml)
CMV					
Orina	4	31,60	0,98	6.250	1,51
Plasma	5	32,17		4.130	
VHC					
Orina	4	37,83	1,02	278	0,77
Plasma	5	37,25		363	

Sangre completa

Rango lineal

El rango lineal para el kit EZ1 DSP Virus se evaluó utilizando el VEB como virus de ADN. Las pruebas se realizaron con diluciones de paneles de virus cuantificados en sangre completa humana negativa para el VEB. Se analizaron series de diluciones con seis títulos diferentes de virus con 4 réplicas cada uno. Se purificaron los ácidos nucleicos virales a partir de 200 μ l de sangre completa (mezclada con 200 μ l de tampón ATL) y se eluyeron en 60 μ l de tampón de elución (AVE). Se ha determinado el rango lineal del procedimiento del kit EZ1 DSP Virus para el VEB con el kit *artus*[®] EBV RG PCR en el instrumento Rotor-Gene Q (figura 6).

*QIAGEN GmbH, n.º ref. 939016

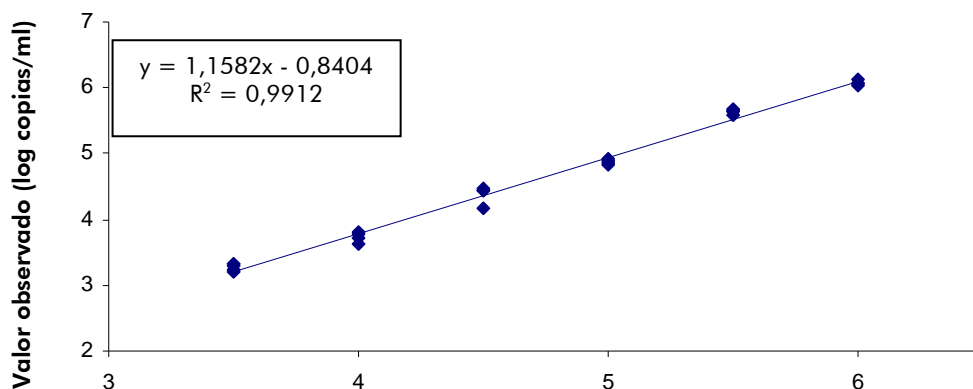


Figura 6. Rango lineal de obtención con el protocolo EZ1 DSP Virus en combinación con el ensayo *artus*[®] EBV RG PCR para la extracción de VEB a partir de sangre completa.

Precisión

Se determinaron las desviaciones típicas y los coeficientes de variación (CV) en sangre completa para el CMV utilizando el kit *artus*[®] CMV RG PCR con el instrumento Rotor-Gene Q. Los datos de precisión interanalítica se muestran en la tabla 10. Se analizó sangre completa de 13 donantes de sangre en 5 réplicas en series analíticas diferentes con el instrumento EZ1 Advanced XL. Se purificaron los ácidos nucleicos virales a partir de 200 µl de sangre completa (mezclada con 200 µl de tampón ATL) y se eluyeron en 120 µl de tampón de elución (AVE).

*QIAGEN GmbH, n.º ref. 939016

Tabla 10. Precisión interanalítica del protocolo EZ1 DSP Virus en combinación con el kit *artus*[®] CMV RG PCR para la extracción de CMV a partir de sangre completa.

Donante	n	Copias/ml	CV (%)	log copias/ml	DT (log copias/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

Heces

Rango lineal

El rango lineal para el kit EZ1 DSP Virus se evaluó utilizando el adenovirus 5 como virus de ADN. Las pruebas se realizaron con diluciones seriadas de 10 veces del sobrenadante del cultivo celular en heces negativas para adenovirus. Se analizaron series de diluciones con cinco diluciones diferentes del virus con 10 réplicas cada una. Se purificaron los ácidos nucleicos virales a partir de muestras de 200 μl (resuspensión 1:10 en tampón ASL*) y se eluyeron en 120 μl de tampón de elución (AVE). El rango lineal del procedimiento EZ1 DSP Virus se ha determinado en combinación con el ensayo Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, Francia, ref. 96-010B) con el instrumento Rotor-Gene Q en comparación con un método de extracción de referencia (figura 7).

