

Kit EZ1[®] DSP Virus

La performance du système du kit EZ1 DSP Virus a été établie lors d'études d'évaluation de la performance utilisant du plasma, du sérum, du liquide céphalorachidien, de l'urine, du sang total, des fèces, des milieux de transport, des écouvillons secs et des échantillons respiratoires pour l'isolation des acides nucléiques viraux et de l'ADN bactérien. On a réalisé des tests selon les protocoles décrits dans la version 4 actuelle du manuel du kit EZ1 DSP Virus.

Cependant, la performance du kit n'est pas garantie pour chaque espèce de virus ou de bactérie, et doit être validée par l'utilisateur. Il est de la responsabilité des utilisateurs de valider la performance du système pour toute procédure utilisée dans leur laboratoire et non couverte par les études d'évaluation de la performance QIAGEN.

Caractéristiques de performance

Sérum et plasma

Plage linéaire

La plage linéaire du kit EZ1 DSP Virus a été évaluée pour les virus à ARN VHC et VIH-1 et pour le virus ADN VHB. Les tests ont été effectués avec des dilutions de panels de virus quantifiés réalisées dans du sérum ou du plasma humain non porteur du VHB, VHC et VIH-1. Des séries de dilutions avec six titres de virus différents ont été testées avec douze réplicats chacune. La plage linéaire de la procédure du kit EZ1 DSP Virus a été déterminée pour le VHB, le VHC et le VIH-1 avec les analyses de la charge virale d'Abbott RealTime (Tableau 1, Figure 1). Les solutions témoins internes RealTime (17 μ l chacune) ont été directement ajoutées à chaque échantillon de VIH-1 ou de VHC avant l'extraction. Pour le VHB de RealTime, on a associé 3,4 μ l de solution témoin interne VHB de RealTime à l'ARN entraîneur pour chaque échantillon. Les acides nucléiques viraux ont été extraits d'échantillons de 400 μ l et élués dans le tampon d'éluion (AVE) de 90 μ l. L'amplification en chaîne par polymérase a été effectuée sur l'Abbott m2000rt.



Table 1. Source d'échantillon et analyses en aval utilisées pour déterminer la plage linéaire des rendements avec le protocole de l'EZ1 DSP Virus

Virus	Source	Analyse en aval	Manuel d'analyse utilisé
VIH-1	VIH défectif de BBI (Boston Biomedica, Inc., Boston, USA), plasma recalifié de BBI	VIH-1 d'Abbott RealTime (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HIV-1
VHC	Échantillon de patient, sérum humain normal mis en commun de ProMedDx (ProMedDx LLC Norton, Massachusetts, USA)	VHC d'Abbott RealTime (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HCV
VHB	Échantillon de patient, plasma humain recalifié de Teragenix (Teragenix Corporate, Ft. Lauderdale, FL, USA)	VHB d'Abbott RealTime (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HBV

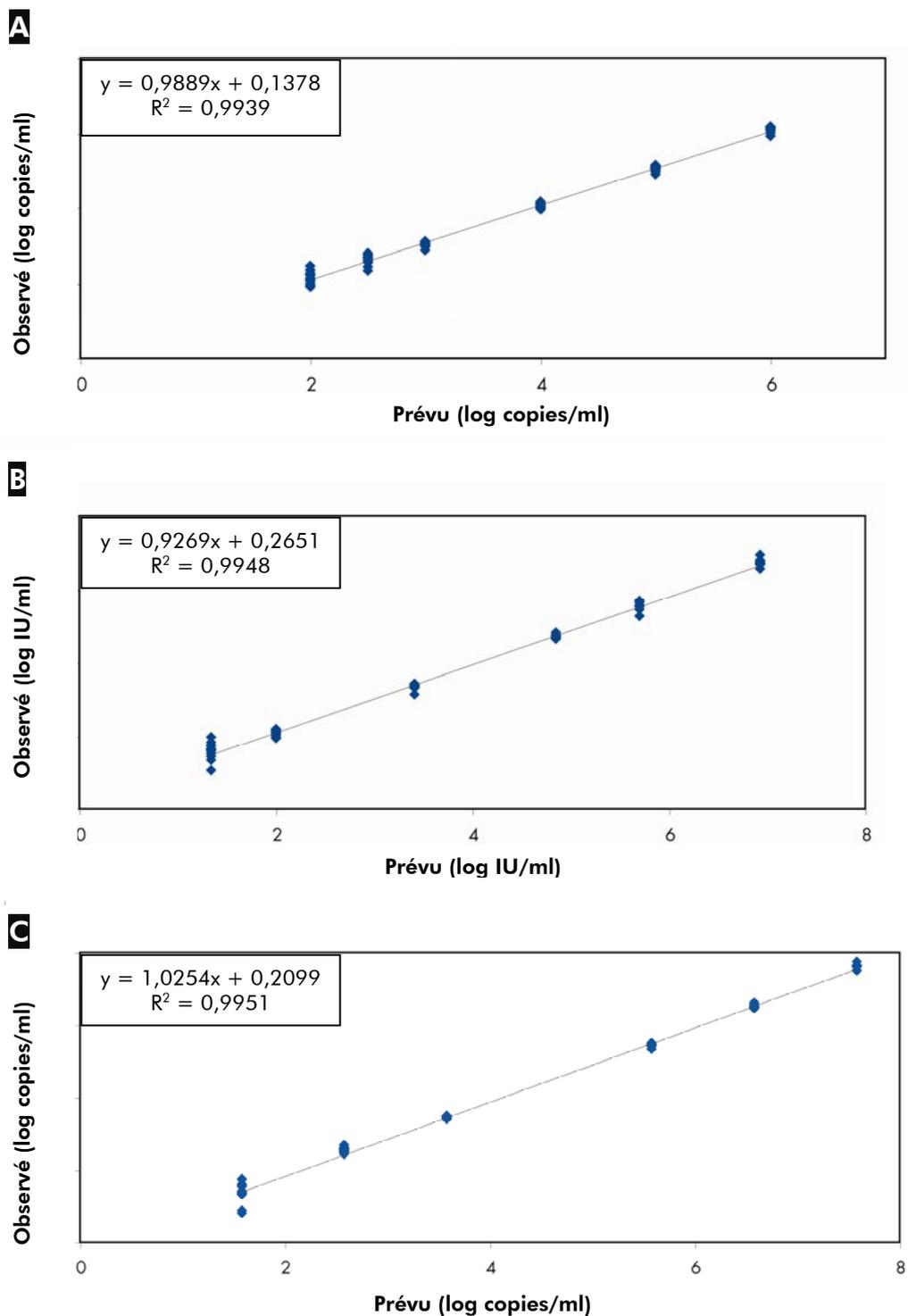


Figure 1. Plage linéaire des rendements avec le protocole de l'EZ1 DSP Virus. La plage linéaire du protocole de l'EZ1 DSP Virus a été déterminée en utilisant des séries de dilutions virales et des analyses d'Abbott RealTime (Tableau 1) **A** pour le VIH-1, **B** pour le VHC et **C** pour le VHB.

