

EZ1[®] DSP Virus Kit

Performanța sistemului EZ1 DSP Virus Kit a fost stabilită în cadrul studiilor de evaluare a performanței, utilizând plasmă, ser, LCR, urină, sânge integral, materii fecale, mediu de transport, tampoane uscate și probe respiratorii, pentru izolarea acizilor nucleici virali și a ADN-ului bacterian. Testarea a fost realizată în conformitate cu protocoalele descrise în Versiunea 4 curentă a Ghidului pentru EZ1 DSP Virus.

Cu toate acestea, performanța kitului nu este garantată pentru fiecare specie de virus sau bacterie, și trebuie validată de utilizator. Validarea performanței sistemului pentru orice proceduri utilizate în laborator care nu fac obiectul studiilor de evaluare a performanței efectuate de QIAGEN constituie răspunderea utilizatorului.

Caracteristici de performanță

Ser și plasmă

Interval liniar

Intervalul liniar pentru EZ1 DSP Virus Kit a fost evaluat pentru virusurile HCV și HIV-1 din ARN și pentru virusul din HBV din ADN. Testările au fost efectuate cu diluții ale panelurilor de virusuri cuantificate, realizate în plasma umană sau serul negativ(ă) la HBV, HCV și HIV-1. Au fost testate serii de diluții cu șase titruri virale diferite, cu câte 12 replicare fiecare. Intervalul liniar al procedurii EZ1 DSP Virus Kit a fost determinat pentru HBV, HCV și HIV-1 cu testele pentru încărcare virală RealTime Abbott (Tabel 1, Figura 1). Substanțele de control interne RealTime (câte 17 μl fiecare) au fost adăugate direct în fiecare probă pentru HIV-1 sau HCV înainte de extracție. Pentru RealTime HBV, 3,4 μl de substanță de control internă HBV RealTime au fost combinați cu ARN de transport pentru fiecare probă. Acizii nucleici virali au fost extrași din probe de 400 μl și eluați în 90 μl de soluție tampon pentru eluție (Buffer AVE). PCR a fost efectuat pe Abbott *m2000rt*.

Tabel 1. Sursa probei și testele din aval folosite pentru determinarea intervalului liniar al rezultatelor, cu protocolul EZ1 DSP Virus

| Virus | Sursă | Test din aval | Manual de test utilizat |
|-------|--|---|-------------------------|
| HIV-1 | BBI (Boston Biomedica, Inc., Boston, USA) plasmă cu defect HIV, BBI recalciată | Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular Inc.) | Abbott RealTime HIV-1 |
| HCV | ProMedDx (ProMedDx LLC Norton, MA, USA) probă de la pacient, ser uman normal comasat | Abbott RealTime HCV (Abbott Molecular Inc.) | Abbott RealTime HCV |
| HBV | Teragenix (Teragenix Coporate, Ft. Lauderdale, FL, USA) probă de la pacient, plasmă umană recalciată | Abbott RealTime HBV (Abbott Molecular Inc.) | Abbott RealTime HBV |



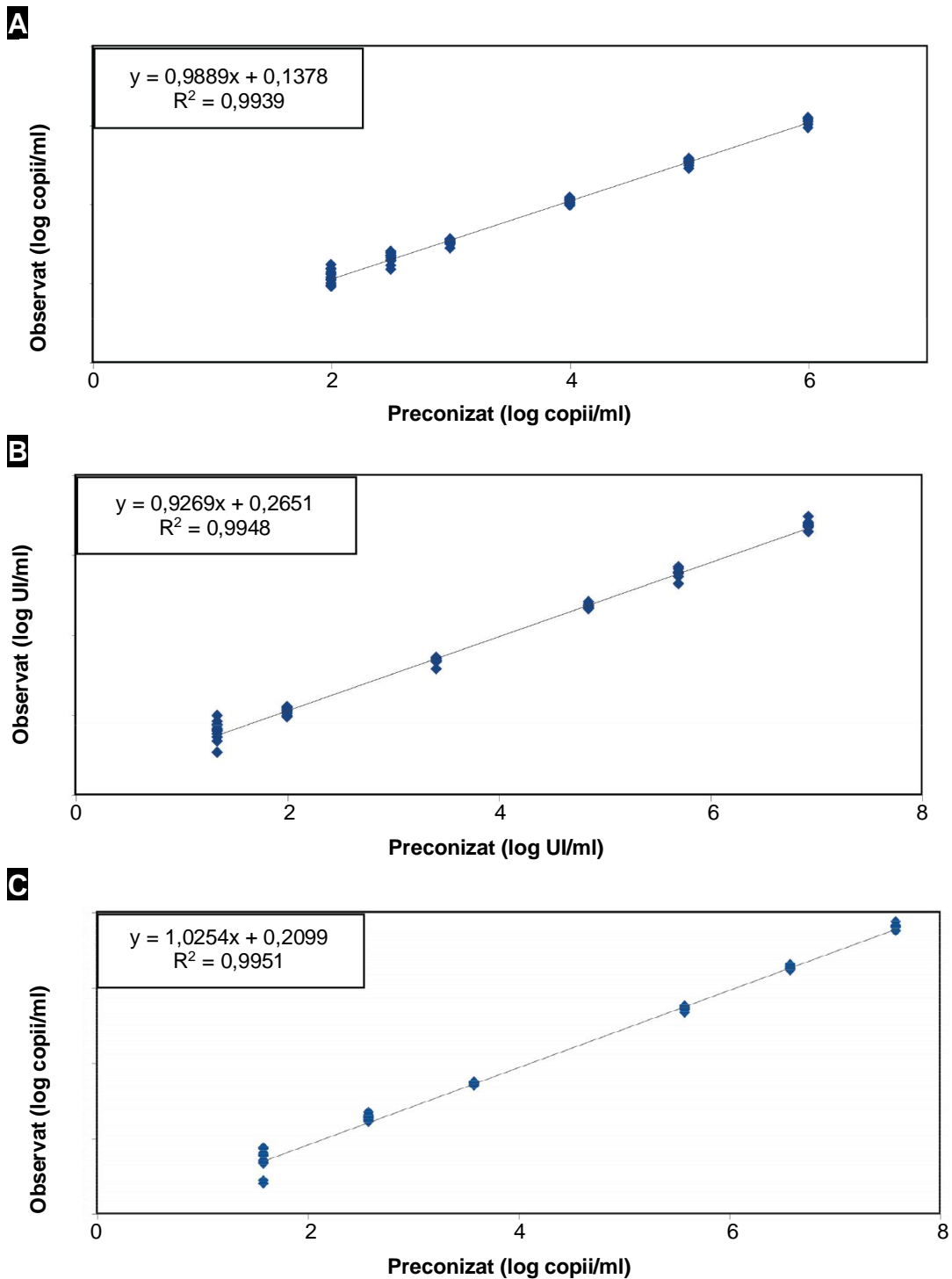


Figura 1. Intervalul liniar al rezultatelor, utilizând protocolul EZ1 DSP Virus. Intervalul liniar al protocolului EZ1 DSP Virus a fost determinat folosind serii de diluții virale și testele Abbott RealTime (Tabel 1) **A** pentru HIV-1, **B** pentru HCV și **C** pentru HBV.

