

# EZ1<sup>®</sup> DSP Virus Kit

O desempenho do sistema EZ1 DSP Virus Kit foi estabelecido em estudos de avaliação de desempenho usando plasma, soro, LCR, urina, sangue total, fezes, meios de transporte, swabs secos e amostras respiratórias para o isolamento de ácidos nucleicos virais e DNA bacteriano. O teste foi realizado de acordo com os protocolos descritos na Versão 4 atual do Manual do EZ1 DSP Virus.

No entanto, o desempenho do kit não é garantido para cada espécie de vírus ou bactéria e deve ser validado pelo usuário. O usuário é responsável por validar o desempenho do sistema em quaisquer procedimentos utilizados em seu laboratório que não estejam abrangidos pelos estudos de avaliação de desempenho da QIAGEN.

## Características de desempenho

### Soro e plasma

#### Intervalo linear

O intervalo linear do EZ1 DSP Virus Kit foi avaliado para o RNA dos vírus HCV e HIV-1 e para o DNA do vírus HBV. Os testes foram realizados com diluições de painéis de vírus quantificados feitos em plasma humano ou soro negativos para o HBV, HCV e HIV-1. Foram testadas séries de diluição com seis títulos virais diferentes com 12 réplicas cada. O intervalo linear do procedimento do EZ1 DSP Virus Kit foi determinado para HBV, HCV e HIV-1 com os ensaios de carga viral Abbott RealTime (Tabela 1, Figura 1). Os controles internos do RealTime (17 µl cada) foram adicionados diretamente a cada amostra de HIV-1 ou HCV antes da extração. Para o RealTime HBV, o controle interno do RealTime HBV de 3,4 µl foi combinado com o RNA transportador para cada amostra. Os ácidos nucleicos virais foram extraídos de amostras de 400 µl e eluídos em 90 µl de tampão de eluição (AVE). A PCR foi realizada no Abbott m2000rt.

**Tabela 1. Fonte da amostra e ensaios a jusante usados para determinar o intervalo linear de rendimentos com o protocolo EZ1 DSP Virus**

Vírus	Fonte	Ensaio a jusante	Manual de ensaio usado
HIV-1	HIV deficiente BBI (Boston Biomedica, Inc., Boston, EUA), plasma recalcificado BBI	Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HIV-1
HCV	Soro humano normal agrupado e amostra de paciente ProMedDx (ProMedDx LLC Norton, MA, EUA)	Abbott RealTime HCV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HCV
HBV	Plasma humano recalcificado, amostra de paciente Teragenix (Teragenix Coporate, Ft. Lauderdale, FL, EUA)	Abbott RealTime HBV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HBV



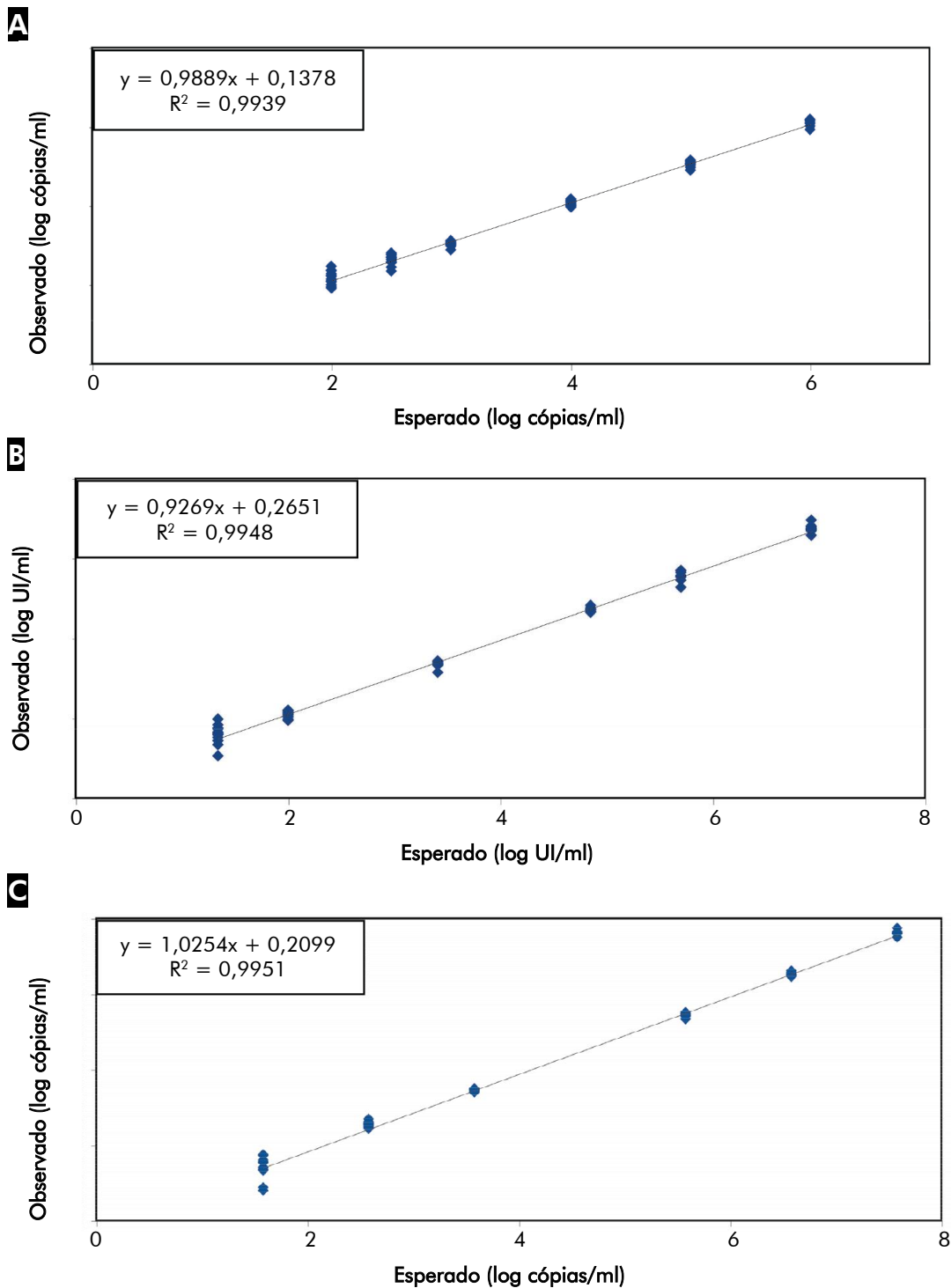


Figura 1. Intervalo linear de rendimentos usando o protocolo EZ1 DSP Virus. O intervalo linear do protocolo EZ1 DSP Virus foi determinado usando séries de diluição virais e ensaios Abbott RealTime ( Tabela 1) **A** para HIV-1, **B** para HCV e **C** para HBV.