*QIAGEN GmbH, n.º ref. 19082

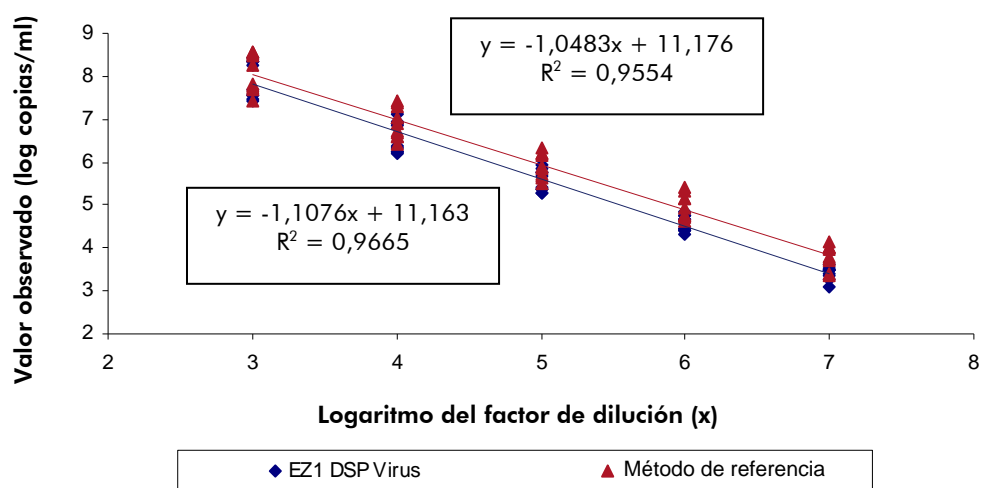


Figura 7. Rango lineal de obtención con el protocolo EZ1 DSP Virus en combinación con el ensayo Adenovirus R-Gene™ PCR para la extracción del adenovirus 5 a partir de heces.

Precisión

Se determinaron las desviaciones típicas y los coeficientes de variación (CV) en heces para el adenovirus 5 utilizando el ensayo Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, Francia, ref. 96-010B) con el instrumento Rotor-Gene Q. Se añadió el sobrenadante de un cultivo celular de adenovirus 5 a heces negativas para adenovirus y se purificó el ADN viral a partir de muestras de 200 μl (resuspensión 1:10 en tampón ASL*) y se eluyó en 120 μl de tampón de elución (AVE). Se realizaron siete series analíticas de EZ1 con 9 ó 10 réplicas cada una durante tres días, con tres instrumentos EZ1 Advanced XL y con tres combinaciones de lotes de kit EZ1 DSP Virus/tampón ASL. Todas las muestras se analizaron en la misma serie de PCR. Los datos de precisión (tabla 11) se calcularon teniendo en cuenta los resultados de los diferentes instrumentos, días y lotes y de todas las series analíticas de EZ1 en conjunto (total).

*QIAGEN GmbH, n.º ref. 19082

Tabla 11. Precisión del protocolo EZ1 DSP Virus en combinación con el ensayo Adenovirus RGene™ PCR para la extracción del adenovirus 5 a partir de heces

Serie analítica	n	Copias/ml	log copias/ml	DT (log copias/ml)	Intraanálisis	CV copias/ml (%)			Total
						3 Adv. XL	3 días	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	–	–	–	–

Estudio de correlación

Se realizó un estudio de correlación para el procedimiento EZ1 DSP Virus en comparación con un método de referencia para la extracción de norovirus del genogrupo II a partir de 66 muestras de heces de pacientes. Se purificaron los ácidos nucleicos virales a partir de muestras de 200 µl (resuspensión 1:10 en tampón ASL*) y se eluyeron en 120 µl de tampón de elución (AVE). El análisis se realizó con un ensayo de RT-PCR interno frente al norovirus del genogrupo II (tabla 12).

*QIAGEN GmbH, n.º ref. 19082

Tabla 12. Correlación del procedimiento EZ1 DSP Virus con un método de referencia

		Método de referencia		
		Positivo	Negativo	Total
EZ1 DSP Virus	Positivo	34	15	49
	Negativo	1	16	17
	Total	35	31	66

Medios de transporte

Rango lineal

Se evaluó el rango lineal para el kit EZ1 DSP Virus extrayendo VHS-1 y *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) del medio PreservCyt® (Cytoc Corporation, ref. 0200011). Las pruebas se realizaron con diluciones de paneles de virus cuantificados en medios de transporte. Se analizaron series de diluciones con seis títulos diferentes de virus con 5 ó 6 réplicas cada una. Se ha determinado el rango lineal del kit EZ1 DSP Virus en comparación con un método de referencia con los ensayos *artus*® HSV1/2 TM PCR y *artus*® *C. trachomatis* TM PCR (figura 8). Se purificaron los ácidos nucleicos virales a partir de muestras de 200 µl y se eluyeron en 90 µl de tampón de elución (AVE).