Précision

Des écarts et des coefficients de variations (CV) standard ont été déterminés pour les séries de dilutions du VIH-1, du VHC et du VHB dans la plage linéaire des analyses en aval appropriées. Pour plus de précision, on a utilisé les mêmes analyses en aval que pour la détermination de la plage linéaire (Tableau 1, page 2). Les données de précision inter-analyses sont représentées sur les Tableaux 2 à 4. 12 réplicats ont été extraits en 12 cycles séparés sur le BioRobot EZ1 DSP. L'amplification en chaîne par polymérase a été effectuée en deux cycles de six réplicats chacune sur l'Abbott *m2000rt*.

Tableau 2. Précision inter-analyses du protocole de l'EZ1 DSP Virus en utilisant le test de dépistage du VIH-1 d'Abbott RealTime

Membre du panel	n	Copies/ml	CV (%)	log copies/ml	SD (log copies/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

Tableau 3. Précision inter-analyses du protocole de l'EZ1 DSP Virus en utilisant le test de dépistage du VHC d'Abbott RealTime

Membre du panel	n	Copies/ml	CV (%)	log copies/ml	SD (log copies/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

Tableau 4. Précision inter-analyses du protocole de l'EZ1 DSP Virus en utilisant le test de dépistage du VHB d'Abbott RealTime

Membre du panel	n	Copies/ml	CV (%)	log copies/ml	SD (log copies/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

Seuil de détection

Le seuil de détection a été déterminé par la valeur des probits de 95% pour le système EZ1 DSP Virus en utilisant la norme internationale de l'OMS 97/656 du VIH-1, la norme internationale de l'OMS 97/746 du VHB et le surnageant de culture cellulaire du CMV quantifié. Le seuil de détection a été déterminé en traitant des séries de dilutions des virus appropriés. Les virus ont été dilués en un pool de plasma d'EDTA humain normal VIH, VHB et CMV négatif. Chaque étape de dilution a été préparée en au moins trois cycles indépendants avec au moins six réplicats par dilution. 400 µl de plasma ont été utilisés pour la préparation d'échantillon sur le BioRobot EZ1 DSP avec une élution de 60 µl.

On a utilisé les kits *artus*[®] HBV PCR pour la détection de l'ADN du VHB et les kits *artus* CMV PCR pour la détection de l'ADN du CMV. Les échantillons ont été analysés sur un appareil LightCycler[®] 1.2 (Roche), un Rotor-Gene[®] 3000 (Corbett-Research) et un ABI PRISM[®] 7000 SDS (Applied Biosystems). On a utilisé le test Amplicor[®] HIV-1Monitor[®] de COBAS[®] (version 1.5) pour la détection de l'ARN du VIH avec l'Amplicor Analyzer de COBAS. Les données associées pour tous les échantillons ont été évaluées en utilisant la méthode des probits. Les données sont présentées dans les Tableaux 5 et 6, avec des graphiques de probits représentatifs dans les Figures 2 et 3.

Table 5. Seuil de détection de l'ADN du VHB et du CMV en utilisant le système EZ1 DSP Virus et les kits PCR *artus*

Virus	Titre d'entrée	Occurrences (LightCycler)	Occurrences (Rotor-Gene)	Occurrences (ABI PRISM)
VHB	Valeur des probits de 95% (IU/ml)	45,7	14,4	13,2
	Intervalle de confiance (IU/ml)	28–102	9,5–26,5	9,0–23,1
CMV	Valeurs des probits de 95% (copies/ml)	67,2	21,8	38,3
	Intervalle de confiance (copies/ml)	41,8–142	14,5–44,1	21,5–89,8

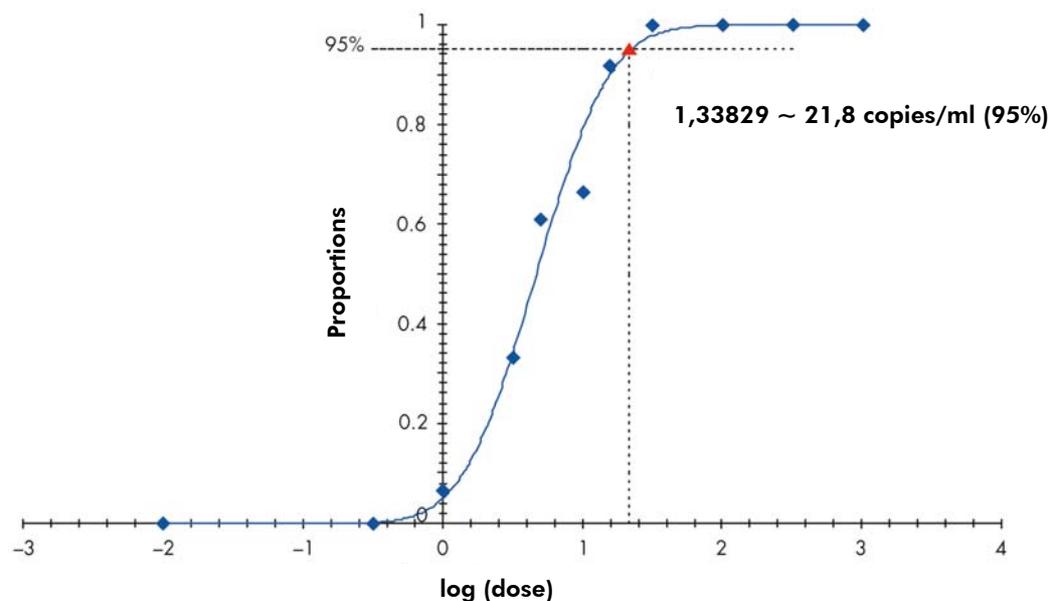


Figure 2. Méthode des probits pour la détection de l'ADN du CMV en utilisant le système EZ1 DSP Virus et le kit *artus* CMV RG PCR. Les acides nucléiques viraux ont été purifiés en utilisant le système EZ1 DSP Virus, et le kit *artus* CMV PCR RG a été utilisé pour la détection de l'ADN du CMV sur le Rotor-Gene 3000. La valeur des probits de 95% était de 21,8 copies/ml.

