

Ottobre 2015

Kit *artus*[®] VZV QS- RGQ: Caratteristiche delle prestazioni

artus VZV QS-RGQ Kit, versione 1

REF

4502363



Prima di eseguire il test verificare la disponibilità di nuove revisioni delle etichette elettroniche nel sito www.qiagen.com/products/artusvzvpcrkitce.aspx. Lo stato della revisione è indicato dalla data di rilascio (formato: mese/anno).

Sensibilità analitica – FCS

Il limite di rilevabilità analitica, tenendo conto della purificazione (limite di sensibilità), è stato calcolato per il kit *artus* VZV QS-RGQ utilizzando campioni clinici VZV-positivi in combinazione con l'estrazione sul QIAAsymphony® SP.

La sensibilità analitica, tenendo conto della purificazione, è stata determinata per il kit *artus* VZV QS-RGQ, utilizzando una serie di diluizioni del ceppo Ellen di VZV da 1420 copie al valore nominale di 4,5 copie di VZV/ml, aggiunte a campioni clinici di FCS. I campioni sono stati sottoposti ad estrazione del DNA con il kit QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini in combinazione con il protocollo Cellfree200_DSP (volume di estrazione: 0,2 ml, volume di eluizione: 60 µl). Ciascuna delle 8 diluizioni è stata analizzata con il kit *artus* VZV QS-RGQ in 3 giorni diversi nell'ambito di 3 sedute con 11 replicati ciascuna. I risultati sono stati determinati mediante un'analisi probit. La Figura 1 illustra graficamente l'analisi probit. Il limite di rilevabilità analitica del kit *artus* VZV QS-RGQ, tenendo conto della purificazione in combinazione con il Rotor-Gene Q, è di 80,67 copie/ml ($p = 0,05$). Ciò significa che esiste una probabilità del 95% che vengano rilevate 80,67 copie/ml.

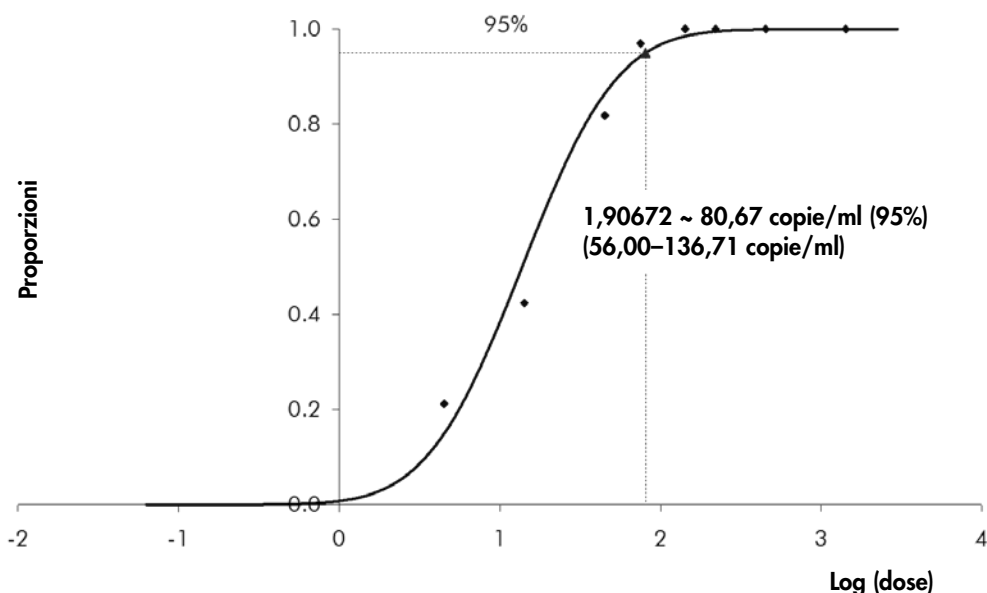


Figura 1. Analisi probit: FCS, VZV (Rotor-Gene Q). Sensibilità analitica, tenendo conto della purificazione (kit QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini), del kit *artus* VZV QS-RGQ sul Rotor-Gene Q.