## Precisão

Os desvios padrão e os coeficientes de variação (Coefficients of Variations, CVs) foram determinados para séries de diluição de HIV-1, HCV e HBV no intervalo linear dos ensaios a jusante apropriados. Para a análise de precisão, foram usados os mesmos ensaios a jusante que na determinação do intervalo linear (Tabela 1). Os dados de precisão entre ensaios são exibidos nas Tabelas 2–4. Para cada membro do painel, 12 réplicas foram extraídas em 12 execuções separadas no BioRobot EZ1 DSP. A PCR foi realizada em 2 execuções de 6 réplicas cada no Abbott m2000rt.

**Tabela 2. Precisão entre ensaios do protocolo EZ1 DSP Virus usando o ensaio Abbott RealTime HIV-1**

Membro do painel	n	Cópias/ml	CV (%)	Log cópias/ml	SD (log cópias/ml)
1	12	148	40	2,17	0,17
2	12	426	26	2,63	0,13
3	12	1082	14	3,03	0,06
4	11	11.506	14	4,06	0,06
5	12	116.145	15	5,07	0,07
6	12	1.300.669	16	6,11	0,08

**Tabela 3. Precisão entre ensaios do protocolo EZ1 DSP Virus usando o ensaio Abbott RealTime HCV**

Membro do painel	n	UI/ml	CV (%)	Log UI/ml	DP (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

**Tabela 4. Precisão entre ensaios do protocolo EZ1 DSP Virus usando o ensaio Abbott RealTime HBV**

Membro do painel	n	Cópias/ml	CV (%)	Log cópias/ml	SD (log cópias/ml)
1	12	22	60	1,34	0,34
2	12	357	16	2,55	0,07
3	12	2835	7	3,45	0,03
4	11	280.221	10	5,45	0,05
5	12	3.311.311	12	6,52	0,05
6	12	40.040.547	14	7,60	0,06

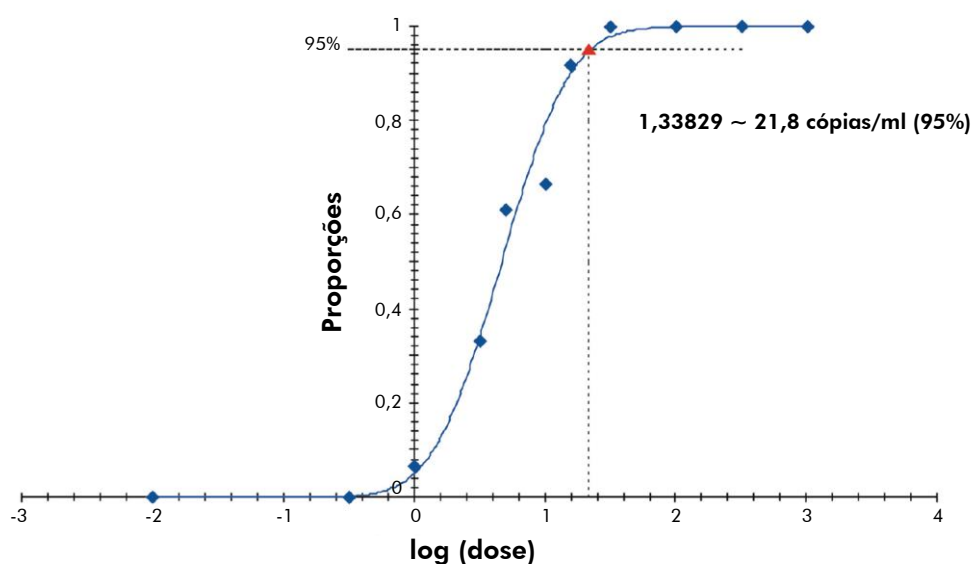
### Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado pelo valor probit de 95% para o sistema EZ1 DSP Virus usando o padrão internacional de vírus HIV-1 da OMS 97/656, o padrão internacional de vírus HBV da OMS 97/746 e o sobrenadante quantificado de cultura de células CMV. O limite de detecção foi determinado através do processamento de séries de diluição dos vírus apropriados. Os vírus foram diluídos no pool de plasma humano normal com EDTA negativo para HIV, HBV e CMV. Cada etapa da diluição foi preparada em pelo menos 3 execuções independentes com no mínimo 6 réplicas por diluição. Foi utilizado 400 µl de plasma para a preparação da amostra no BioRobot EZ1 DSP com eluição em 60 µl.

Os *artus*<sup>®</sup> HBV PCR Kits foram usados para a detecção de DNA do HBV e os *artus*<sup>®</sup> CMV PCR Kits para a detecção de DNA do CMV. As amostras foram analisadas em um instrumento LightCycler<sup>®</sup> 1.2 (Roche), um Rotor-Gene<sup>®</sup> 3000 (Corbett Research) e um ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 SDS (Applied Biosystems). O COBAS<sup>®</sup> AmpliCor<sup>®</sup> HIV-1Monitor<sup>®</sup> Test (versão 1.5) foi usado para a detecção de RNA do HIV usando o analisador COBAS AmpliCor. Os dados combinados para todas as amostras foram avaliados usando a análise probit. Os dados são apresentados nas Tabelas 5–6, com gráficos probit representativos nas Figuras 2–3.

**Tabela 5. Limite de detecção de DNA de HBV e CMV usando o sistema EZ1 DSP Virus e artus® PCR Kits**

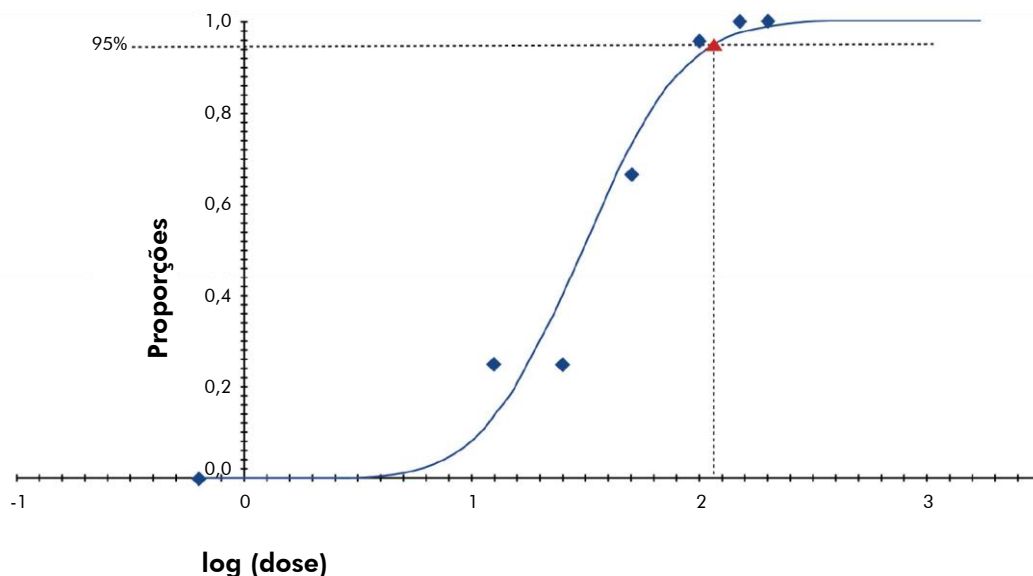
Vírus	Título de entrada	Acertos (LightCycler)	Acertos (Rotor-Gene)	Acertos (ABI PRISM)
HBV	Valor probit de 95% (UI/ml)	45,7	14,4	13,2
	Intervalo de confiança (UI/ml)	28-102	9,5-26,5	9,0-23,1
CMV	Valor probit de 95% (cópias/ml)	67,2	21,8	38,3
	Intervalo de confiança (cópias/ml)	41,8-142	14,5-44,1	21,5-89,8