Precizie

Abaterile standard și coeficienții de variație (CV) au fost determinate pentru serii de diluții HIV-1, HCV și HBV în intervalul liniar al testelor din aval corespunzătoare. Pentru analiza preciziei au fost utilizate aceleași teste din aval ca și cele pentru determinarea intervalului liniar (Tabel 1). Datele referitoare la precizia inter-teste sunt prezentate în Tabelele 2-4. Pentru fiecare membru al panelului au fost extrase câte 12 replicare, în 12 execuții separate pe BioRobot EZ1 DSP. PCR a fost efectuat în 2 execuții de câte 6 replicare pe Abbott *m2000rt*.

Tabel 2. Precizia inter-teste a protocolului EZ1 DSP Virus folosind testul Abbott RealTime HIV-1

| Membru al panelului | n | Copii/ml | CV (%) | Log copii/ml | SD (log copii/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 |

Tabel 3. Precizia inter-teste a protocolului EZ1 DSP Virus folosind testul Abbott RealTime HCV

| Membru al panelului | 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 |

Tabel 4. Precizia inter-teste a protocolului EZ1 DSP Virus folosind testul Abbott RealTime HBV

| Membru al panelului | n | Copii/ml | CV (%) | Log copii/ml | SD (log copii/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 |

Limita de detecție

Limita de detecție a fost determinată prin intermediul valorii probit de 95% pentru sistemul EZ1 DSP Virus, folosind standardul internațional OMS 97/656 pentru virus HIV-1, standardul internațional OMS 97/746 pentru virus HBV și supernatant din cultură de celule CMV cuantificat. Limita de detecție a fost determinată prin procesarea seriilor de diluții ale virusurilor corespunzătoare. Virusurile au fost diluate în probe de plasmă EDTA umană normală, negative la HIV, HBV și CMV. Fiecare etapă de diluare a fost pregătită în minim 3 execuții independente, cu minimum 6 replicare pe diluție. 400 µl de plasmă au fost folosiți pentru prepararea probelor pe BioRobot EZ1 DSP cu eluție în 60 µl.

artus® HBV PCR Kits au fost folosite pentru detectarea ADN-ului HBV, iar artus® CMV PCR Kits pentru detectarea ADN-ului CMV. Probele au fost analizate pe un instrument LightCycler® 1.2 (Roche), un Rotor-Gene® 3000 (Corbett Research) și un ABI PRISM® 7000 SDS (Applied Biosystems). COBAS® Amplicor® HIV-1Monitor® Test (versiunea 1.5) a fost folosită pentru detectarea ARN-ului HIV utilizând COBAS Amplicor Analyzer. Datele combinate pentru toate probele au fost evaluate folosind analiza de tip probit. Datele sunt prezentate în Tabelele 5-6, cu diagramele de tip probit reprezentative din Figurile 2-3.

Tabel 5. Limita de detecție a ADN-ului HBV și CMV folosind sistemul EZ1 DSP Virus și *artus*® PCR Kits

| Virus | Titru de intrare | Reușite (LightCycler) | Reușite (Rotor-Gene) | Reușite (ABI PRISM) |
|-------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| HBV | Valoare probit 95% (UI/ml) | 45,7 | 14,4 | 13,2 |
| | Interval de încredere (UI/ml) | 28-102 | 9,5-26,5 | 9,0-23,1 |
| CMV | Valoare probit 95% (copii/ml) | 67,2 | 21,8 | 38,3 |
| | Interval de încredere (copii/ml) | 41,8-142 | 14,5-44,1 | 21,5-89,8 |

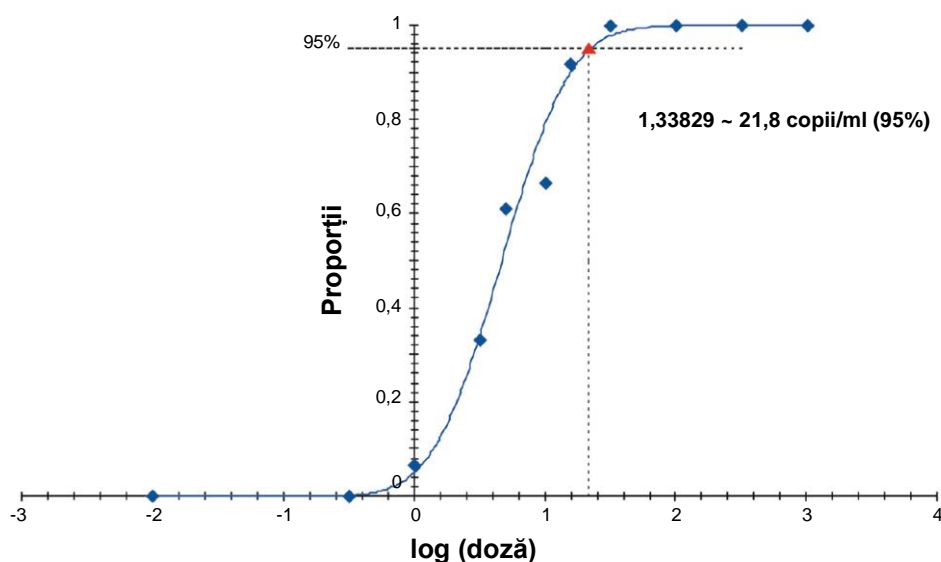


Figura 2. Analiză de tip probit pentru detectarea ADN-ului CMV folosind sistemul EZ1 DSP Virus și *artus*® CMV RG PCR Kit. Acizii nucleici virali au fost purificați folosind sistemul EZ1 DSP Virus, iar *artus*® CMV PCR RG Kit a fost folosit pentru detectarea ADN-ului CMV pe Rotor-Gene 3000. Valoarea probit 95% a fost de 21,8 copii/ml.