Specificità – FCS

La specificità del kit *artus* VZV QS-RGQ è garantita in primo luogo dalla selezione dei primer e delle sonde, e poi dalla selezione di condizioni di reazione stringenti. I primer e le sonde sono stati controllati per accertare eventuali omologie con tutte le sequenze pubblicate nelle banche genetiche mediante analisi comparativa delle sequenze. È stata così assicurata la rilevabilità di tutti i genotipi rilevanti.

Inoltre, la specificità è stata convalidata con 30 diversi campioni di FCS VZV-negativi. Tali campioni non hanno generato segnali con i primer e le sonde specifici per VZV, inclusi nel VZV RG Master.

È stata rilevata una potenziale cross-reattività del kit *artus* VZV QS-RGQ utilizzando il gruppo di controllo elencato nella Tabella 1. Nessuno degli agenti patogeni testati è risultato reattivo. Non sono state riscontrate cross-reattività con infezioni miste.

Tabella 1. Analisi della specificità del kit con patogeni potenzialmente cross-reattivi (FCS)

| Gruppo di controllo | VZV (Cycling Green, ciclo verde) | Controllo interno (Cycling Orange, ciclo arancione) |
|---|---|--|
| Virus dell'herpes umano 1 (virus herpes simplex 1) | - | + |
| Virus dell'herpes umano 2 (virus herpes simplex 2) | - | + |
| Virus dell'herpes umano 4 (virus di Epstein-Barr) | - | + |
| Virus dell'herpes umano 5 (citomegalovirus) | - | + |
| Virus dell'herpes umano 6A | - | + |
| Virus dell'herpes umano 6B | - | + |
| Virus dell'herpes umano 7 | - | + |
| Virus dell'herpes umano 8 (virus dell'herpes associato al sarcoma di Kaposi) | - | + |
| Virus dell'epatite A | - | + |
| Virus dell'epatite B | - | + |
| Virus dell'epatite C | - | + |
| Virus dell'immunodeficienza umana 1 | - | + |
| Virus umano di tipo 1 della leucemia dei linfociti T | - | + |
| Virus umano di tipo 2 della leucemia dei linfociti T | - | + |
| Enterovirus | - | + |
| Parvovirus B19 | - | + |
| Virus del Nilo occidentale | - | + |

Range lineare – FCS

Il range lineare del kit *artus* VZV QS-RGQ, tenendo conto della purificazione, è stato determinato analizzando una serie di diluizioni del ceppo Ellen di VZV ATCC® VR-1367 da $1,00 \times 10^8$ copie/ml a $5,00 \times 10^1$ copie/ml. La purificazione è stata eseguita in replicati ($n = 4$ per concentrazioni $\geq 1,00 \times 10^7$ copie/ml; $n = 8$ per concentrazioni $< 1,00 \times 10^7$ copie/ml) utilizzando il kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini in combinazione con il protocollo Cellfree200_DSP (volume di estrazione: 0,2 ml, volume di eluizione: 60 μ l). Ogni campione è stato analizzato con il kit *artus* VZV QS-RGQ. Il range lineare del kit *artus* VZV QS-RGQ, tenendo conto della purificazione, è stato determinato per coprire le concentrazioni da $5,00 \times 10^2$ copie/ml a $1,00 \times 10^8$ copie/ml (Figura 2).