Tableau 6. Seuil de détection de l'ARN du VIH avec le système EZ1 DSP Virus et le test Amplikor HIV-1 Monitor version 1.5 de COBAS

Titre d'entrée (IU/ml)	Occurrences
Valeur des probits de 95% (IU/ml)	114,5
Intervalle de confiance (IU/ml)	82,9–194,3

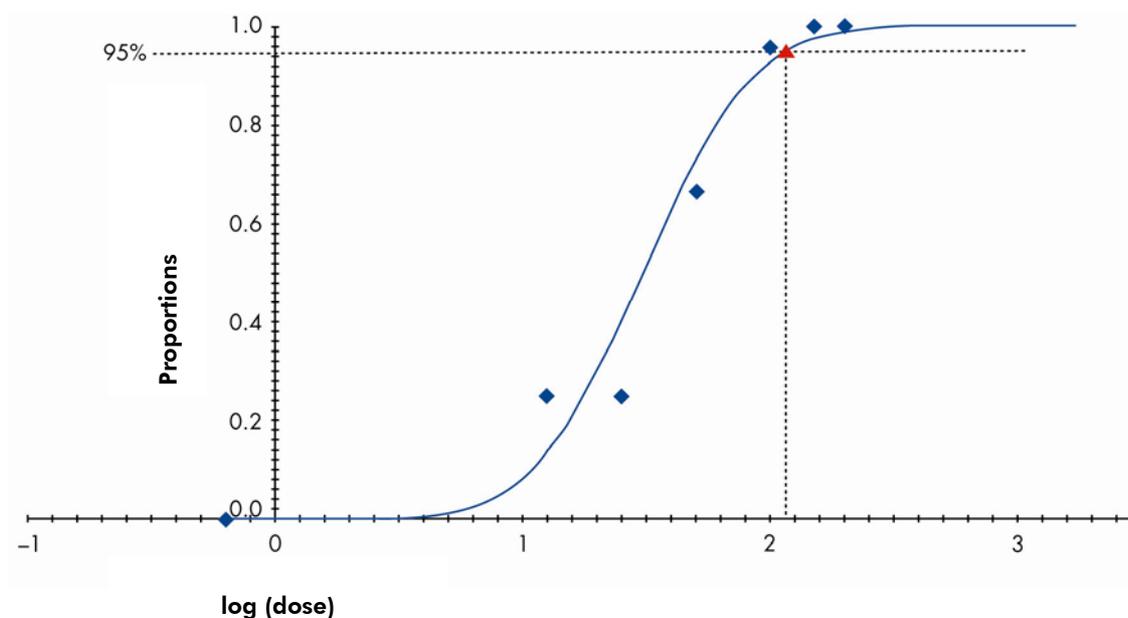


Figure 3. Méthode des probits pour la détection de l'ARN du VIH avec le système EZ1 DSP Virus et le test Amplikor HIV-1 Monitor version 1.5 de COBAS. Les acides nucléiques viraux ont été purifiés à l'aide du système EZ1 DSP Virus, avec une entrée d'échantillon de 400 µl et une élution de 60 µl. On a utilisé le test Amplikor HIV-1 Monitor de COBAS pour la détection de l'ARN du VIH sur l'Amplikor Analyzer de COBAS en mode ultrasensible. La valeur des probits de 95% était de 114,5 IU/ml.

Exclusion des résidus d'échantillons

Neuf cycles de chaque ont été exécutés sur les appareils BioRobot EZ1 DSP, EZ1 Advanced et EZ1 Advanced XL afin d'évaluer les risques de contamination croisée durant et entre des procédures de l'EZ1 DSP Virus. Les tests ont été effectués à l'aide d'un échantillon de patient parvovirus B19 quantifié. La charge virale d'échantillons positifs utilisée pour les tests de résidus était de $1,0 \times 10^8$ IU/ml. Pour la dilution d'échantillons positifs et, en tant qu'échantillons témoins négatifs, on a utilisé un pool de plasma d'EDTA négatif de parvovirus B19 humain.

Afin de détecter les résidus d'échantillon à échantillon, deux cycles ont été exécutés sur chaque appareil avec une configuration en damier alternative d'échantillons négatifs et hautement positifs. Chaque troisième cycle été exécuté en utilisant tous les échantillons négatifs pour surveiller

d'éventuels résidus d'un cycle à l'autre. Cette configuration d'échantillons a été répétée trois fois pour atteindre un total de neuf cycles pour chaque instrument. L'ADN de parvovirus B19 a été détecté et quantifié à l'aide du kit *artus* Parvo B19 RG PCR portant la mention CE-IVD sur le Rotor-Gene 3000. Le seuil de détection analytique du kit *artus* Parvo B19 RG PCR est établi à 0,2 IU/ μ l dans l'éluat ($p = 0,05$). Cela indique que la probabilité de détecter 0,2 IU/ μ l dans l'éluat est de 95%.

Tous les échantillons hautement positifs ont donné des résultats positifs avec le kit *artus* Parvo B19 RG PCR. Aucun des échantillons négatifs, dans les cycles en damier et les cycles entièrement négatifs, n'a réagi (le Tableau montre les résultats obtenus sur le BioRobot EZ1 DSP). Ces expériences démontrent que le protocole de l'EZ1 DSP Virus ne fournit aucun résidu d'échantillon dans ces conditions.

Tableau 7. Préparation du test de contamination croisée et valeurs C_T pour la détection de l'ADN du parvovirus B19 à l'aide du BioRobot EZ1 DSP

Run	Position					
	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

Valeur C_T moyenne de tous les échantillons = 15,40 \pm 0,18 (CV = 1,14%)

X : Sans réaction après 45 cycles d'amplification en chaîne par polymérase.

Stabilité

La stabilité des ARN et ADN viraux dans les éluats générés à l'aide du kit EZ1 DSP Virus a été déterminée. Du plasma EDTA humain a été étudié en solution avec 1×10^3 IU/ml d'ARN du VHC AcroMetrix OptiQuant® et de matière standard Parvo B19 VQC. Par heure test et condition d'incubation, 18 réplicats ont été traités à l'aide du système EZ1 DSP Virus. Des éluats contenant de l'ADN du Parvo B19 et de l'ARN du VHC ont été incubés pendant six heures à 30°C, pendant 14 jours à 4°C, pendant 12 semaines à -20°C et pendant 9 mois à -80°C. L'étude est toujours en

cours. Les éluats ont été analysés à l'aide d'une analyse du VHC par RT-PCR validée en interne et de l'artus Parvo B19 RG PCR. Un échec de RT-PCR sur 18 réplicats a été observé pour l'ARN du VHC après un stockage à 4°C pendant 14 jours (Figure 4).