**Figura 2. Análise probit para detecção de DNA de CMV usando o sistema EZ1 DSP Virus e o artus® CMV RG PCR Kit. Os ácidos nucleicos virais foram purificados usando o sistema EZ1 DSP Virus e o artus® CMV PCR RG Kit foi usado para a detecção de DNA do CMV no Rotor-Gene 3000. O valor probit de 95% foi de 21,8 cópias/ml.**

**Tabela 6. Limite de detecção de RNA do HIV usando o sistema EZ1 DSP Virus e o COBAS Amplificor HIV-1 Monitor Test, versão 1.5**

Título de entrada (UI/ml)	Acertos
Valor probit de 95% (UI/ml)	114,5
Intervalo de confiança (UI/ml)	82,9-194,3



**Figura 3. Análise probit para detecção de RNA do HIV usando o sistema EZ1 DSP Virus e o COBAS Amplificor HIV-1 Monitor Test, versão 1.5. Os ácidos nucleicos virais foram purificados usando o sistema EZ1 DSP Virus, com entrada da amostra de 400 µl e eluição de 60 µl. O COBAS Amplificor HIV-1 Monitor Test foi usado para a detecção de RNA do HIV no analisador COBAS Amplificor no modo ultrasensível. O valor probit de 95% foi de 114,5 UI/ml.**

### Exclusão de carryover de amostras

Foram realizadas nove execuções cada nos instrumentos BioRobot EZ1 DSP, EZ1 Advanced e EZ1 Advanced XL para avaliar o risco de eventos de contaminação cruzada durante e entre os procedimentos do EZ1 DSP Virus. Os testes foram realizados usando uma amostra quantificada de pacientes com parvovírus B19. A carga viral de amostras positivas usadas para os testes de carryover foi de  $1,0 \times 10^8$  UI/ml. Para diluição de amostras positivas e, como as amostras de controle negativas, foi utilizado um pool de plasma EDTA negativo para o parvovírus humano B19.

Para detectar os efeitos de carryover de uma amostra para outra, foram realizadas duas execuções em cada instrumento com uma configuração quadriculada alternada de amostras negativas e altamente positivas. Cada terceira execução foi realizada usando todas as amostras negativas para monitorar o possível carryover execução a execução. Essa configuração de amostra foi repetida três vezes, somando um total de nove execuções para cada instrumento. O DNA do

parvovírus B19 foi detectado e quantificado usando o *artus*<sup>®</sup> Parvo B19 RG PCR Kit com marcação CE-IVD no Rotor-Gene 3000. O limite de detecção analítica do *artus*<sup>®</sup> Parvo B19 RG PCR Kit é determinado como 0,2 UI/μl no eluato ( $p = 0,05$ ). Isso indica que existe uma probabilidade de 95% de detectar 0,2 UI/μl no eluato.

Todas as amostras altamente positivas foram detectadas como positivas usando o *artus*<sup>®</sup> Parvo B19 RG PCR Kit. Todas as amostras negativas, nas execuções quadriculadas e todas as execuções negativas, foram indiferentes (a Tabela 7 apresenta os resultados do BioRobot EZ1 DSP). Estes experimentos demonstram que o protocolo do EZ1 DSP Virus não propicia o carryover de amostras sob estas condições.

**Tabela 7. Configuração do teste de contaminação cruzada e valores de  $C_T$  para a detecção de DNA do parvovírus B19 usando o BioRobot EZ1 DSP**

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

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

X: Indiferente após 45 ciclos de PCR.

## Estabilidade

A estabilidade do RNA e DNA virais em substâncias eluídas geradas usando o EZ1 DSP Virus Kit foi determinada. O plasma humano com EDTA foi contaminado com  $1 \times 10^3$  UI/ml de RNA do HCV AcroMetrix OptiQuant<sup>®</sup> HCV e material padrão Parvo B19 VQC. Por ponto de tempo do teste e condição de incubação, 18 réplicas foram processadas usando o sistema EZ1 DSP Virus. Os eluatos contendo DNA do Parvo B19 e RNA do HCV foram incubados por até 6 horas a 30°C, por até 14 dias a 4°C, por até 12 semanas a -20°C e por até 9 meses a -80°C. O estudo ainda está em andamento. Os eluatos foram analisados usando um HCV RT-PCR validado internamente e o

artus® Parvo B19 RG PCR. Em 18 réplicas, foi observada uma falha de RT-PCR para o RNA do HCV após armazenamento a 4°C por 14 dias (Figura 4).