Tabel 6. Limita de detecție a ARN-ului HIV folosind sistemul EZ1 DSP Virus și COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Test, versiunea 1.5

| Titru de intrare (UI/ml) | Reușite |
|-------------------------------|------------|
| Valoare probit 95% (UI/ml) | 114,5 |
| Interval de încredere (UI/ml) | 82,9-194,3 |

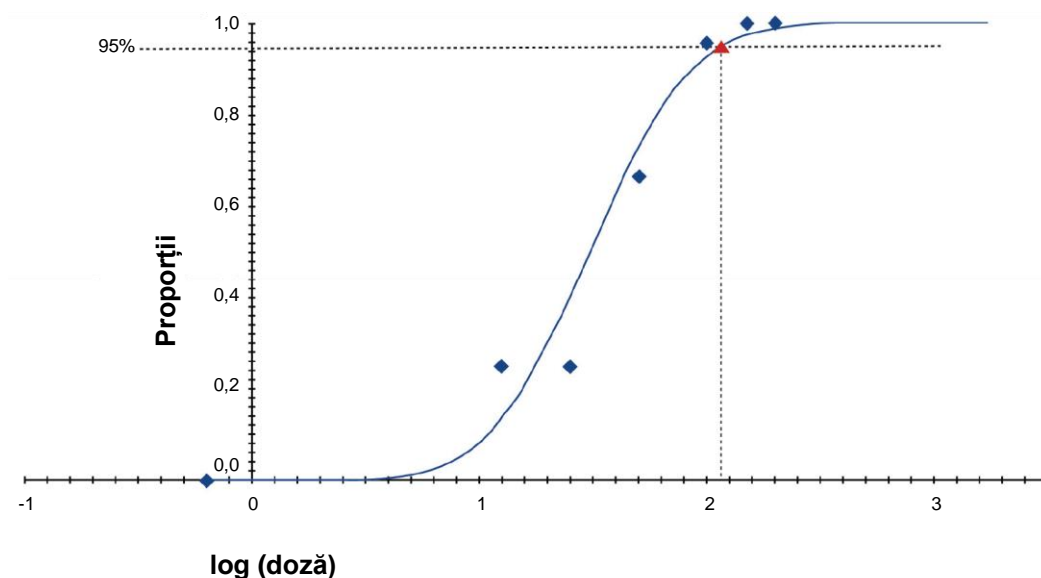


Figura 3. Analiză de tip probit pentru detectarea ARN-ului HIV folosind sistemul EZ1 DSP Virus și COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Test, versiunea 1.5. Acizii nucleici virali au fost purificați folosind sistemul EZ1 DSP Virus, cu introducerea a 400 μl de probă și eluție în 60 μl. COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Test a fost folosit pentru detectarea ARN-ului HIV pe COBAS Amplicor Analyzer în modul ultrasensibil. Valoarea probit 95% a fost de 114,5 UI/ml.

Excluderea transferului de probă

Au fost efectuate câte nouă execuții pe instrumentele BioRobot EZ1 DSP, EZ1 Advanced și EZ1 Advanced XL pentru a evalua riscul evenimentelor de contaminare încrucișată în timpul și între procedurile EZ1 DSP Virus. Testările au fost efectuate folosind o probă cuantificată de la pacient de parvovirus B19. Încărcarea virală a probelor pozitive folosite pentru testările de transfer a fost de $1,0 \times 10^8$ UI/ml. Pentru diluarea probelor pozitive și, ca probe de substanță de control negative, a fost folosită o probă de plasmă EDTA negativă la parvovirusul B19 uman.

Pentru detectarea transferului de la o probă la alta au fost efectuate câte 2 execuții pe fiecare instrument, cu o configurație de tip tablă de șah, alternând între probele negative și cele puternic pozitive. Fiecare a treia execuție a fost efectuată folosind toate probele negative pentru monitorizarea posibilului transfer de la o rulare la alta (run-to-run). Această configurație a probei a fost repetată de trei ori, rezultând un număr total de nouă execuții pentru fiecare instrument. ADN-

ul parvovirus B19 a fost detectat și cuantificat folosind artus® Parvo B19 RG PCR Kit cu marcaj CE-IVD pe Rotor-Gene 3000. Limita de detecție analitică a artus® Parvo B19 RG PCR Kit s-a determinat a fi 0,2 UI/μl în eluat (p = 0,05). Aceasta indică faptul că există o probabilitate de 95% să fie detectate 0,2 UI/μl în eluat.

Toate probele puternic pozitive au fost detectate pozitive folosind artus® Parvo B19 RG PCR Kit. Toate probele negative din execuțiile cu tipar tablă de șah și din execuțiile complet negative nu au oferit niciun fel de reacție (Tabel 7 indică rezultatele pe BioRobot EZ1 DSP). Aceste experimente demonstrează că protocolul EZ1 DSP Virus nu oferă niciun transfer al probei în aceste condiții.

Tabel 7. Configurația testării de contaminare încrucișată și valorile C_T pentru detectarea ADN-ului parvovirus B19 folosind BioRobot EZ1 DSP

| Execuție | Poziție | | | | | |
|----------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 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 |

Valoarea C_T medie a tuturor probelor = 15,40 ± 0,18 (CV = 1,14%)

X: Fără reacție după 45 de cicluri PCR.

Stabilitate

S-a determinat stabilitatea ARN-ului și ADN-ului viral în eluatele generate folosind EZ1 DSP Virus Kit. Plasma EDTA umană a fost îmbogățită cu 1x10³ UI/ml de material standard HCV AcroMetrix OptiQuant® ARN HCV și VQC Parvo B19. Pentru fiecare moment al testării și condiție de incubare s-au procesat câte 18 replicare folosind sistemul EZ1 DSP Virus. Eluatele cu conținut de ADN Parvo B19 și ARN HCV au fost incubate timp de până la 6 ore la 30 °C, până la 14 zile la 4 °C, până la 12 săptămâni la -20 °C și până la 9 luni la -80 °C. Studiul este încă în desfășurare. Eluatele au fost analizate folosind o RT-PCR HCV internă validată și artus® Parvo B19 RG PCR.

S-a observat o respingere RT-PCR din 18 replicare pentru ARN-ul HCV după depozitare la 4 °C timp de 14 zile (Figura 4).