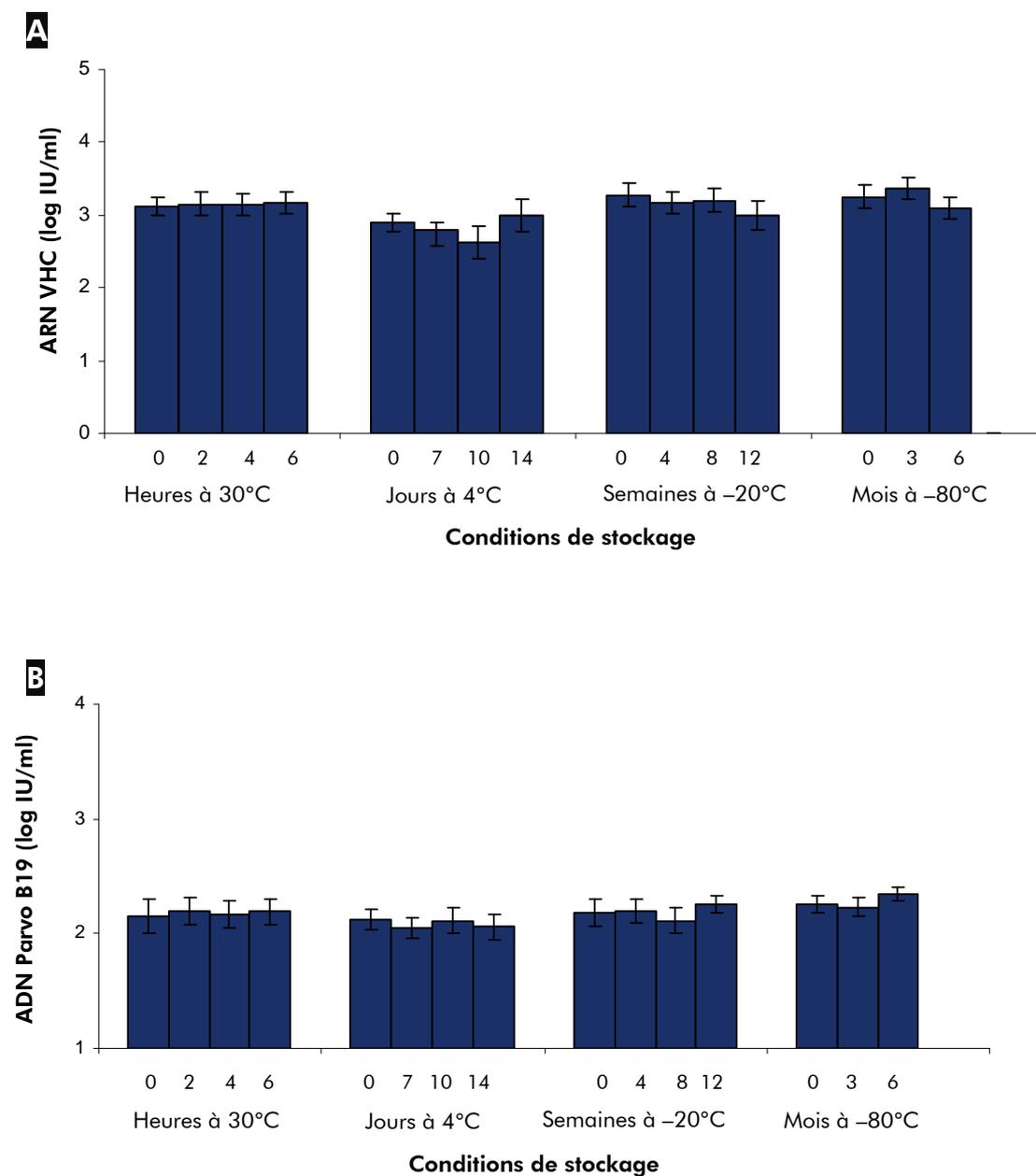


Figure 4. Stabilité des acides nucléiques viraux. La stabilité des ARN et ADN viraux dans les éluats générés à l'aide du kit EZ1 DSP Virus a été déterminée pour **A** l'ARN du VHC et **B** l'ADN du Parvo B19.

Reproductibilité

La reproductibilité a été déterminée à l'aide de trois postes de travail BioRobot EZ1 DSP utilisés trois jours différents (voir Tableau 1, ci-dessous). Pour chaque test (A–G), 12 réplicats ont été traités en deux cycles sur le BioRobot EZ1 DSP. Du plasma EDTA humain a été étudié en solution avec 1×10^4 IU/ml d'ARN du VHC AcroMetrix OptiQuant et 1×10^3 IU/ml d'ADN du VHB AcroMetrix OptiQuant. L'ADN du VHB a été déterminé à l'aide du kit *artus* HBV RG PCR et l'ARN du VHC à l'aide d'une analyse du VHC par RT-PCR validé en interne.

La procédure automatisée est hautement reproductible comme en témoignent les résultats comparables de la purification des acides nucléiques viraux sur trois appareils BioRobot EZ1 DSP distincts et sur trois jours différents (Figure 5).

Tableau 1. Préparation du test de reproductibilité

Préparation du test	Jour 1	Jour 2	Jour 3
BioRobot EZ1 DSP I	Test A	Test D	Test F
BioRobot EZ1 DSP II	Test B	Test E	
BioRobot EZ1 DSP III	Test C		Test G

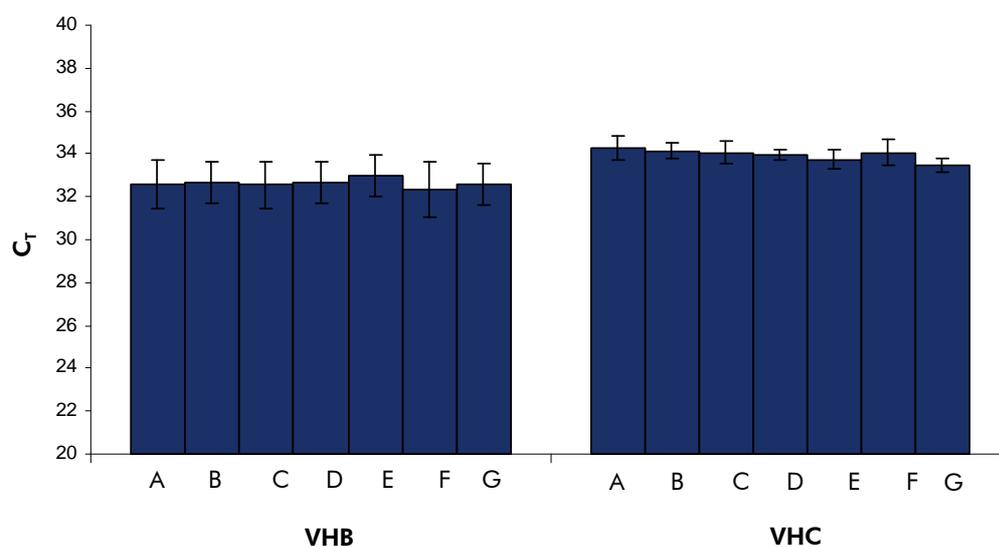


Figure 5. Reproductibilité. La reproductibilité a été déterminée sur trois appareils BioRobot EZ1 DSP distincts et sur trois jours différents.