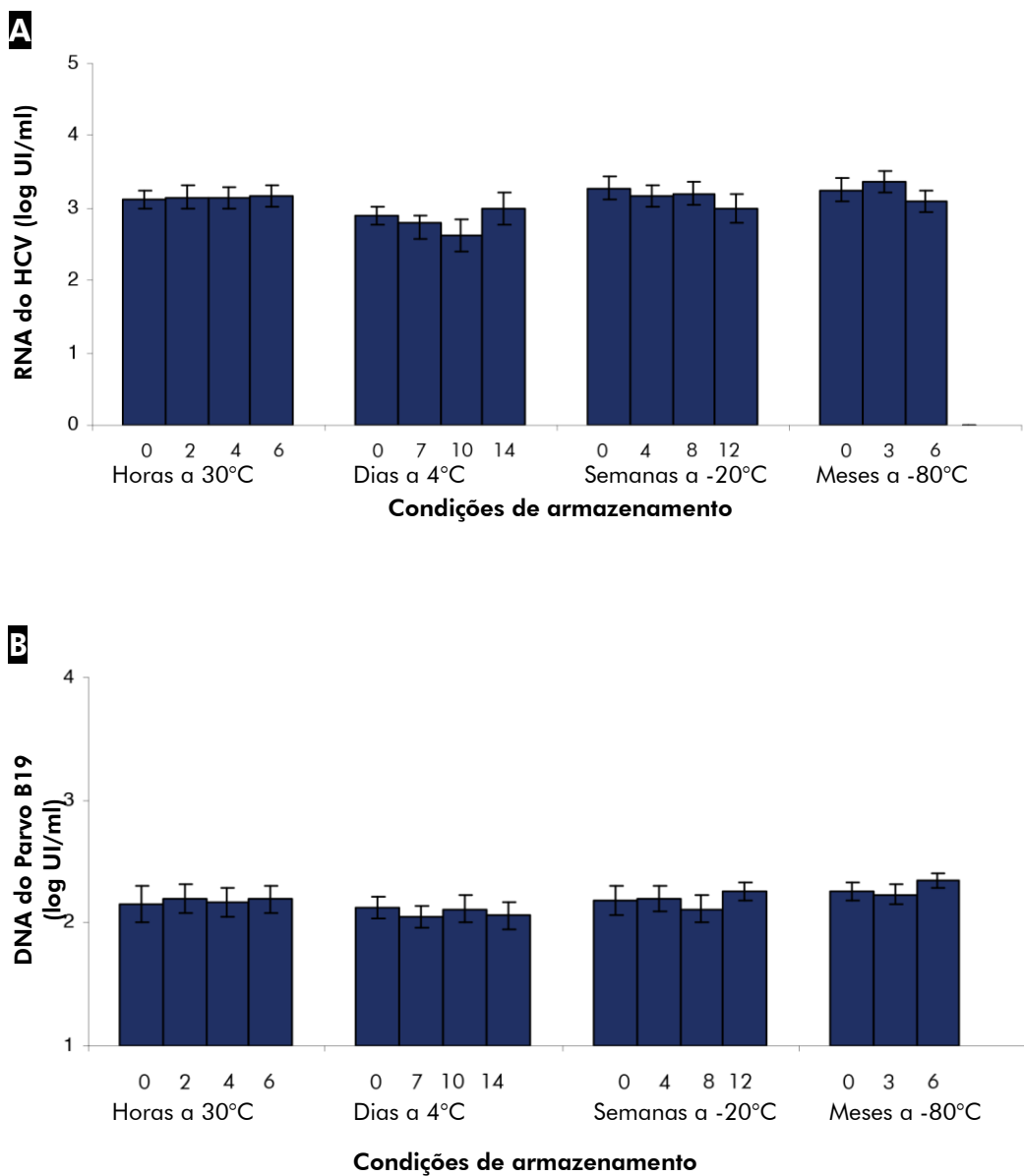


Figura 4. Estabilidade dos ácidos nucleicos virais. A estabilidade do RNA e DNA virais em eluatos gerados usando o EZ1 DSP Virus Kit foi determinada para o **A** RNA do HCV e **B** DNA do Parvo B19.



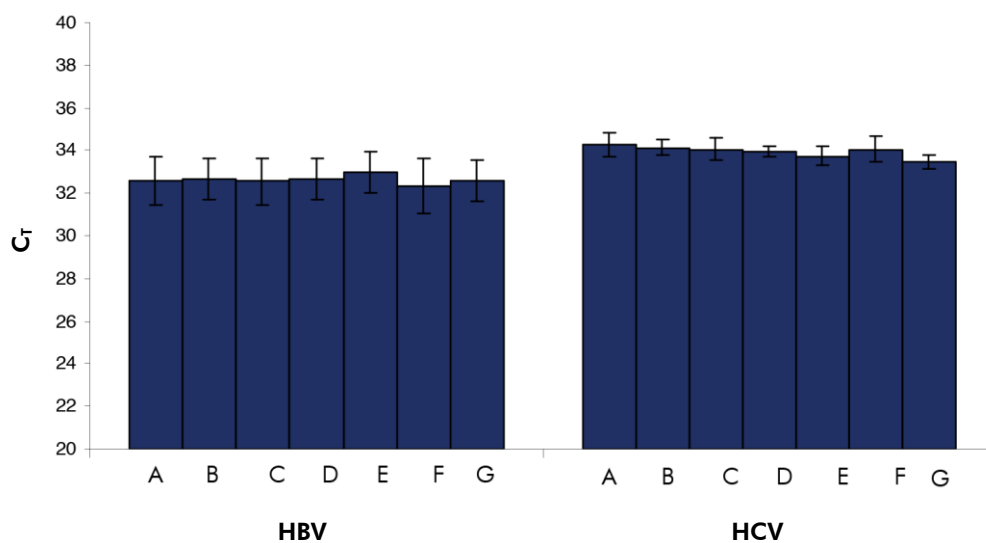
## Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi determinada usando 3 instrumentos BioRobot EZ1 DSP em execução em 3 dias diferentes (consulte a Tabela 8, próxima página). Para cada teste (A–G), foram processadas 12 réplicas em 2 execuções no BioRobot EZ1 DSP. O plasma EDTA humano foi contaminado com  $1 \times 10^4$  UI/ml de RNA AcroMetrix OptiQuant HCV e  $1 \times 10^3$  UI/ml de DNA AcroMetrix OptiQuant HBV. O DNA do HBV foi determinado usando o *artus*<sup>®</sup> HBV RG PCR Kit e o RNA do HCV usando um ensaio de HCV RT-PCR validado internamente.

O procedimento automatizado é altamente reproduzível, conforme demonstrado por resultados comparáveis da purificação de ácidos nucleicos virais em 3 instrumentos diferentes BioRobot EZ1 DSP, em 3 dias diferentes (Figura 5).

**Tabela 8. Configuração do teste de reprodutibilidade**

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



**Figura 5. Reprodutibilidade. A reprodutibilidade foi determinada em três instrumentos diferentes do BioRobot EZ1 DSP, em três dias diferentes.**

## Urina

O desempenho do EZ1 DSP Virus Kit para uso com amostras de urina foi avaliado por comparação com o plasma usando painéis de vírus quantificados de CMV (vírus de DNA) e HCV (vírus de RNA) diluídos no respectivo material da amostra. As amostras de urina e plasma foram tratadas de acordo com o Manual do EZ1 DSP Virus Kit e os volumes de amostra equivalentes foram extraídos com o EZ1 DSP Virus Kit. Os ácidos nucleicos virais foram detectados usando o *artus*<sup>®</sup> CMV RG PCR e o *artus*<sup>®</sup> HCV RG RT-PCR Kit. A avaliação do desempenho do EZ1 DSP Virus Kit comparando urina e plasma apresentaram um desvio de apenas ~2% (com base em valores de  $C_T$ ) tanto para o CMV quanto para o HCV (Tabela 9).