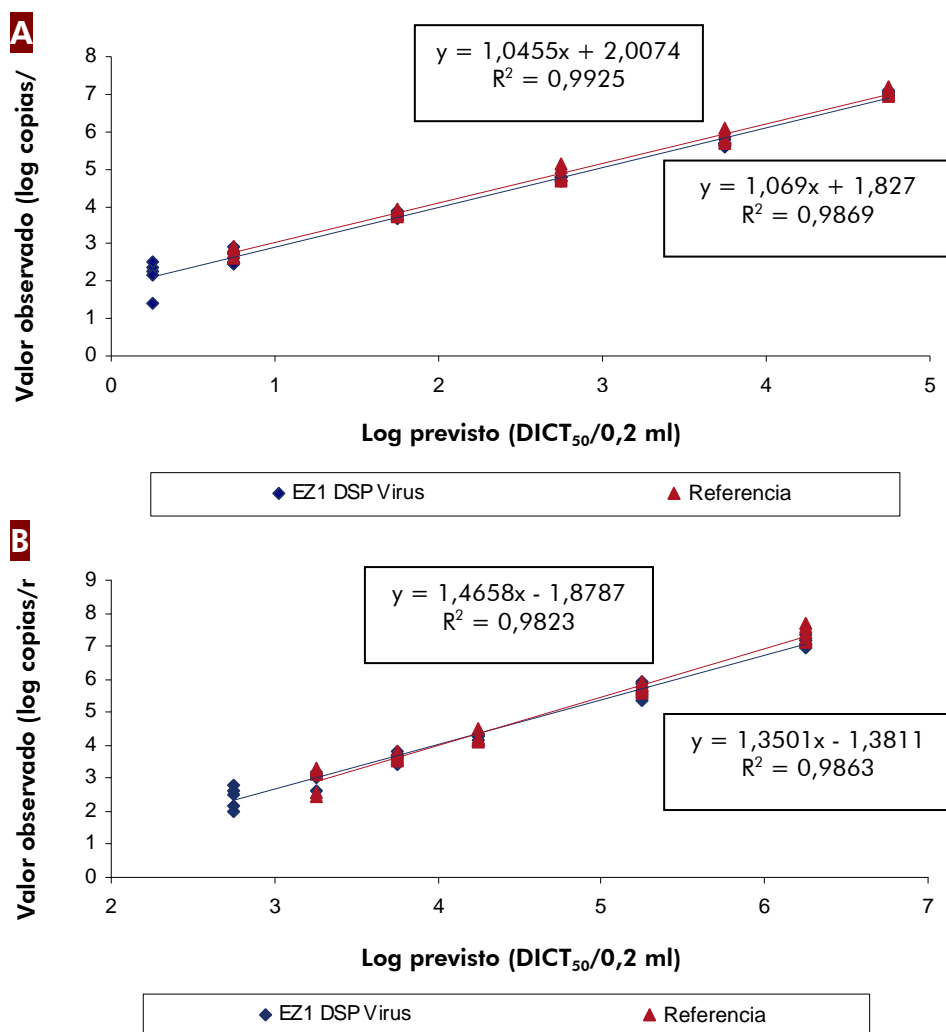


Figura 8. Rango lineal de obtención con el protocolo EZ1 DSP Virus en combinación con los ensayos *artus*® *C. trachomatis* PCR **(A)** y *artus*® HSV1/2 TM TM PCR **(B)** para la extracción de VHS-1 y *C. trachomatis* a partir de medios de transporte. El estudio se realizó en comparación con un método de referencia.