Urine

La performance du système du kit EZ1 DSP Virus à utiliser avec des échantillons d'urine a été évaluée par comparaison avec du plasma au moyen de panels quantifiés de virus de CMV (virus d'ADN) et du VHC (virus d'ARN) dilués dans les échantillons respectifs. Les échantillons d'urine et de plasma ont été traités selon le manuel du kit EZ1 DSP Virus et des volumes d'échantillon équivalents ont été extraits au moyen du kit EZ1 DSP Virus. On a détecté des acides nucléiques viraux au moyen des kits *artus*[®] CMV RG PCR et *artus*[®] HCV RG RT-PCR. L'évaluation de la performance du kit EZ1 DSP Virus comparant l'urine et le plasma a révélé une différence de seulement ~2 % (à partir des valeurs C_T) pour le CMV et le VHC (tableau 9).

Tableau 9. Comparaison de la procédure de la procédure du kit EZ1 DSP Virus à utiliser avec des échantillons d'urine et de plasma

Type d'échantillon	n	Valeur CT	Ratio urine/plasma (Valeur CT)	Copies/ml	Ratio urine/plasma (Copies/ml)
CMV					
Urine	4	31,60	0,98	6,250	1,51
Plasma	5	32,17		4,130	
VHC					
Urine	4	37,83	1,02	278	0,77
Plasma	5	37,25		363	

Sang total

Plage linéaire

La plage linéaire du kit EZ1 DSP Virus a été évaluée en utilisant l'EBV comme virus d'ADN. Les tests ont été effectués avec des dilutions de panels de virus quantifiés réalisées dans du sang total humain non porteur de l'EBV. Des séries de dilutions avec six titres de virus différents ont été testées avec 4 réplicats chacune. Les acides nucléiques viraux ont été extraits d'échantillons de 200 µl (mélangés avec 200 µl de tampon ATL*) et élués dans le tampon d'éluion (AVE) de 60 µl. La plage linéaire de la procédure du kit EZ1 DSP Virus a été déterminée pour l'EBV avec le kit *artus*[®] EBV RG PCR sur l'appareil Rotor-Gene Q (figure 6).

*QIAGEN GmbH, réf. 939016

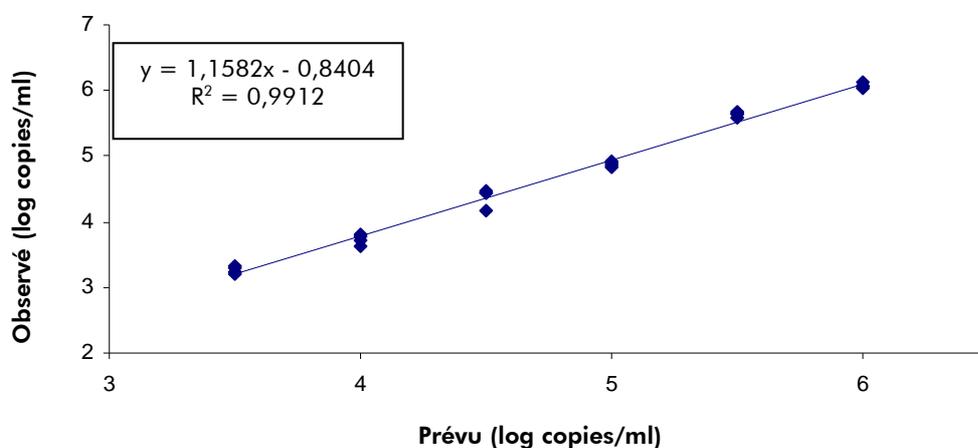


Figure 6. Plage linéaire des rendements au moyen du protocole du kit EZ1 DSP Virus associé à l'analyse du kit *artus*[®] EBV RG PCR pour extraction de l'EBV à partir de sang total.

Précision

Les écarts-types et coefficients de variation (CV) pour le sang total ont été déterminés pour le CMV au moyen du kit *artus*[®] CMV RG PCR sur l'appareil Rotor-Gene Q. Les données de précision inter-analyses sont représentées dans le tableau 10. Le sang total dérivé de 13 donneurs de sang a été testé dans 5 réplicats lors de cycles distincts sur l'EZ1 Advanced XL. Les acides nucléiques viraux ont été extraits d'échantillons de 200 µl (mélangés avec 200 µl de tampon ATL*) et élués dans le tampon d'éluion (AVE) de 120 µl.

*QIAGEN GmbH, réf. 939016

Tableau 10. Précision inter-analyses du protocole du kit EZ1 DSP Virus associé au kit artus® CMV RG PCR pour extraction du CMV à partir de sang total.

Donneur	n	Copies/ml	CV (%)	log copies/ml	SD (log copies/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

Fèces

Plage linéaire

La plage linéaire du kit EZ1 DSP Virus a été évaluée en utilisant l'adénovirus 5 comme virus d'ADN. Les tests ont été effectués en diluant 10 fois en série le surnageant de culture cellulaire des fèces non porteuses de l'adénovirus. Des séries de dilutions avec cinq dilutions de virus différentes ont été testées avec 10 réplicats chacune. Les acides nucléiques viraux ont été extraits d'échantillons de 200 µl (1:10 remis en suspension dans du tampon ASL*) et élués dans le tampon d'éluion (AVE) de 120 µl. La plage linéaire de la procédure du kit EZ1 DSP Virus a été déterminée en association avec l'analyse du kit Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, France, réf. 96-010B) sur l'appareil Rotor-Gene Q par comparaison avec une méthode d'extraction de référence (figure 7).

*QIAGEN GmbH, réf. 19082

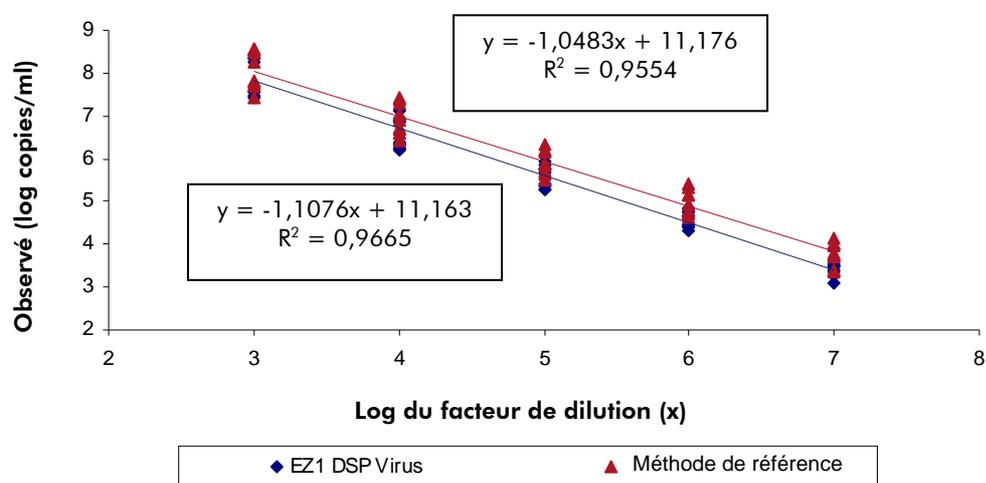


Figure 7. Plage linéaire des rendements au moyen du protocole du kit EZ1 DSP Virus associé à l'analyse du kit Adenovirus R-Gene™ PCR pour extraction de l'adénovirus 5 à partir des fèces.