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

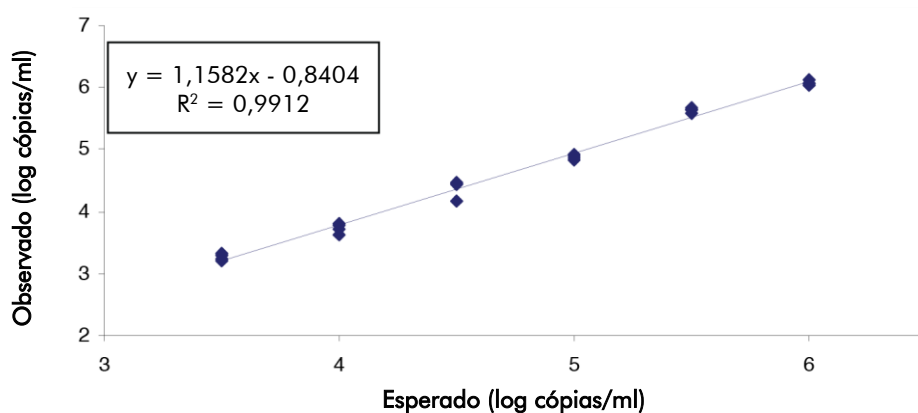
Tipo de espécime	n	Valor de CT	Relação urina/plasma (valor de CT)	Cópias/ml	Relação urina/plasma (cópias/ml)
<b>CMV</b>					
Urina	4	31,60	0,98	6.250	1,51
Plasma	5	32,17		4.130	
<b>HCV</b>					
Urina	4	37,83	1,02	278	0,77
Plasma	5	37,25		363	

## Sangue total

### Intervalo linear

O intervalo linear do EZ1 DSP Virus Kit foi avaliado usando o EBV como um vírus de DNA. Os testes foram realizados com diluições de painéis de vírus quantificados feitos em sangue total humano negativo para o EBV. Foram testadas séries de diluição com seis títulos virais diferentes com 4 réplicas cada. Os ácidos nucleicos virais foram extraídos de 200  $\mu$ l de sangue total (misturado com 200  $\mu$ l de Buffer ATL\*) e eluídos em 60  $\mu$ l de tampão de eluição (AVE). O intervalo linear do procedimento EZ1 DSP Virus Kit foi determinado para o EBV com o *artus*<sup>®</sup> EBV RG PCR no instrumento Rotor-Gene Q (Figura 6).

\*QIAGEN GmbH, n<sup>o</sup> ref. 939016



**Figura 6. O intervalo linear de rendimentos usando o protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o ensaio *artus*<sup>®</sup> EBV RG PCR para a extração de EBV do sangue total.**

## Precisão

Os desvios padrão e coeficientes de variação (Coefficients of Variations, CVs) para o sangue total foram determinados para o CMV usando o *artus*<sup>®</sup> CMV RG PCR Kit no instrumento Rotor-Gene Q. Os dados de precisão entre ensaios são exibidos na Tabela 10. O sangue total derivado de 13 doadores de sangue foi testado em 5 réplicas em execuções separadas no EZ1 Advanced XL. Os ácidos nucleicos virais foram extraídos de 200 µl de sangue total (misturado com 200 µl de Buffer ATL\*) e eluídos em 120 µl de tampão de eluição (AVE).

\*QIAGEN GmbH, n<sup>o</sup> ref. 939016

**Tabela 10. Precisão entre ensaios do protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o *artus*<sup>®</sup> CMV RG PCR Kit para a extração de CMV do sangue total.**

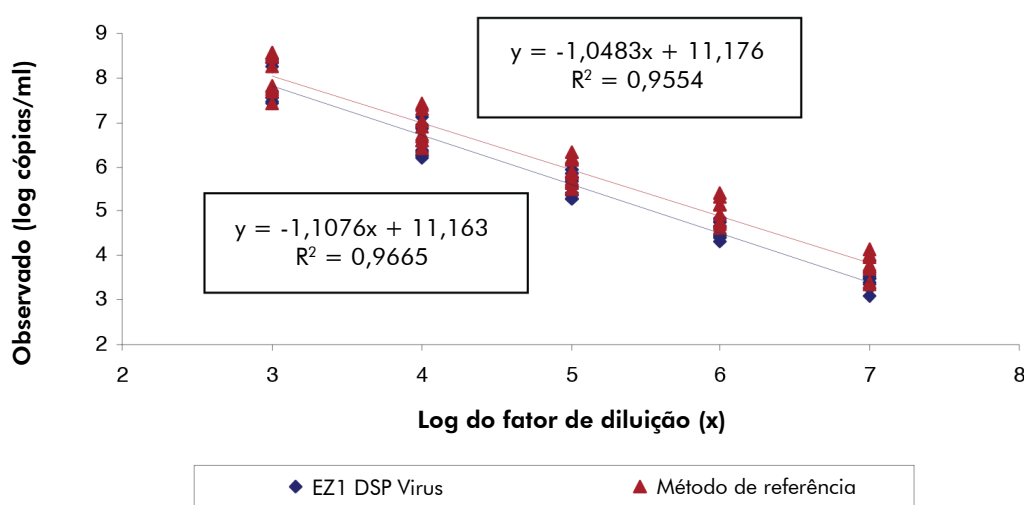
Doador		Cópias/ml	CV (%)	log cópias/ml	SD (log cópias/ml)
1	5	7.209	13	3,86	0,06
2	5	7.404	24	3,87	0,10
3	5	7.313	14	3,86	0,06
4	5	7.185	17	3,86	0,08
5	5	7.803	28	3,89	0,12
6	5	7.257	39	3,86	0,17
7	5	7.870	20	3,90	0,08
8	5	7.583	26	3,88	0,12
9	5	8.571	24	3,93	0,10
10	5	7.177	30	3,86	0,13
11	5	8.294	24	3,92	0,11
12	5	7.790	21	3,89	0,10
13	5	7.627	27	3,88	0,13

## Fezes

### Intervalo linear

O intervalo linear do EZ1 DSP Virus Kit foi avaliado usando o Adenovírus 5 como um vírus de DNA. Os testes foram realizados com diluições seriadas de 10 vezes do sobrenadante da cultura celular em fezes negativas para Adenovírus. Foram testadas séries de diluição com cinco diluições virais diferentes com 10 réplicas cada. Os ácidos nucleicos virais foram extraídos de amostras de 200 µl (ressuspensão de 1:10 em Buffer ASL\*) e eluídos em 120 µl de tampão de eluição (AVE). O intervalo linear do procedimento EZ1 DSP Virus foi determinado em combinação com o ensaio Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, França, ref. 96-010B) no instrumento Rotor-Gene Q em comparação com um método de extração de referência (Figura 7).