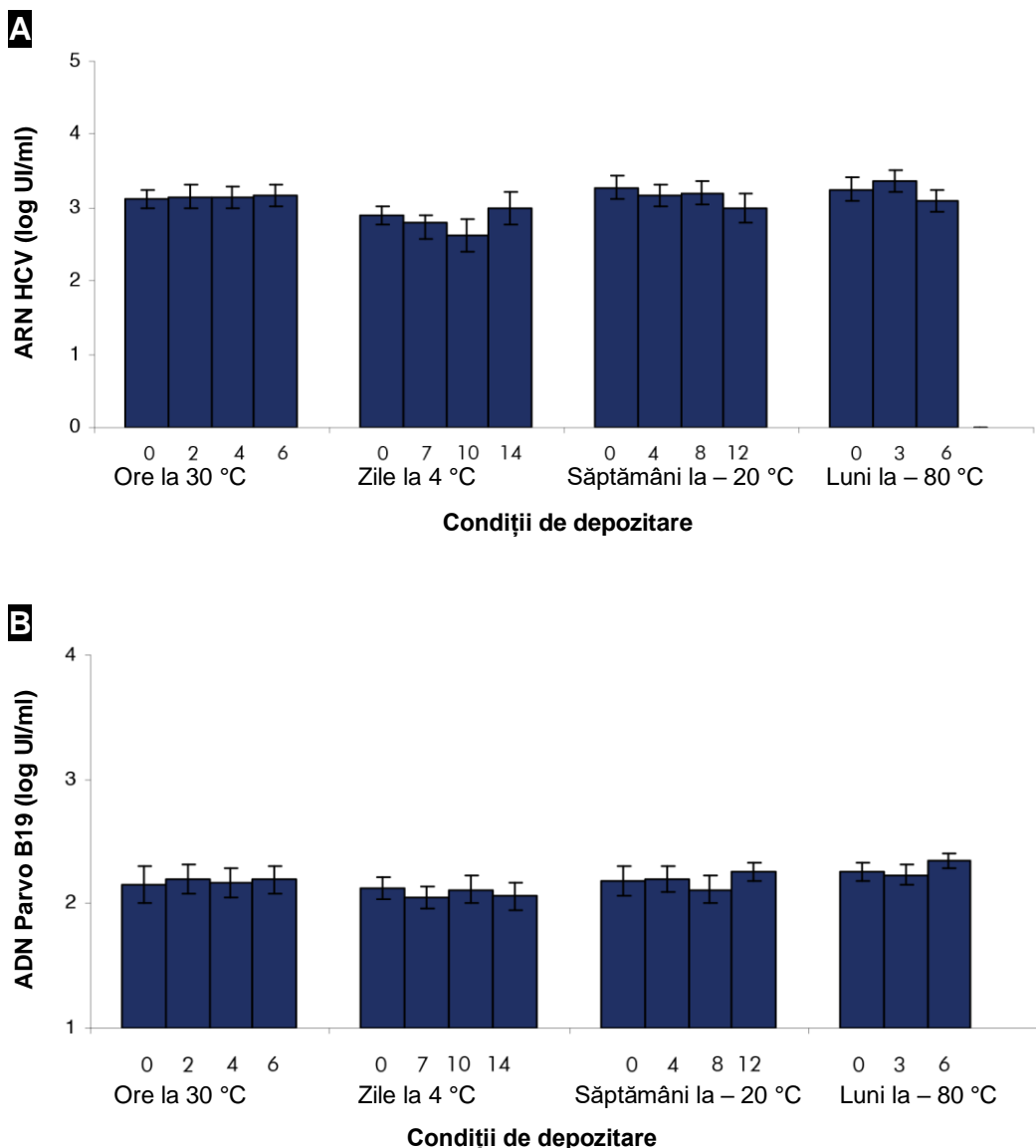


Figura 4. Stabilitatea acizilor nucleici virali. S-a determinat stabilitatea ARN-ului și ADN-ului viral în eluatele generate folosind EZ1 DSP Virus Kit pentru **A ARN-ul HCV și **B** ADN-ul Parvo B19.**

Reproductibilitate

Reproductibilitatea a fost determinată folosind 3 instrumente BioRobot EZ1 DSP care au rulat în 3 zile diferite (consultați Tabel 8, pagina următoare). Pentru fiecare testare (A-G) au fost procesate 12 replicare în 2 execuții pe BioRobot EZ1 DSP. Plasma EDTA umană a fost îmbogățită cu 1×10^4 UI/ml AcroMetrix OptiQuant ARN HCV și 1×10^3 UI/ml AcroMetrix OptiQuant ADN HBV. ADN-ul HBV a fost determinat folosind *artus*[®] HBV RG PCR Kit, iar ARN-ul HCV folosind un test RT-PCR HCV intern validat.

Procedura automată are un grad de reproductibilitate ridicat, așa cum a fost demonstrat de rezultate comparabile din purificarea acizilor nucleici virali pe 3 instrumente BioRobot EZ1 DSP diferite, în 3 zile diferite (Figura 5).

Tabel 8. Configurația testării pentru reproductibilitate

| Configurația testării | Ziua 1 | Ziua 2 | Ziua 3 |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|
| BioRobot EZ1 DSP I | Testare A | Testare D | Testare F |
| BioRobot EZ1 DSP II | Testare B | Testare E | |
| BioRobot EZ1 DSP III | Testare C | | Testare G |

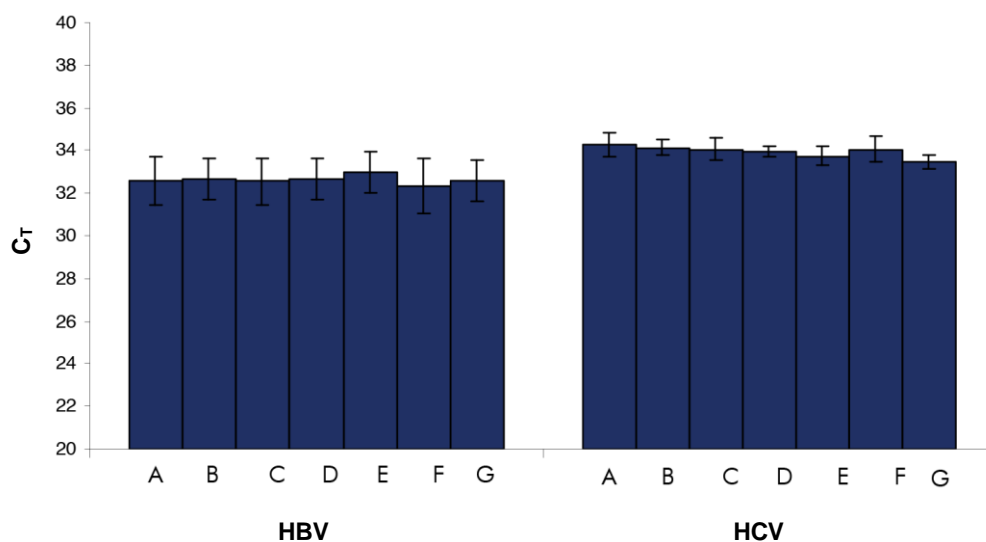


Figura 5. Reproducibilitate. Reproducibilitatea a fost determinată pe trei instrumente BioRobot EZ1 DSP diferite, în trei zile diferite.

Urină

Performanța EZ1 DSP Virus Kit pentru utilizarea cu probe de urină a fost evaluată prin comparare cu plasma, folosind panouri de virusuri cuantificate pentru CMV (virus ADN) și HCV (virus ARN), diluată în materialul de probă respectiv. Probele de urină și plasmă au fost tratate în conformitate cu Manualul EZ1 DSP Virus Kit, iar volumele de probă echivalente au fost extrase cu EZ1 DSP Virus Kit. Acizii nucleici virali au fost detectați folosind *artus*[®] CMV RG PCR și *artus*[®] HCV RG RT-PCR Kit. Evaluarea performanței EZ1 DSP Virus Kit prin compararea urinei și plasmei a demonstrat o discrepanță de numai ~2% (pe baza valorilor C_T) pentru CMV și HCV (Tabel 9).