Précision

Les écarts-types et coefficients de variation (CV) pour les fèces ont été déterminés pour l'adénovirus 5 au moyen de l'analyse du kit Adenovirus R-Gene™ PCR (Argene SA, France, réf. 96-010B) sur l'appareil Rotor-Gene Q. On a étudié des fèces non porteuses d'adénovirus 5 avec le surnageant de culture cellulaire et on a extrait de l'ADN viral à partir d'échantillons de 200 µl (1:10 remis en suspension dans du tampon ASL*) et élués dans le tampon d'éluion (AVE) de 120 µl. Sept cycles EZ1 avec 9 ou 10 réplicats chacun ont été lancés sur trois jours, avec trois appareils EZ1 Advanced XL et trois associations de lots de kits EZ1 DSP Virus/tampon ASL. Tous les échantillons ont été analysés au cours du même cycle de PCR. Les données de précision (tableau 11) ont été calculées en tenant compte des résultats de différents appareils, jours, lots et

de tous les cycles EZ1 ensemble (total).

*QIAGEN GmbH, réf. 19082

Tableau 11. Précision du protocole du kit EZ1 DSP Virus en association avec l'analyse du kit Adenovirus R-Gene™ PCR pour extraction d'adénovirus 5 des fèces

Cycle	n	Cop/ml	log cop/ml	SD (log cop/ml)	Intra-analyse	CV c/ml (%)			Total
						3 EZ1 Adv. XL	3 jours	3 lots	
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	–	–	–	–

Étude de corrélation

Une étude de corrélation a été menée pour la procédure du kit EZ1 DSP Virus par comparaison avec une méthode de référence pour extraction de norovirus du génogroupe II à partir de 66 échantillons patient de fèces. Les acides nucléiques viraux ont été extraits d'échantillons de 200 µl (1:10 remis en suspension dans du tampon ASL*) et élués dans le tampon d'éluion (AVE) de 120 µl. L'analyse a été réalisée avec un test interne RT-PCR par rapport au norovirus du génogroupe II (tableau 12).

*QIAGEN GmbH, réf. 19082

Tableau 12. Corrélation entre la procédure du kit EZ1 DSP Virus et une méthode de référence

EZ1 DSP Virus		Référence		Total
		Positif	Négatif	
	Positif	34	15	49
	Négatif	1	16	17
	Total	35	31	66

Milieux de transport

Plage linéaire

La plage linéaire du kit EZ1 DSP Virus a été évaluée en extrayant HSV-1 et *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) du milieu PreservCyt® (Cytoc Corporation, réf. 0200011). Les tests ont été effectués avec des dilutions de panels de virus quantifiés réalisées dans un milieu de transport. Des séries de dilutions avec six titres de virus différents ont été testées avec 5 ou 6 réplicats chacune. La plage linéaire du kit EZ1 DSP Virus a été déterminée par comparaison avec une méthode de référence avec le kit *artus*® HSV1/2 TM PCR et l'analyse *artus*® *C. trachomatis* TM PCR (figure 8). Les acides nucléiques viraux ont été extraits d'échantillons de 200 µl et élués dans le tampon d'éluion (AVE) de 90 µl.

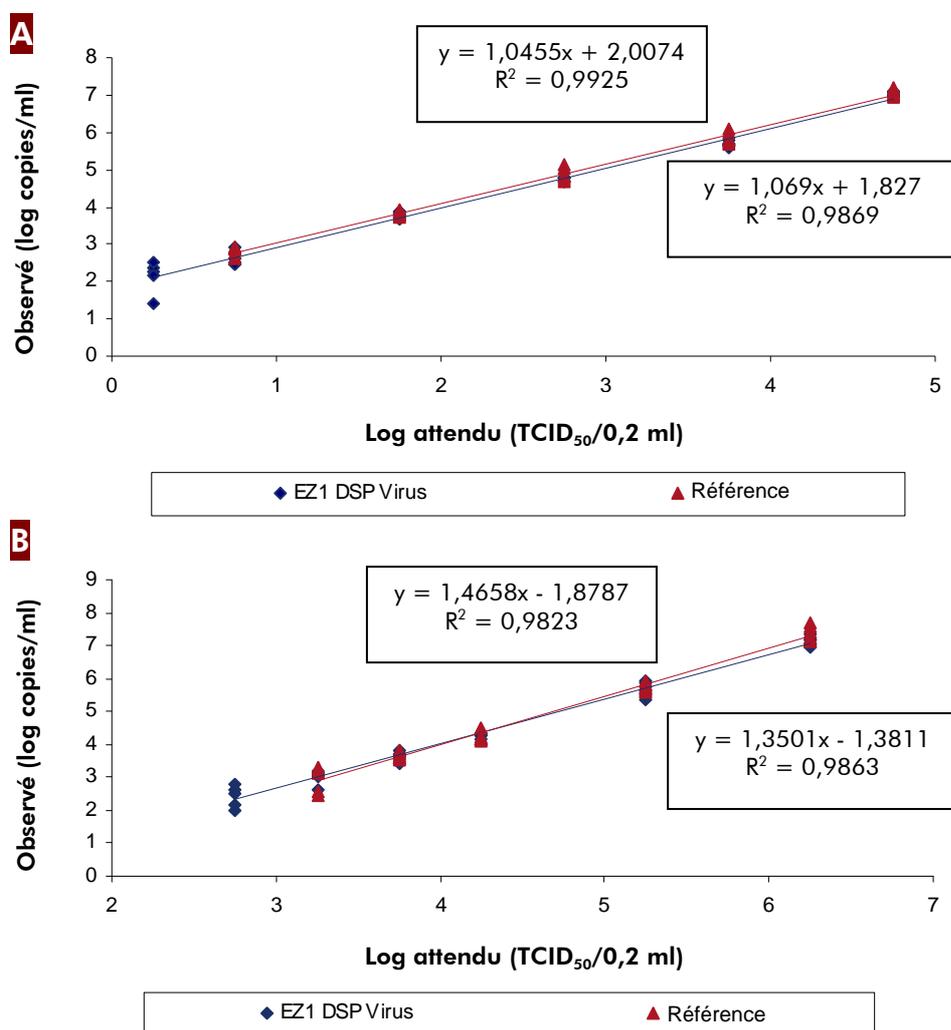


Figure 8. Plage linéaire des rendements au moyen du protocole du kit EZ1 DSP Virus associé au kit *artus*® *C. trachomatis* PCR (A) et à l'analyse *artus*® HSV1/2 TM TM PCR (B)

pour extraction de l'HSV-1 et de *C. trachomatis* à partir de milieu de transport. L'étude a été réalisée par comparaison avec une méthode de référence.