\*QIAGEN GmbH, nº ref. 19082



**Figura 7. Intervalo linear de rendimentos usando o protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o ensaio Adenovirus R-Gene™ PCR para a extração do Adenovirus 5 das fezes.**

### Precisão

Os desvios padrão e coeficientes de variação (Coefficients of Variations, CVs) das fezes foram determinados para o Adenovírus 5 usando o ensaio Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, França, ref. 96-010B) no instrumento Rotor-Gene Q. As fezes negativas para Adenovírus foram contaminadas com o sobrenadante de cultura celular de Adenovírus 5 e o DNA viral foi extraído a partir de amostras de 200 µl (ressuspensão de 1:10 em Buffer ASL\*) e eluído em 120 µl de tampão de eluição (AVE). Sete execuções de EZ1 com 9 ou 10 réplicas cada foram realizadas em três dias, com três instrumentos EZ1 Advanced XL e três combinações de lotes EZ1 DSP Virus Kit/Buffer ASL. Todas as amostras foram analisadas na mesma execução de PCR. Os dados de precisão (Tabela 11) foram calculados levando em consideração os resultados de diferentes instrumentos, dias, lotes e todas as execuções de EZ1 juntas (totais).

\*QIAGEN GmbH, nº ref. 19082

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

Execução	n	Cóp/ml	Log cóp/ml	SD log cóp/ml)	Intra-ensaio	CV c/ml (%)			Total
						3 Adv. XL	3 dias	3 lotes	
1	9	3.530	3,46	0,22	48	80	59	47	66
2	9	2.955	3,42	0,19	38	–	–	–	–
3	9	2.226	3,26	0,35	43	–	–	–	–
4	9	2.385	3,35	0,23	54	–	–	–	–
5	9	604	2,69	0,24	54	–	–	–	–
6	9	1.214	3,06	0,21	53	–	–	–	–
7	10	1.702	3,19	0,26	48	–	–	–	–

### Estudo de correlação

Foi realizado um estudo de correlação para o procedimento EZ1 DSP Virus em comparação com um método de referência para a extração do Norovírus Genogrupo II de 66 amostras de fezes de pacientes. Os ácidos nucleicos virais foram extraídos de amostras de 200 µl (ressuspensão de 1:10 em Buffer ASL\*) e eluídos em 120 µl de tampão de eluição (AVE). A análise foi realizada com um ensaio interno de RT PCR em comparação com o Norovírus Genogrupo II (Tabela 12).

\*QIAGEN GmbH, nº ref. 19082

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

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

## Meios de transporte

### Intervalo linear

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

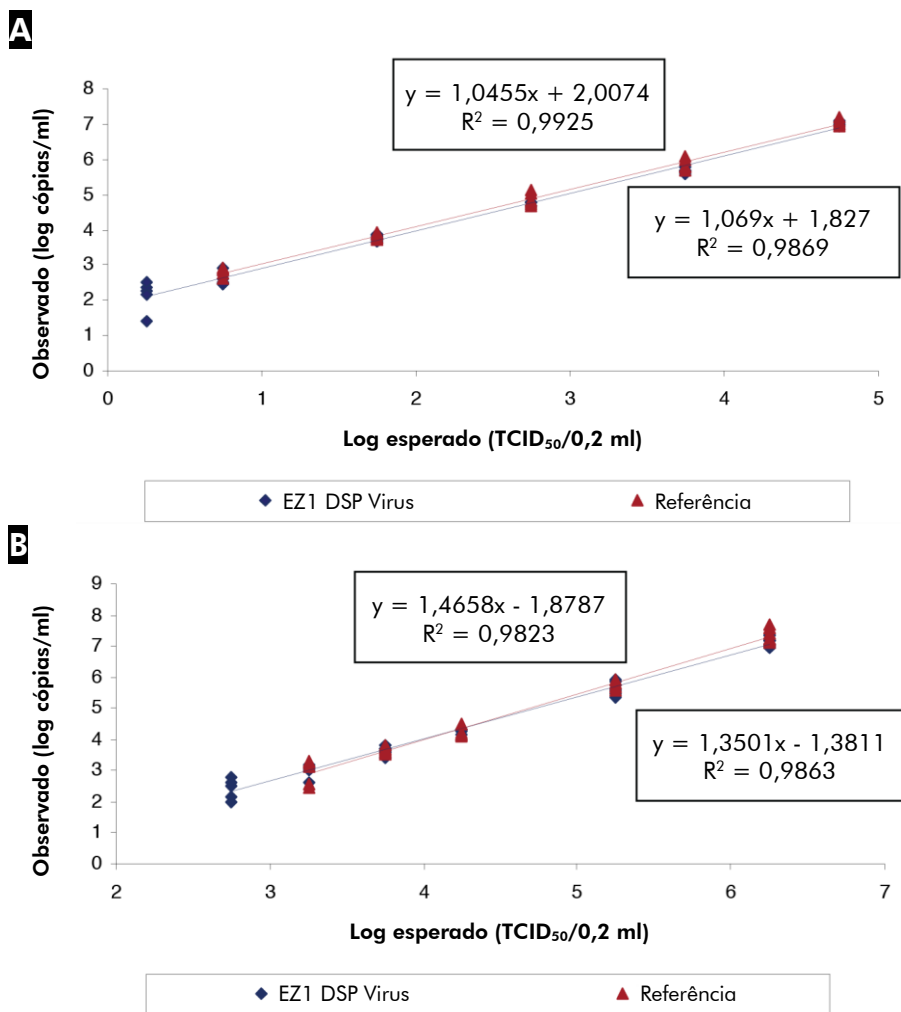


Figura 8. Intervalo linear de rendimentos usando o protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o *artus*® *C. trachomatis* PCR (A) e o ensaio *artus*® HSV1/2 TM PCR (B) para a extração de HSV-1 e *C. trachomatis* do meio de transporte. O estudo foi realizado em comparação com um método de referência.

## Precisão

Os desvios padrão e coeficientes de variação (Coefficients of Variations, CVs) para meios de transporte foram determinados para HSV-1 e *C. trachomatis* usando o *artus*<sup>®</sup> HSV1/2 TM PCR e o ensaio *artus*<sup>®</sup> *C. trachomatis* TM PCR. O DNA viral e bacteriano foi extraído de 400 µl de meio e eluído em 60 µl de tampão de eluição (AVE). Cinco meios de transporte foram extraídos em 12 réplicas, cada uma em seis execuções de EZ1, em três dias e com três lotes de EZ1 DSP Virus Kit. Todas as amostras foram analisadas na mesma execução de PCR. A precisão intermediária para *C. trachomatis* (Tabela 13) e HSV-1 (Tabela 14) foi calculada considerando todas as réplicas de cada meio de transporte (diferentes execuções EZ1, dias e lotes).