Precisión

Se determinaron las desviaciones típicas y los coeficientes de variación (CV) en medios de transporte para el VHS-1 y *C. trachomatis* con los ensayos *artus*[®] HSV1/2 TM PCR y *artus*[®] *C. trachomatis* TM PCR. Se purificó ADN viral y bacteriano a partir de 400 µl del medio y se eluyó en 60 µl de tampón de elución (AVE). Se realizó la extracción a partir de cinco medios de transporte con 12 réplicas cada uno en seis series analíticas de EZ1, en tres días y con tres lotes del kit EZ1 DSP Virus. Todas las muestras se analizaron en la misma serie de PCR. La precisión intermedia para *C. trachomatis* (tabla 13) y para el VHS-1 (tabla 14) se calculó teniendo en cuenta todas las réplicas de cada medio de transporte (diferentes series de EZ1, días y lotes).

Tabla 13. Precisión del protocolo EZ1 DSP Virus en combinación con el kit *artus*[®] *C. trachomatis* RG PCR para la extracción de *C. trachomatis* a partir de medios de transporte.

Medio	n	Valor nominal del log DICT ₅₀ /0,2 ml	Valor observado de copias/ml	Precisión intermedia CV copias/ml (%)	Valor observado de log copias/ml	DT (log copias/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 ref. 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 ref. 330C

Tabla 14. Precisión del protocolo EZ1 DSP Virus en combinación con el kit artus® HSV1/2 RG PCR para la extracción de VHS-1 a partir de medios de transporte.

Medio	n	Valor nominal del log DICT ₅₀ /0,2 ml	Valor observado de copias/ml	Precisión intermedia CV copias/ml (%)	Valor observado de log copias/ml	DT (log copias/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 ref. 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 ref. 330C

Rendimiento clínico (VPH)

Se analizaron alícuotas de ADN purificado a partir de un total de 108 muestras (50 muestras positivas para HC2 recogidas en STM, 50 muestras positivas para HC2 recogidas en PreservCyt® y 8 muestras negativas para HC2 recogidas en STM) con los ensayos *digene*® HPV Genotyping RH (n.º ref. 613413) y *digene*® HPV Genotyping LQ (n.º ref. 613215) en comparación con el sistema Free University RLB*.

Los resultados se clasificaron como idénticos (coincidencia genotípica del 100%), compatibles (al menos un genotipo en común) o discordantes (sin coincidencia genotípica). Las discrepancias (resultados genotípicos discordantes) se resolvieron repitiendo ambos ensayos y, en caso de persistencia de las discrepancias, mediante un análisis subsiguiente con un tercer ensayo sensible de genotipado y detección del VPH (SPF10-LiPA25 [versión 1]).

Los resultados mostraron un nivel muy bajo de muestras discrepantes (2%) tras la resolución de las muestras discrepantes iniciales para ambos ensayos de genotipado en comparación con el método de referencia (tabla 15.)

Tabla 15. Comparación del ensayo *digene* HPV Genotyping RH (A) y del ensayo *digene* HPV Genotyping LQ con el sistema Free University RLB* utilizando el procedimiento EZ1 DSP Virus para la extracción de VPH a partir de medios de transporte.

Tipo de resultado	A % de muestras clínicas	B % de muestras clínicas
Idéntico	80	58
Compatible	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 followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* 40, 779.

Rendimiento clínico (virus de la gripe A)

Para demostrar el rendimiento clínico, se evaluaron 102 muestras de exudado nasofaríngeo caracterizadas recogidas en UTM (Copan Diagnostics Inc., n.º ref. 330C) utilizando el kit EZ1 DSP Virus para la extracción de ácidos nucleicos. El ARN del virus de la gripe A se detectó utilizando el kit *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR y el ensayo Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR con la aprobación EUA (Emergency Use Authorization) (tabla 16).

Tabla 16. Comparación del kit *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR frente al ensayo Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR con la aprobación EUA (Emergency Use Authorization) utilizando el kit EZ1 DSP Virus para la extracción del virus de la gripe estacional A y el virus de la gripe H1N1 de 2009 a partir de exudados nasofaríngeos.