Tabel 9. Compararea procedurii EZ1 DSP Virus pentru utilizare cu probele de urină și plasmă

| Tip specimen | n | Valoare CT | Raport urină/plasmă (valoare CT) | Copii/ml | Raport urină/plasmă (copii/ml) |
|--------------|---|------------|----------------------------------|----------|--------------------------------|
| CMV | | | | | |
| Urină | 4 | 31,60 | 0,98 | 6.250 | 1,51 |
| Plasmă | 5 | 32,17 | | 4.130 | |
| HCV | | | | | |
| Urină | 4 | 37,83 | 1,02 | 278 | 0,77 |
| Plasmă | 5 | 37,25 | | 363 | |

Sânge integral

Interval liniar

A fost evaluat intervalul liniar pentru EZ1 DSP Virus Kit, utilizând EBV ca virus ADN. Testările au fost efectuate cu diluții ale panelurilor de virusuri cuantificate, realizate în sânge integral uman negativ la EBV. Au fost testate serii de diluții cu șase titruri virale diferite, cu câte 4 replicare fiecare. Acizii nucleici virali au fost extrași din 200 μl de sânge integral (amestecați cu 200 μl Buffer ATL*) și eluați în 60 μl de soluție tampon pentru eluție (Buffer AVE). Intervalul liniar al procedurii EZ1 DSP Virus Kit a fost determinat pentru EBV cu *artus*[®] EBV RG PCR pe instrumentul Rotor-Gene Q (Figura 6).

*QIAGEN GmbH, nr. cat. 939016

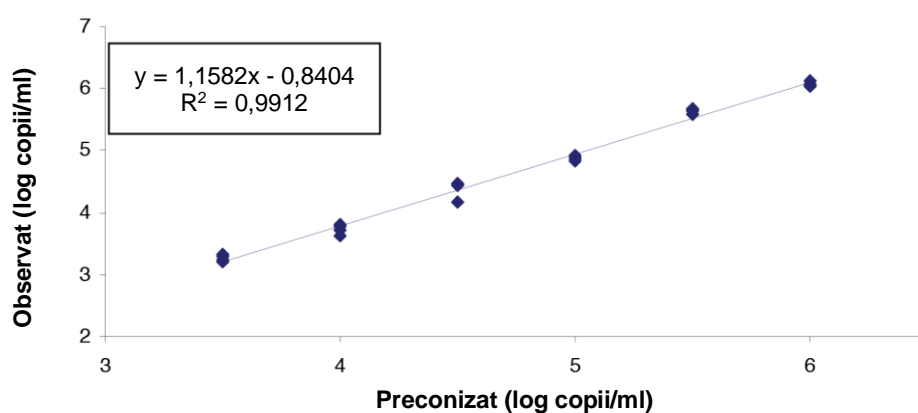


Figura 6. Intervalul liniar al rezultatelor folosind protocolul EZ1 DSP Virus în asociere cu testul *artus*[®] EBV RG PCR pentru extracția EBV din sânge integral.

Precizie

Abaterile standard și coeficienții de variație (CV) pentru sânge integral au fost determinate pentru CMV folosind *artus*[®] CMV RG PCR Kit pe instrumentul Rotor-Gene Q. Datele referitoare la precizia inter-teste sunt prezentate în Tabel 10. Sângele integral provenit de la 13 donatori de sânge a fost testat în 5 replicare, în execuții separate pe EZ1 Advanced XL. Acizii nucleici virali au fost extrași din 200 μl de sânge integral (amestecați cu 200 μl Buffer ATL*) și eluați în 120 μl de soluție tampon pentru eluție (Buffer AVE).

*QIAGEN GmbH, nr. cat. 939016

Tabel 10. Precizia inter-teste a protocolului EZ1 DSP Virus în asociere cu *artus*[®] CMV RG PCR Kit pentru extracția CMV din sânge integral

| Donator | n | Copii/ml | CV (%) | log copii/ml | SD (log copii/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 |

Materii fecale

Interval liniar

A fost evaluat intervalul liniar pentru EZ1 DSP Virus Kit, Adenovirus 5 ca virus ADN. Testările au fost efectuate cu diluții 10x în serie ale supernatantului din cultură de celule în materii fecale negative la Adenovirus. Au fost testate serii de diluții cu cinci diluții virale diferite, cu câte 10 replicare fiecare. Acizii nucleici virali au fost extrași din probe de 200 μl (1:10 resuspendate în Buffer ASL*) și eluați în 120 μl de soluție tampon pentru eluție (Buffer AVE). Intervalul liniar al procedurii EZ1 DSP Virus a fost determinat în asocieră cu testul Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, Franța, ref. 96-010B) pe instrumentul Rotor-Gene Q în comparație cu o metodă de extracție de referință (Figura 7).

*QIAGEN GmbH, nr. cat. 19082

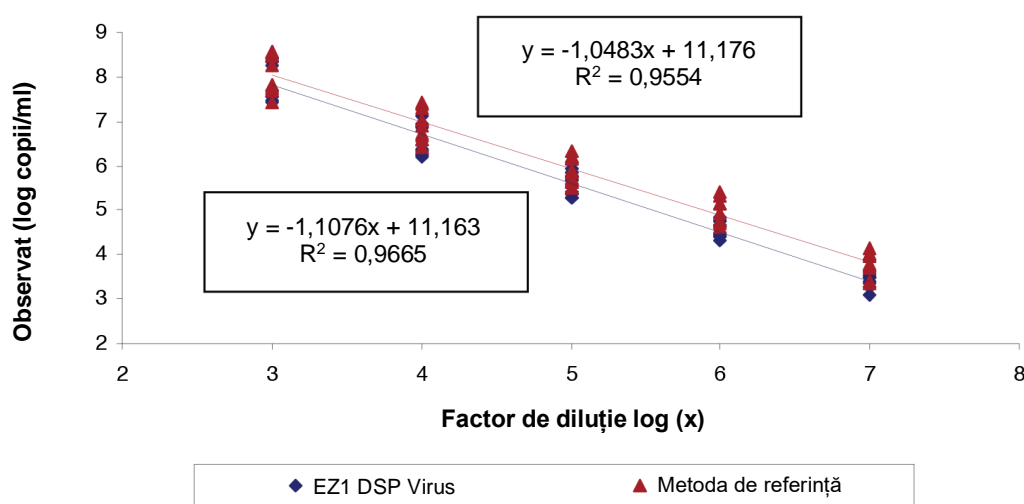


Figura 7. Intervalul liniar al rezultatelor folosind protocolul EZ1 DSP Virus în asocieră cu testul Adenovirus R-Gene™ PCR pentru extracția Adenovirus 5 din materii fecale.