**Tabela 13. Precisão do protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o *artus*<sup>®</sup> *C. trachomatis* RG PCR Kit para a extração do *C. trachomatis* do meio de transporte.**

Meio	n	Log nominal		Precisão intermediária		
		TCID <sub>50</sub> /0,2 ml	cóp/ml observado	CV cóp/ml (%)	log cóp/ml observado	
<sup>1</sup> QIAGEN STM	12	3,75	61.623	10	4,79	0,05
<sup>2</sup> Remel M4RT <sup>®</sup>	12	3,75	79.630	10	4,90	0,05
<sup>3</sup> PreservCyt <sup>®</sup>	12	3,75	54.749	9	4,74	0,04
<sup>4</sup> BD Surepath <sup>®</sup>	12	3,75	56.312	18	4,74	0,08
<sup>5</sup> Copan UTM	12	3,75	76.099	9	4,88	0,04

<sup>1</sup> QIAGEN GmbH, nº ref. 5123-1220; <sup>2</sup> Thermo Fisher Scientific Group, ref. R12505; <sup>3</sup> Cytoc Corp., ref. 0200011; <sup>4</sup> Becton, Dickinson and Company, ref. GYN-0001-V; <sup>5</sup> Copan Diagnostics Inc., nº ref. 330C



**Tabela 14. Precisão do protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o *artus*<sup>®</sup> HSV1/2 RG PCR Kit para a extração do HSV-1 do meio de transporte.**

Meio	n	Log nominal	cóp/ml observado	Precisão intermediária	log cóp/ml observado	SD (log cóp/ml)
		TCID <sub>50</sub> /0,2 ml		CV cóp/ml (%)		
<sup>1</sup> QIAGEN STM	12	4,25	16.615	47	4,17	0,21
<sup>2</sup> Remel M4RT <sup>®</sup>	12	4,25	17.433	38	4,21	0,20
<sup>3</sup> PreservCyt <sup>®</sup>	12	4,25	13.494	41	4,09	0,19
<sup>4</sup> BD Surepath <sup>®</sup>	12	4,25	17.013	58	4,16	0,28
<sup>5</sup> Copan UTM	12	4,25	15.999	39	4,17	0,18

<sup>1</sup> QIAGEN GmbH, nº ref. 5123-1220; <sup>2</sup> Thermo Fisher Scientific Group, ref. R12505; <sup>3</sup> Cytoc Corp., ref. 0200011; <sup>4</sup> Becton, Dickinson and Company, ref. GYN-0001-V; <sup>5</sup> Copan Diagnostics Inc., nº ref. 330C

## Desempenho clínico (HPV)

Alíquotas de DNA purificadas de um total de 108 amostras compreendendo 50 amostras positivas para HC2 coletadas em STM, 50 amostras positivas para HC2 coletadas no PreservCyt® e 8 amostras negativas para HC2 em STM foram testadas com o *digene*® HPV Genotyping RH Test (nº ref. 613413) e o *digene*® HPV Genotyping LQ Test (nº ref. 613215) em comparação com o sistema Free University RLB\*.

Os resultados foram classificados como idênticos (100% de genótipos correspondentes), compatíveis (pelo menos um genótipo em comum) ou discordantes (sem genótipos correspondentes). As discrepâncias (resultados discordantes de genotipagem) foram resolvidas repetindo os dois ensaios e, no caso de existirem discrepâncias remanescentes, por análise subsequente com um terceiro ensaio sensível de detecção e genotipagem do HPV [SPF10-LiPA25 (versão 1)].

Os resultados apresentaram um nível muito baixo de amostras discrepantes (2%) após a resolução das amostras discrepantes iniciais para ambos os ensaios de genotipagem em comparação com o método de referência (Tabela 15).

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

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

\* van den Brule, A. J., Pol R., Fransen-Daalmeijer, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J. e 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.

## Desempenho clínico (Influenza A)

Para demonstrar o desempenho clínico, 102 espécimes de swab nasofaríngeo coletados em UTM (Copan Diagnostics Inc., nº ref. 330C) foram avaliados usando o EZ1 DSP Virus Kit para a extração de ácido nucleico. O RNA da Influenza A foi detectado usando o *artus*® Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR Kit e o teste Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR (Tabela 16) aprovado nos EUA.

**Tabela 16. Comparação do *artus*® Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR Kit com o teste Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR aprovado nos EUA, usando o EZ1 DSP Virus Kit para a extração do vírus sazonal de Influenza A e Influenza H1N1 2009 a partir de swabs nasofaríngeos**

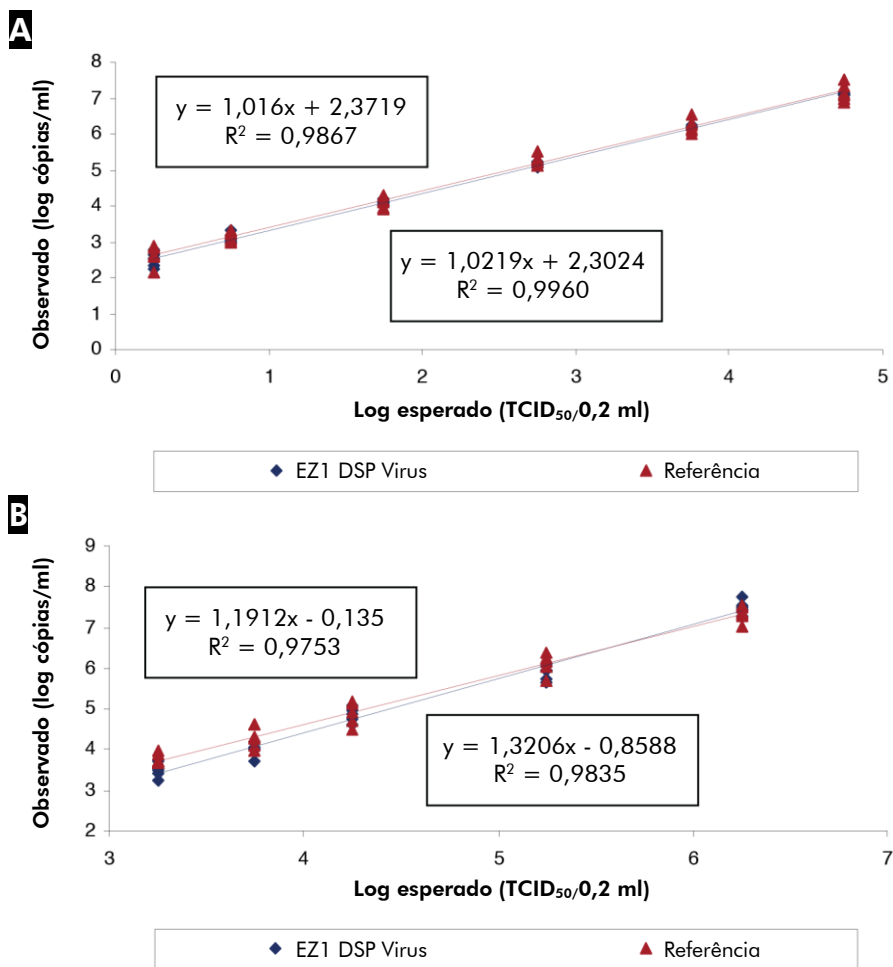
		Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR			Total
		Infl.A sazonal positivo	2009 H1N1 positivo	Negativo	
<i>artus</i> ® Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR	Infl.A sazonal positivo	5	0	2	7
	2009 H1N1 positivo	0	27	1	28
	Negativo	0	0	67	67
	<b>Total</b>	5	27	70	102