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

Torundas desecadas

Rango lineal

Se evaluó el rango lineal para el kit EZ1 DSP Virus extrayendo VHS-1 y *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) de torundas de algodón Puritan (ref. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC). Las pruebas se realizaron con diluciones de material estándar cuantificado. Se añadió el material patogénico a saliva humana negativa y se transfirió ésta a la torunda. Tras la deshidratación, se aislaron de nuevo los patógenos de la torunda desecada mediante resuspensión en 600 µl de tampón ATL*. Se analizaron series de diluciones con seis títulos diferentes de virus con 5 ó 6 réplicas cada una. Se ha determinado el rango lineal del kit EZ1 DSP Virus en comparación con un método de referencia con los ensayos *artus*[®] HSV1/2 TM PCR y *artus*[®] *C. trachomatis* TM PCR (figura 9). Se purificaron los ácidos nucleicos virales a partir de muestras de 400 µl y se eluyeron en 150 µl de tampón de elución (AVE).

*QIAGEN GmbH, n.º ref. 939016

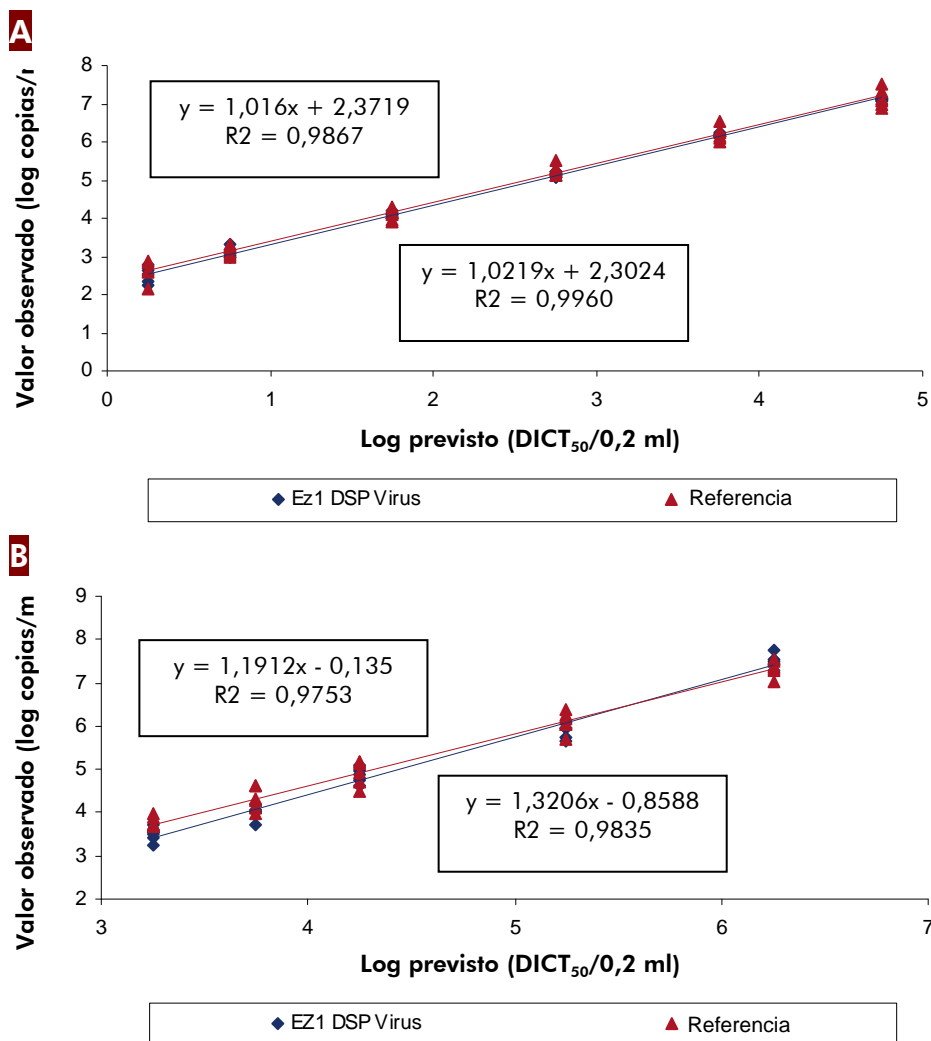


Figura 9. Rango lineal de obtención con el protocolo EZ1 DSP Virus en combinación con los ensayos *artus*[®] *C. trachomatis* PCR (A) y *artus*[®] HSV1/2 TM TM PCR (B) para la extracción de VHS-1 y *C. trachomatis* a partir de torundas de algodón desecadas. El estudio se realizó en comparación con un método de referencia.