Precizie

Abaterile standard și coeficienții de variație (CV) pentru materii fecale au fost determinate pentru Adenovirus 5 folosind testul Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, Franța, ref. 96-010B) pe instrumentul Rotor-Gene Q. Materiile fecale negative la Adenovirus au fost îmbogățite cu supernatant din cultură de celule de Adenovirus 5, iar ADN-ul viral a fost extras din probe de 200 μl (resuspensie 1:10 în Buffer ASL*) și eluat în 120 μl de soluție tampon pentru eluție (AVE). Șapte execuții EZ1 cu câte 9 sau 10 replicare au fost efectuate în trei zile, cu trei instrumente EZ1 Advanced XL și trei combinații de lot EZ1 DSP Virus Kit/Buffer ASL. Toate probele au fost analizate în cadrul aceleiași execuții PCR. Datele referitoare la precizie (Tabel 11) au fost calculate luând în considerare rezultatele obținute cu instrumente diferite, în zile și loturi diferite, și obținute de la toate execuțiile EZ1 (în total).

*QIAGEN GmbH, nr. cat. 19082

Tabel 11. Precizia protocolului EZ1 DSP Virus în asociere cu testul Adenovirus R-Gene™ PCR pentru extracția Adenovirus 5 din materii fecale

| Execuție | n | Cop/ml | Log cop/ml | SD (log cop/ml) | Intra-test | CV c/ml (%) | | | |
|----------|----|--------|------------|-----------------|------------|---------------|--------|----------|-------|
| | | | | | | 3 EZ1 Adv. XL | 3 zile | 3 loturi | Total |
| 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 | – | – | – | – |

Studiul de corelare

Pentru procedura EZ1 DSP Virus a fost realizat un studiu de corelare în comparație cu o metodă de referință pentru extracția Norovirus Genogroup II din 66 de probe de materii fecale de la pacienți. Acizii nucleici virali au fost extrași din probe de 200 µl (1:10 resuspendate în Buffer ASL*) și eluați în 120 µl de soluție tampon pentru eluție (Buffer AVE). Analiza a fost realizată cu un test RT PCR intern pentru Norovirus Genogroup II (Tabel 12).

*QIAGEN GmbH, nr. cat. 19082

Tabel 12. Corelarea procedurii EZ1 DSP Virus cu o metodă de referință

| EZ1 DSP Virus | | Referință | | |
|---------------|----------------|-----------|---------|-------|
| | | Pozitiv | Negativ | Total |
| | Pozitiv | 34 | 15 | 49 |
| | Negativ | 1 | 16 | 17 |
| | Total | 35 | 31 | 66 |

Mediu de transport

Interval liniar

Intervalul liniar pentru EZ1 DSP Virus Kit a fost evaluat prin extracția HSV-1 și *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) din mediul de PreservCyt® (Cytoc Corporation, ref. 0200011). Testările au fost efectuate cu diluții ale panelurilor de virusuri cuantificate, realizate în mediu de transport. Au fost testate serii de diluții cu șase titruri virale diferite, pe câte 5 sau 6 replicare fiecare. Intervalul liniar al EZ1 DSP Virus Kit a fost determinat în comparație cu o metodă de referință cu testul *artus*® HSV1/2 TM PCR și *artus*® C. trachomatis TM PCR (Figura 8). Acizii nucleici virali au fost extrași din probe de 200 μl și eluați în 90 μl de soluție tampon pentru eluție (Buffer AVE).

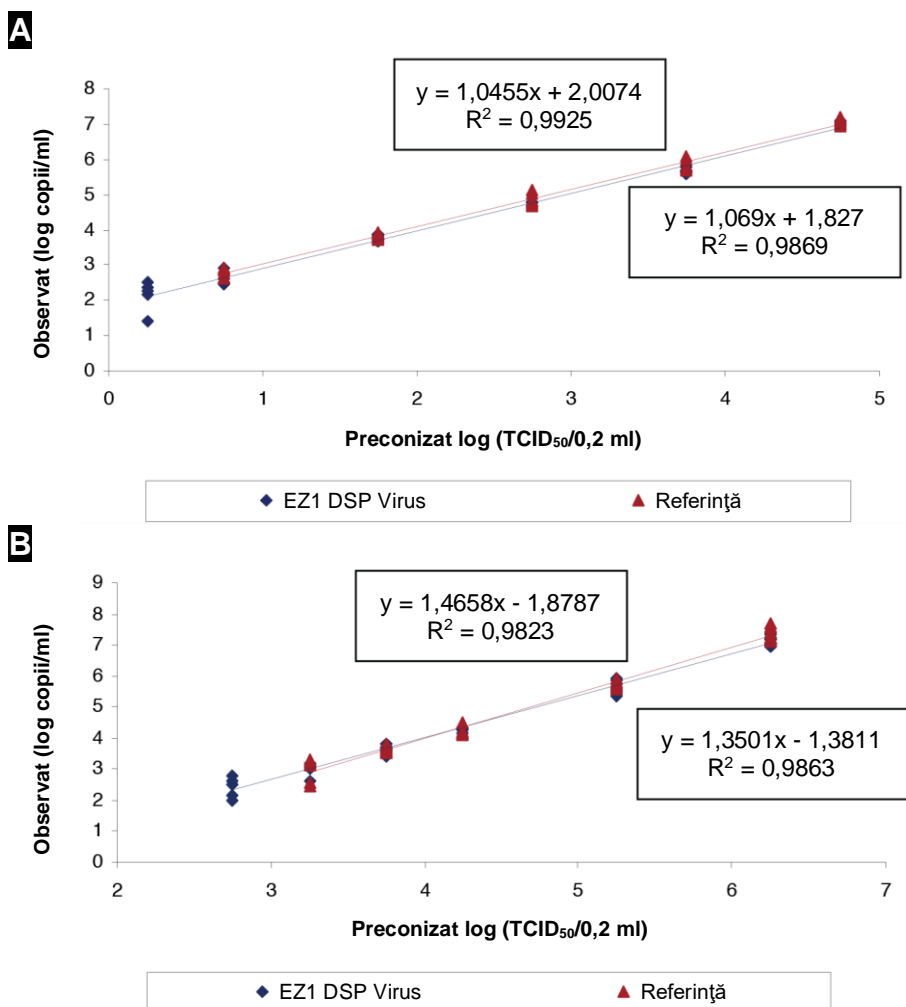


Figura 8. Intervalul liniar al rezultatelor folosind protocolul EZ1 DSP Virus în asociere cu testul *artus*® C. trachomatis PCR (A) și *artus*® HSV1/2 TM PCR (B) pentru extracția HSV-1 și C. trachomatis din mediu de transport. Studiul a fost făcut în comparație cu o metodă de referință.