## Swabs secos

### Intervalo linear

O intervalo linear do EZ1 DSP Virus Kit foi avaliado extraindo HSV-1 e *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) de Puritan Cotton Swabs (ref. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC). Os testes foram realizados com diluições de material padrão quantificado. A saliva negativa humana foi contaminada com material patogênico e transferida para o swab. Após a desidratação, os patógenos foram isolados novamente do swab seco por ressuspensão em 600 µl de Buffer ATL\*. Foram testadas séries de diluição com seis títulos virais diferentes em 5 ou 6 réplicas cada. O intervalo linear do EZ1 DSP Virus Kit foi determinado em comparação com um método de referência com o *artus*<sup>®</sup> HSV1/2 TM PCR e o ensaio *artus*<sup>®</sup> *C. trachomatis* TM PCR (Figura 9). Os ácidos nucleicos virais foram extraídos de amostras de 400 µl e eluídos em 150 µl de tampão de eluição (AVE).

\*QIAGEN GmbH, nº ref. 939016



**Figura 9. Intervalo linear de rendimentos usando o protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o *artus*<sup>®</sup> C. trachomatis PCR (A) e o ensaio *artus*<sup>®</sup> HSV1/2 TM PCR (B) para a extração de HSV-1 e C. trachomatis de swabs de algodão secos. O estudo foi realizado em comparação com um método de referência.**

## Precisão

Os desvios padrão e coeficientes de variação (Coefficients of Variations, CVs) para swabs secos foram determinados para HSV-1 e C. trachomatis usando o *artus*<sup>®</sup> HSV1/2 TM PCR e o ensaio *artus*<sup>®</sup> C. trachomatis TM PCR. Os Copan Flocked Swabs (n<sup>o</sup> ref. 502CS0, Copan Italia S.p.A), os Puritan Cotton Swabs (ref. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC) e os swabs secos foram preparados e pré-tratados conforme descrito acima e o DNA viral e bacteriano foi extraído do volume de amostra de 400 µl e eluído em 60 µl de tampão de eluição (AVE). A extração foi realizada com três doadores de saliva em 8 ou 9 repetições cada, em seis execuções EZ1, em três dias e com três combinações de lotes EZ1 DSP Virus Kit/Buffer ATL. Todas as amostras foram analisadas na mesma execução de PCR. A precisão intermediária para C. trachomatis (Tabela 17) e HSV-1 (Tabela 18) foi calculada considerando todas as réplicas de cada doador e tipo de swab (diferentes execuções EZ1, dias e lotes).

**Tabela 17. Precisão do protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o artus® C. trachomatis RG PCR Kit para a extração de C. trachomatis dos swabs secos**

Tipo de swab	Doador	n	Log nominal	cóp/ml observado	Precisão intermediária	log cóp/ml observado	SD (log cópias /ml)
			TCID <sub>50</sub> / 0,2 ml		CV cóp/ml (%)		
Puritan Cotton Swabs	1	9	1,75	16.782	28	4,22	0,12
	2	9	1,75	15.896	23	4,20	0,09
	3	9	1,75	16.111	12	4,21	0,05
Copan flocced swabs	1	9	1,75	26.486	19	4,42	0,09
	2	9	1,75	30.356	17	4,48	0,08
	3	9	1,75	19.926	18	4,30	0,08

**Tabela 18. A precisão do protocolo EZ1 DSP Virus em combinação com o artus® HSV1/2 RG PCR Kit para a extração do HSV-1 dos swabs secos**

Tipo de swab	Doador	n	Log nominal	cóp/ml observado	Precisão intermediária	log cóp/ml observado	SD (log cópias /ml)
			TCID <sub>50</sub> / 0,2 ml		CV cóp/ml (%)		
Puritan Cotton Swabs	1	9	3,75	5.843	52	3,77	0,22
	2	8	3,75	13.295	62	4,12	0,20
	3	8	3,75	10.272	40	4,01	0,16
Copan flocced swabs	1	8	3,75	6.215	30	3,79	0,13
	2	9	3,75	10.773	24	4,03	0,11
	3	9	3,75	10.336	24	4,01	0,11

## Amostras respiratórias (expetoração)

### Estudo de correlação

Um estudo de correlação foi realizado para o procedimento EZ1 DSP Virus para a extração de *Mycobacterium tuberculosis* da expetoração humana negativa. Uma série de diluições com 4 títulos virais diferentes foi testada em réplicas únicas em comparação com um método de referência. O DNA bacteriano foi extraído de 200  $\mu$ l de expetoração, pré-tratado com Sputasol (Oxoid Limited, ref. SR0233) e Lisozima (Sigma-Aldrich, nº ref. L6876), conforme descrito no Manual do EZ1 DSP Virus Versão 4 e eluído em 90  $\mu$ l de tampão de eluição (AVE). A análise foi realizada com o ensaio *artus*<sup>®</sup> *M. tuberculosis* RG PCR (Figura 10).

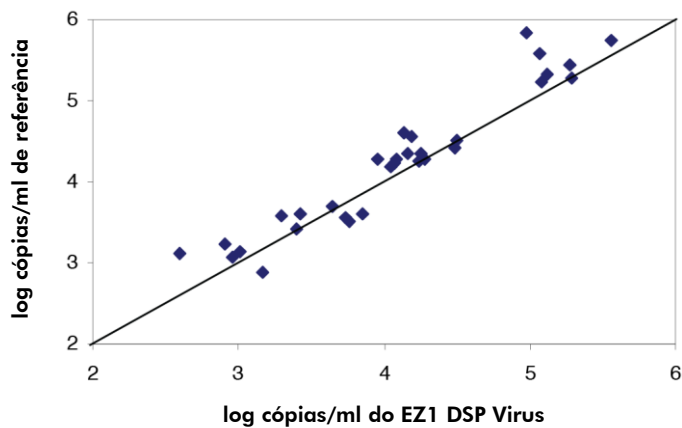


Figura 10. Correlação do procedimento EZ1 DSP Virus com um método de referência.

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do respectivo kit QIAGEN. Os manuais dos kits da QIAGEN e os manuais do usuário estão disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados aos Serviços Técnicos da QIAGEN ou ao distribuidor local.

Marcas registradas: QIAGEN®, *artus*®, EZ1®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM® (Applied Biosystems); COBAS®, AMPLICOR® (Roche Molecular Systems, Inc., licenciado para 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)

Fevereiro de 2011 © 2011 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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