Precisión

Se determinaron las desviaciones típicas y los coeficientes de variación (CV) en torundas desecadas para el VHS-1 y *C. trachomatis* con los ensayos *artus*[®] HSV1/2 TM PCR y *artus*[®] *C. trachomatis* TM PCR. Se prepararon y pretrataron torundas floqueadas Copan (n.º ref. 502CS0, Copan Italia S.p.A.) y torundas de algodón Puritan (ref. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC) desecadas según se ha descrito previamente y se purificó el ADN viral y bacteriano a partir de un volumen de muestra de 400 µl y se eluyó en 60 µl de tampón de elución (AVE). La extracción se realizó con tres donantes de saliva con 8 ó 9 réplicas cada uno, en seis series analíticas de EZ1, en

tres días y con tres combinaciones de lotes de kit EZ1 DSP Virus/tampón ATL. Todas las muestras se analizaron en la misma serie de PCR. La precisión intermedia para *C. trachomatis* (tabla 17) y para el VHS-1 (tabla 18) se calculó teniendo en cuenta todas las réplicas de cada donante y cada tipo de torunda (diferentes series analíticas de EZ1, días y lotes).

Tabla 17. Precisión del protocolo EZ1 DSP Virus en combinación con el kit artus® C. trachomatis RG PCR para la extracción de C. trachomatis a partir de torundas desecadas.

Tipo de torunda	Donante	n	Valor nominal del log TCID ₅₀ /0,2 ml	Valor observado de copias/ml	Precisión intermedia: CV copias/ml (%)	Valor observado de log copias/ml	DT (log copias/ml)
Torundas de algodón 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
Torundas floqueadas 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

Tabla 18. Precisión del protocolo EZ1 DSP Virus en combinación con el kit artus® HSV1/2 RG PCR para la extracción de VHS-1 a partir de torundas desecadas.

Tipo de torunda	Donante	n	Valor nominal del log TCID ₅₀ /0,2 ml	Valor observado de copias/ml	Precisión intermedia: CV copias/ml (%)	Valor observado de log copias/ml	DT (log copias/ml)
Torundas de algodón 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
Torundas floqueadas 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

Muestras respiratorias (esputo)

Estudio de correlación

Se realizó un estudio de correlación para el kit EZ1 DSP Virus para la extracción de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de esputos humanos negativos. Se analizó una serie de diluciones con cuatro títulos diferentes de virus con réplicas únicas en comparación con un método de referencia. Se purificó ADN bacteriano a partir de 200 μ l de esputo, pretratado con Sputasol (Oxoid Limited, ref. SR0233) y lisozima (Sigma-Aldrich, n.º ref. L6876) según se describe en la versión 4 del Manual para el kit EZ1 DSP Virus, y se eluyó en 90 μ l de tampón de elución (AVE). El análisis se realizó con el ensayo *artus*® M. tuberculosis RG PCR (figura 10).

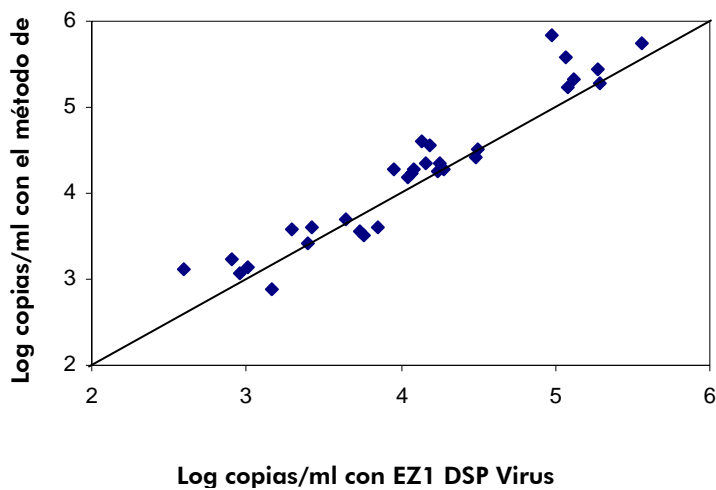


Figura 10. Correlación del procedimiento EZ1 DSP Virus con un método de referencia.

Para obtener información actualizada sobre licencias y sobre exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de usuario o el manual de uso del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Marcas comerciales: 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® (Cytoc Corp.); Surepath® (Becton, Dickinson and Company)

Febrero-11 © 2011 QIAGEN, todos los derechos 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