Précision

Les écarts-types et coefficients de variation (CV) pour le milieu de transport ont été déterminés pour l'HSV-1 et *C. trachomatis* au moyen du kit *artus*[®] HSV1/2 TM PCR et de l'analyse *artus*[®] *C. trachomatis* TM PCR. De l'ADN viral et bactérien a été extrait de milieux de 400 µl et élués dans le tampon d'éluion (AVE) de 60 µl. Cinq milieux de transport ont été extraits dans 12 réplicats chacun lors de 6 cycles EZ1, sur trois jours et avec 3 lots de kit EZ1 DSP Virus. Tous les échantillons ont été analysés au cours du même cycle de PCR. La précision intermédiaire pour *C. trachomatis* (tableau 13) et HSV-1 (tableau 14) a été calculée en tenant compte de tous les réplicats de chacun des milieux de transport (différents cycles EZ1, jours et lots).

Tableau 13. Précision du protocole du kit EZ1 DSP Virus associé au kit *artus*[®] *C. trachomatis* RG PCR pour extraction de *C. trachomatis* à partir de milieu de transport

Milieu	n	Log nominal TCID ₅₀ / 0,2 ml	Observé cop/ml	Précision intermédiaire CV cop/ml (%)	Observé log cop/ml	SD (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, réf. 5123-1220 ; ² Thermo Fisher Scientific Group, réf. R12505 ; ³ Cytoc Corp., réf. 0200011 ; ⁴ Becton, Dickinson and Company, réf. GYN-0001-V ; ⁵ Copan Diagnostics Inc., réf. 330C

Tableau 14. Précision du protocole du kit EZ1 DSP Virus associé au kit artus® HSV1/2 RG PCR pour extraction de HSV-1 à partir de milieux de transport

Milieu	n	Log nominal TCID ₅₀ / 0,2 ml	Observé cop/ml	Précision intermédiaire CV cop/ml (%)	Observé log cop/ml	SD (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, réf. 5123-1220 ; ² Thermo Fisher Scientific Group, réf. R12505 ; ³ Cytoc Corp., réf. 0200011 ; ⁴ Becton, Dickinson and Company, réf. GYN-0001-V ; ⁵ Copan Diagnostics Inc., réf. 330C

Performances cliniques (HPV)

Les aliquotes d'ADN purifiées à partir de 108 échantillons au total comprenant 50 échantillons porteurs de l'HC2 prélevés dans du STM, 50 échantillons porteurs de l'HC2 prélevés dans du PreservCyt® et 8 échantillons non porteurs de l'HC2 dans du STM ont été analysés par tests *digene*® HPV Genotyping RH (réf. 613413) et *digene*® HPV Genotyping LQ (réf. 613215) par comparaison avec le système Free University RLB*.

Les résultats ont été notés identiques (100 % de génotypes correspondants), compatibles (au moins un génotype en commun) ou discordants (pas de génotypes correspondants). Les différences (résultats de génotypage discordants) ont été résolus en répétant les deux analyses et, en cas de différences restantes, en procédant à une analyse ultérieure au moyen d'un troisième test sensible de détection et génotypage de l'HPV [SPF10-LiPA25 (version 1)].

Les résultats ont révélé un très faible niveau d'échantillons incompatibles (2 %) après résolution des premiers échantillons incompatibles pour les deux analyses de génotypage comparativement à la méthode de référence (tableau 15.)

Tableau 15. Comparaison des tests digene HPV Genotyping RH (A) et digene HPV Genotyping LQ avec le système Free University RLB* en suivant la procédure EZ1 DSP Virus pour extraction de l'HPV à partir de milieux de transport

Type de résultat	A % d'échantillons cliniques	B % d'échantillons cliniques
Identique	80	58
Compatible	18	12
Incompatible	2	2

* van den Brule, A. J., Pol R., Franssen-Daalmeije, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J., and Snijders, P. J. (2002) GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. J Clin Microbiol 40, 779.

Performances cliniques (grippe A)

Pour démontrer les performances cliniques, 102 échantillons nasopharyngés caractérisés par écouvillon prélevés dans de l'UTM (Copan Diagnostics Inc., réf. 330C) ont été évalués au moyen du kit EZ1 DSP Virus pour extraction d'acide nucléique. De l'ARN de grippe A a été détecté au moyen du kit *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR et du test Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR approuvé par l'EUA (tableau 16).

Tableau 16. Comparaison du kit *artus*[®] Inf. A H1N1 2009 LC RT-PCR et du test Focus Influenza A H1N1 (2009) Real-Time RT-PCR approuvé par l'EUA au moyen du kit EZ1 DSP Virus pour extraction de la grippe A saisonnière et du virus grippal H1N1 de 2009 à partir d'écouvillons nasopharyngés.

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

Écouvillons secs

Plage linéaire

La plage linéaire du kit EZ1 DSP Virus a été évaluée en extrayant l'HSV-1 et *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) des écouvillons en coton Puritan® (réf. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC). Les tests ont été effectués avec des dilutions de matière standard quantifiée. On a étudié de la salive humaine négative avec du matériel pathogène et on l'a transféré vers l'écouvillon. Après déshydratation, les pathogènes ont de nouveau été isolés de l'écouvillon sec par remise en suspension dans 600 µl de solution tampon ATL*. Des séries de dilutions avec six titres de virus différents ont été testées avec 5 ou 6 réplicats chacune. La plage linéaire du kit EZ1 DSP Virus a été déterminée par comparaison avec une méthode de référence avec le kit *artus*® HSV1/2 TM PCR et l'analyse *artus*® C. trachomatis TM PCR (figure 9). Les acides nucléiques viraux ont été extraits d'échantillons de 400 µl et élués dans 150 µl tampon d'éluion (AVE).