Precizie

Abaterile standard și coeficienții de variație (CV) pentru mediile de transport au fost determinate pentru HSV-1 și *C. trachomatis* folosind testul *artus*[®] HSV1/2 TM PCR și *artus*[®] *C. trachomatis* TM PCR. ADN-ul viral și bacterian au fost extrași din 400 μl de mediu și eluați în 60 μl de soluție tampon pentru eluție (Buffer AVE). Cinci medii de transport au fost extrase în câte 12 replicare, în șase execuții EZ1, în trei zile și cu trei loturi de EZ1 DSP Virus Kit. Toate probele au fost analizate în cadrul aceleiași execuții PCR. Precizia intermediară pentru *C. trachomatis* (Tabel 13) și HSV-1 (Tabel 14) a fost calculată luând în considerare toate replicatele fiecăruia dintre mediile de transport (execuții EZ1 diferite, zile și loturi diferite).

Tabel 13. Precizia protocolului EZ1 DSP Virus în asociere cu *artus*[®] *C. trachomatis* RG PCR Kit pentru extracția *C. trachomatis* din medii de transport

| Mediu | n | Nominal log TCID ₅₀ / 0,2 ml | Observat cop/ml | Precizie intermediară | | SD (log cop/ml) |
|---------------------------------------|----|---|--------------------|--------------------------|------------------------|--------------------|
| | | | | CV cop/ml (%) | Observat log cop/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, nr. 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., nr. cat. 330C

Tabel 14. Precizia protocolului EZ1 DSP Virus în asociere cu *artus*[®] HSV1/2 RG PCR Kit pentru extracția HSV-1 din medii de transport

| Mediu | n | Nominal log TCID ₅₀ / 0,2 ml | Observat cop/ml | Precizie intermediară | | SD (log cop/ml) |
|---------------------------------------|----|---|--------------------|--------------------------|------------------------|--------------------|
| | | | | CV cop/ml (%) | Observat log cop/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, nr. 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., nr. cat. 330C

Performanță clinică (HPV)

Părți alicote de ADN purificat dintr-un total de 108 probe, cuprinzând 50 de probe pozitive la HC2 recoltate în STM, 50 de probe pozitive la HC2 recoltate în PreservCyt® și 8 probe negative la HC2 în STM au fost testate cu *digene*® HPV Genotyping RH Test (nr. cat. 613413) și *digene*® HPV Genotyping LQ Test (nr. cat. 613215) în comparație cu sistemul Free University RLB*.

Rezultatele au fost desemnate ca identice (genotipuri cu potrivire 100%), compatibile (cel puțin un genotip în comun) sau discordante (fără potrivire de genotipuri). Discrepanțele (rezultatele de genotipare discordante) au fost rezolvate prin repetarea ambelor teste și, în cazul discrepanțelor rămase, printr-o analiză ulterioară cu un al treilea test sensibil de detectare și genotipare HPV [SPF10-LiPA25 (versiunea1)].

Rezultatele au indicat un nivel foarte scăzut de probe discrepante (2%) după rezolvarea probelor discrepante inițiale pentru ambele teste de genotipare, comparativ cu metoda de referință (Tabel 15).

Tabel 15. Compararea *digene* HPV Genotyping RH Test (A) și HPV Genotyping LQ Test cu sistemul Free University RLB* folosind procedura EZ1 DSP Virus pentru extracția HPV din mediu de transport

| Tip rezultat | A | B |
|--------------|-----------------------|-----------------------|
| | % din probele clinice | % din probele clinice |
| Identic | 80 | 58 |
| Compatibil | 18 | 12 |
| Discordant | 2 | 2 |

* van den Brule, A. J., Pol R., Fransen-Daalmeije, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J. și 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.

Performanță clinică (Gripă de tip A)

Pentru a demonstra performanța clinică, 102 specimene pe tampon nazofaringian caracterizate, recoltate în UTM (Copan Diagnostics Inc., nr. cat. 330C) au fost evaluate folosind EZ1 DSP Virus Kit pentru extracția acidului nucleic. ARN-ul gripei de tip A a fost detectat folosind *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR Kit și testarea Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR omologată EUA (Tabel 16).

Tabel 16. Compararea *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR Kit cu testarea Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR omologată EUA folosind EZ1 DSP Virus Kit pentru extracția virusului gripei de tip A sezoniere și a virusului gripei de tip 2009 H1N1 din tampoane nazofaringiene

| | | Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR | | | Total |
|---|---|---|---|---------|-------|
| | | Pozitiv la gripă de tip A sezonieră | Pozitiv la gripă de tip 2009 H1N1 | Negativ | |
| <i>artus</i> [®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR | Pozitiv la gripă de tip A sezonieră | 5 | 0 | 2 | 7 |
| | Pozitiv la gripă de tip 2009 H1N1 | 0 | 27 | 1 | 28 |
| | Negativ | 0 | 0 | 67 | 67 |
| | Total | 5 | 27 | 70 | 102 |

Tampoane uscate

Interval liniar

Intervalul liniar pentru EZ1 DSP Virus Kit a fost evaluat prin extracția HSV-1 și *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) din Puritan Cotton Swabs (ref. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC). Testările au fost efectuate cu diluții de material standard cuantificat. Saliva umană negativă a fost îmbogățită cu material patogen și transferată pe tampon. După deshidratare, patogenii au fost reizolați din tamponul uscat, prin resuspensie în 600 μl de Buffer ATL*. Au fost testate serii de diluții cu șase titruri virale diferite, pe câte 5 sau 6 replicare fiecare. Intervalul liniar al EZ1 DSP Virus Kit a fost determinat în comparație cu o metodă de referință cu testul *artus*[®] HSV1/2 TM PCR și *artus*[®] C. trachomatis TM PCR (Figura 9). Acizii nucleici virali au fost extrași din probe de 400 μl și eluați în 150 μl de soluție tampon pentru eluție (Buffer AVE).

*QIAGEN GmbH, nr. cat. 939016

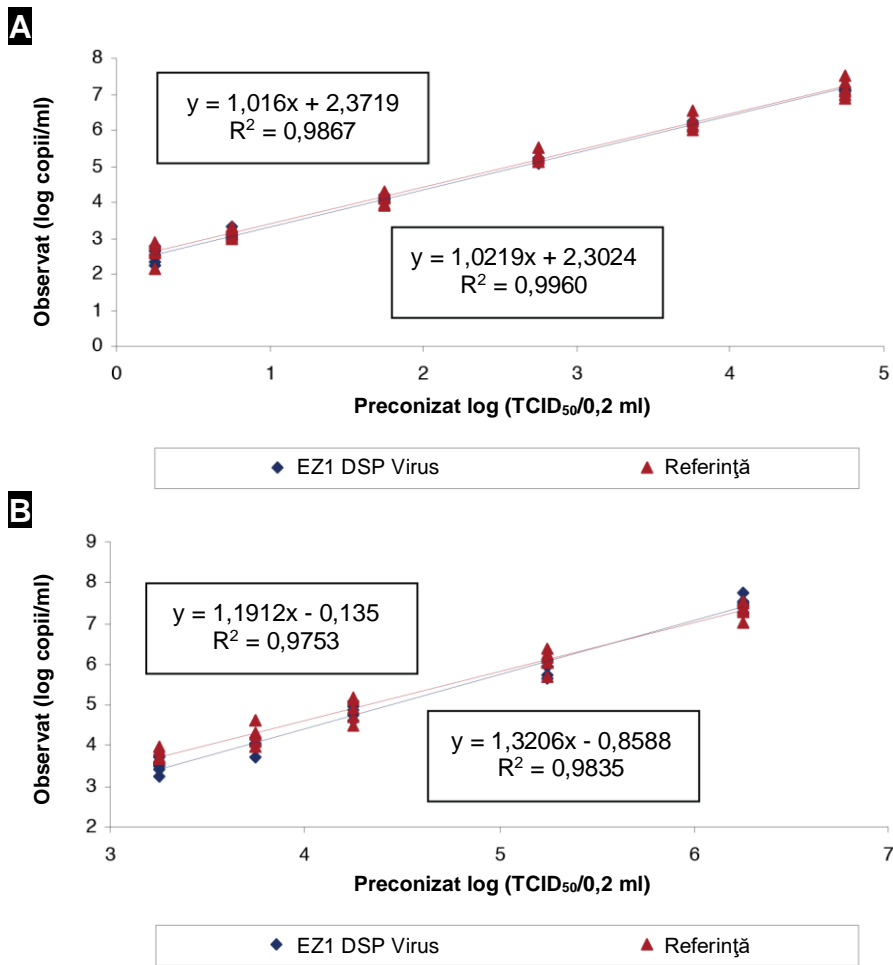


Figura 9. Intervalul liniar al rezultatelor folosind protocolul EZ1 DSP Virus în asociere cu testul *artus*[®] C. trachomatis PCR (A) și *artus*[®] HSV1/2 TM PCR (B) pentru extracția C. trachomatis și HSV-1 din tampoane de bumbac uscate. Studiul a fost făcut în comparație cu o metodă de referință.

Precizie

Abaterile standard și coeficienții de variație (CV) pentru tampoanele uscate au fost determinate pentru HSV-1 și C. trachomatis folosind testul *artus*[®] HSV1/2 TM PCR și *artus*[®] C. trachomatis TM PCR. Copan Flocked Swabs (nr. cat. 502CS0, Copan Italia S.p.A.) și Puritan Cotton Swabs (ref. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC) Tampoanele uscate au fost pregătite și pretratate conform descrierii de mai sus, iar ADN-ul viral și bacterian a fost extras dintr-un volum al probei de 400 μl și eluat în 60 μl de soluție tampon pentru eluție (Buffer AVE). Extracția s-a făcut de la trei donatori de salivă în câte 8 sau 9 replicare, în șase execuții EZ1, în trei zile și cu trei combinații de lot EZ1 DSP Virus Kit/Buffer ATL. Toate probele au fost analizate în cadrul aceleiași execuții PCR. Precizia intermediară pentru C. trachomatis (Tabel 17) și HSV-1 (Tabel 18) a fost calculată luând în considerare toate replicarele fiecăruia dintre donatori și tipuri de tampoane (execuții EZ1 diferite, zile și loturi diferite).

Tabel 17. Precizia protocolului EZ1 DSP Virus în asociere cu *artus*[®] C. trachomatis RG PCR Kit pentru extracția *C. trachomatis* din tampoane uscate

| Tip tampon | Donator | n | Nominal | Observat cop/ml | Precizie | Observat log cop/ml | SD (log copii/ml) |
|----------------------------|---------|---|------------------------------------|--------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------|
| | | | log TCID ₅₀ / 0,2 ml | | intermediară CV cop/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 Flocked 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 |

Tabel 18. Precizia protocolului EZ1 DSP Virus în asociere cu *artus*[®] HSV1/2 RG PCR Kit pentru extracția HSV-1 din tampoane uscate

| Tip tampon | Donator | n | Nominal | Observat cop/ml | Precizie | Observat log cop/ml | SD (log copii/ml) |
|----------------------------|---------|---|------------------------------------|--------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------|
| | | | log TCID ₅₀ / 0,2 ml | | intermediară CV cop/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 Flocked 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 |

Probe respiratorii (spută)

Studiul de corelare

Un studiu de corelare a fost realizat pentru EZ1 DSP Virus pentru extracția *Mycobacterium tuberculosis* din spută umană negativă. O serie de diluție cu 4 titruri virale diferite a fost testată în replicare unică, comparativ cu o metodă de referință. ADN-ul bacterian a fost extras din 200 μl de spută, pretratată cu Sputasol (Oxoid Limited, ref. SR0233) și lizozim (Sigma-Aldrich, nr. cat. L6876) conform descrierii din Manualul EZ1 DSP Virus versiunea 4, apoi eluat în 90 μl de soluție tampon pentru eluție (Buffer AVE). Analiza a fost realizată cu testul *artus*[®] M. tuberculosis RG PCR (Figura 10).

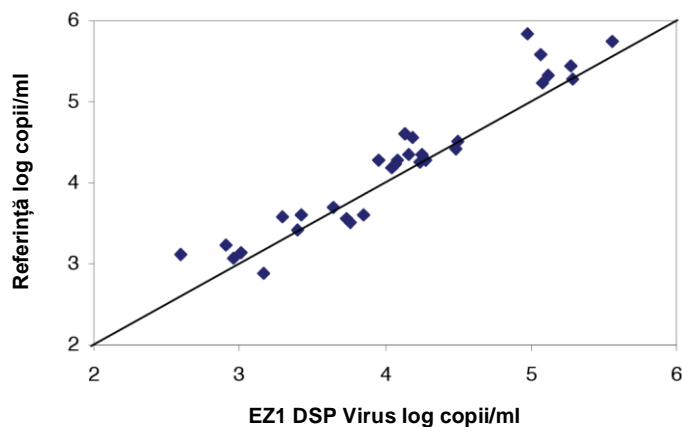


Figura 10. Corelarea procedurii EZ1 DSP Virus cu o metodă de referință.

Pentru informații actualizate privind licențele și clauzele de declinare a răspunderii specifice produselor, consultați ghidul sau manualul de utilizare al kitului QIAGEN respectiv. Ghidurile și manualele de utilizare ale kiturilor QIAGEN sunt disponibile la adresa www.qiagen.com sau pot fi solicitate de la Serviciile Tehnice QIAGEN sau distribuitorul local.

Mărci comerciale: QIAGEN®, *artus*®, EZ1®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM® (Applied Biosystems); COBAS®, AMPLICOR® (Roche Molecular Systems, Inc., oferit cu licență către 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)

Februarie-11 © 2011 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

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