*QIAGEN GmbH, réf. 939016

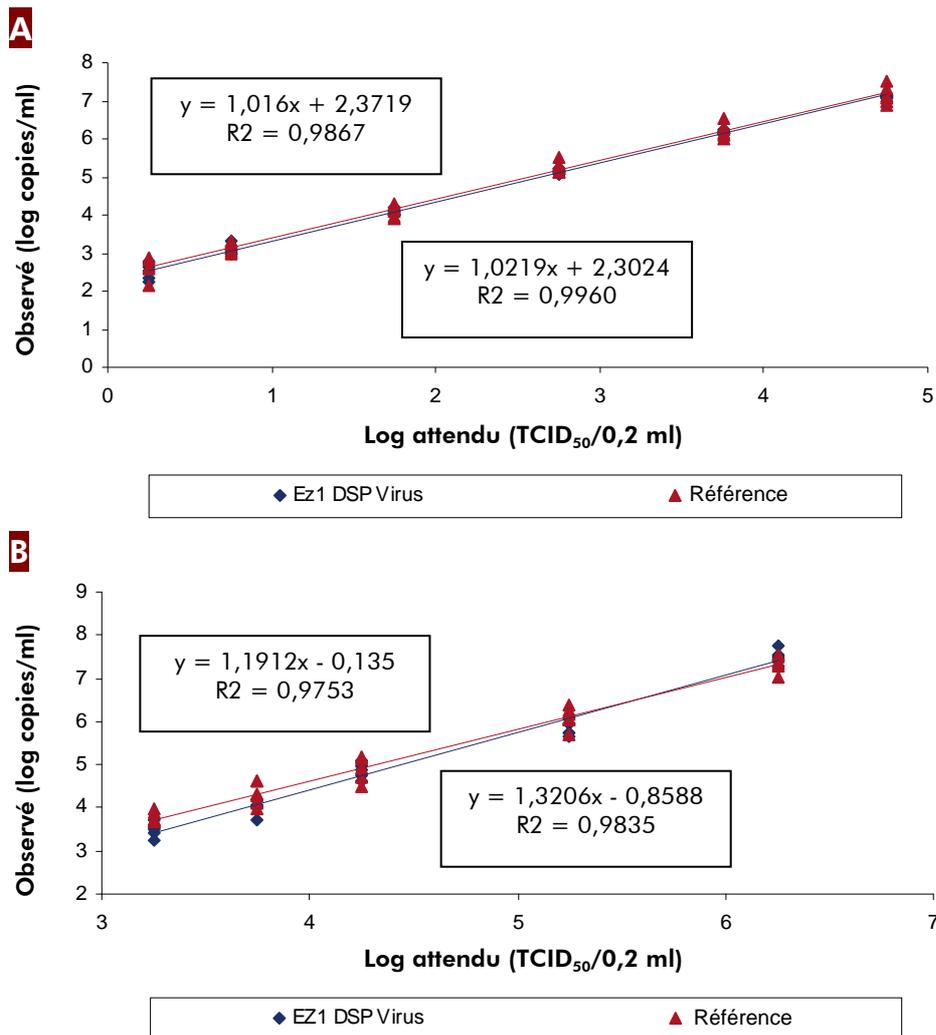


Figure 9. Plage linéaire des rendements au moyen du protocole du kit EZ1 DSP Virus associé au kit artus® C. trachomatis PCR (A) et à l'analyse artus® HSV1/2 TM TM PCR (B) pour extraction de C. trachomatis et de l'HSV-1 à partir d'écouvillons secs en coton. L'étude a été réalisée par comparaison avec une méthode de référence.

Précision

Les écarts-types et coefficients de variation (CV) pour les écouvillons secs ont été déterminés pour l'HSV-1 et *C. trachomatis* au moyen du kit artus® HSV1/2 TM PCR et de l'analyse artus® C. trachomatis TM PCR. Les écouvillons secs floqués Copan (réf. 502CS0, Copan Italia S.p.A.) et en coton Puritan (réf. 25-806 1PC, Puritan Medical Products Co. LLC) ont été préparés et prétraités comme décrit précédemment et de l'ADN viral et bactérien a été extrait à partir d'un volume d'échantillon de 400 µl, puis élués dans 60 µl de tampon d'éluion (AVE). On a procédé à l'extraction avec trois donneurs de salive dans 8 ou 9 réplicats chacun lors de 6 cycles EZ1, sur trois

jours et avec 3 lots de kit EZ1 DSP Virus/tampon ATL. Tous les échantillons ont été analysés au cours du même cycle de PCR. La précision intermédiaire pour *C. trachomatis* (tableau 17) et HSV1 (tableau 18) a été calculée en tenant compte de tous les réplicats de chaque donneur et type d'écouvillon (différents cycles EZ1, jours et lots).

Tableau 17. Précision du protocole du kit EZ1 DSP Virus associé au kit artus® C. trachomatis RG PCR pour extraction de C. trachomatis à partir d'écouvillons secs

Type d'écouvillon	Donneur	n	Log nominal TCID ₅₀ /0,2 ml	Observé cop/ml	Précision intermédiaire CV cop/ml (%)	Observé log cop/ml	SD (log copies/ml)
Écouvillons Puritan en coton	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
Écouvillons Copan floqués	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

Tableau 18. Précision du protocole du kit EZ1 DSP Virus associé au kit artus® HSV1/2 RG PCR pour extraction de HSV-1 à partir d'écouvillons secs

Type d'écouvillon	Donneur	n	Log nominal TCID ₅₀ /0,2 ml	Observé cop/ml	Précision intermédiaire CV cop/ml (%)	Observé log cop/ml	SD (log copies/ml)
Écouvillons Puritan en coton	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
Écouvillons Copan floqués	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

Échantillons respiratoires (crachat)

Étude de corrélation

Une étude de corrélation a été menée pour le kit EZ1 DSP Virus pour extraction de *Mycobacterium tuberculosis* à partir de crachat humain négatif. Une série de dilutions avec 4 titres de virus différents a été testée dans des réplicats simples par comparaison avec une méthode de référence. De l'ADN bactérien a été extrait de 200 μ l de crachat, prétraité avec du Sputasol (Oxoid Limited, réf. SR0233) et du lysozyme (Sigma-Aldrich, réf. L6876) comme décrit dans le manuel du kit EZ1 DSP Virus, version 4 et élué dans 90 μ l de tampon d'éluion (AVE). L'analyse a été réalisée avec le test artus[®] *M. tuberculosis* RG PCR (figure 10).

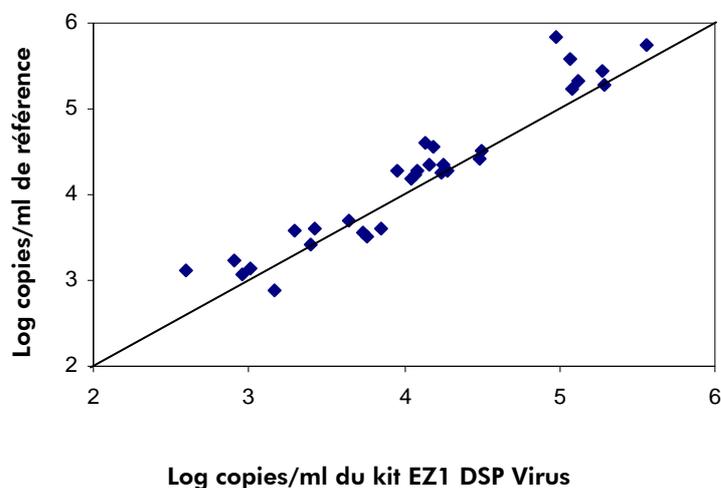


Figure 10. Corrélation entre la procédure du kit EZ1 DSP Virus et la méthode de référence

Pour obtenir des informations à jour et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consultez le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN respectifs. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Marques déposées: QIAGEN®, *artus*®, EZ1®, Rotor-Gene® (Groupe 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)

Février-11 © 2011 QIAGEN, tous droits réservés.

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