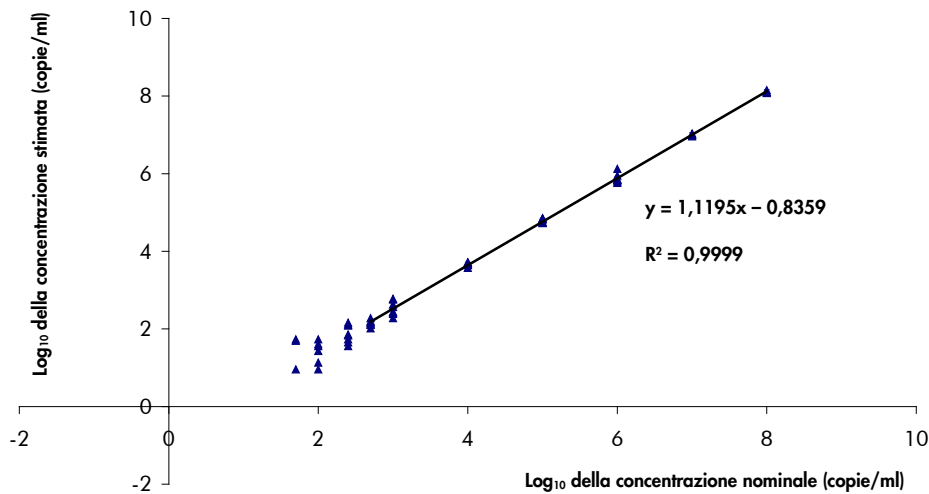


Figura 2. Range lineare del kit *artus* VZV QS-RGQ (FCS). Calcolo del range lineare. La linea retta è stata determinata mediante una regressione lineare del \log_{10} delle concentrazioni calcolate con il \log_{10} delle concentrazioni nominali. La figura mostra l'equazione della linea di regressione.

Robustezza – FCS

La verifica della robustezza consente la determinazione del tasso globale d'errore del kit *artus* VZV QS-RGQ. Per verificare la robustezza, 30 campioni di FCS VZV-negativi sono stati arricchiti con 300 copie/ml di VZV (concentrazione pari all'incirca a tre volte il limite di sensibilità analitica). In seguito ad estrazione del DNA con il kit QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini in combinazione con il protocollo Cellfree200_DSP (volume di estrazione: 0,2 ml, volume di eluizione: 60 µl), i campioni sono stati analizzati con il kit *artus* VZV QS-RGQ.

Inoltre, la robustezza del controllo interno è stata calcolata mediante purificazione e analisi dei 30 campioni di FCS arricchiti. Non sono state osservate inibizioni. La robustezza del kit *artus* VZV QS-RGQ è pari al $\geq 99\%$.

Sostanze interferenti – FCS

Eritrociti e DNA genomico sono sostanze endogene che possono interferire con il test se presenti nel FCS. Per studiarne la potenziale interferenza è stato valutato il loro effetto sulle prestazioni del test analizzando campioni di FCS contenenti VZV a concentrazioni pari a circa 10 volte il limite di rilevabilità (LOD) (1.000 copie/ml). Le sostanze analizzate non hanno mostrato alcuna interferenza con i reagenti del kit *artus* VZV QS-RGQ (vedere Tabella 2).

Tabella 2. Sostanze interferenti in campioni di FCS

| Concentrazione di VZV (copie/ml) | Sostanza interferente | | $C_{T(IC)}$ | | | $C_{T(IC)IS} - C_{T(IC)Controllo}$ |
|----------------------------------|-----------------------|----------------|-------------|------|--------|------------------------------------|
| | Elemento | Concentrazione | C_T medio | DS | CV (%) | Assoluto |
| 1000 | Eritrociti | – | 23,45 | 0,06 | 0,24 | 0,13 |
| | gDNA | 10.000 | 23,51 | 0,02 | 0,09 | 0,07 |
| | gDNA | 100.000 | 23,78 | 0,11 | 0,45 | 0,20 |
| | Controllo | – | 23,58 | 0,06 | 0,26 | – |

CV: coefficiente di variazione; IC: controllo interno; IS: sostanza interferente; SD: deviazione standard

Valutazione clinica – FCS

Le prestazioni cliniche del kit *artus* VZV QS-RGQ sono state valutate utilizzando un totale di 163 campioni artificiali e analizzando i relativi riscontri rispetto ai risultati ottenuti con un metodo confrontabile presso un laboratorio clinico esterno. I risultati sono stati analizzati in due parti: per la parte uno si è trattato di un'analisi categorica di Concordanza Percentuale di Positività (PPA), Concordanza Percentuale di Negatività (NPA) e Concordanza Percentuale Complessiva (OPA); nella parte due è stata condotta un'analisi dei risultati su un totale di 75 campioni di FCS che rientravano entro l'intervallo dinamico comune del test utilizzando le analisi di regressione di Deming e Passing-Bablok, riportando i risultati assieme alla corrispondente intercetta e pendenza (vedere Tabella 3 e Figura 3).

Tabella 3. Dati dello studio sulle prestazioni cliniche per campioni di plasma trattati con EDTA

| Misura della concordanza | Frequenze | Concordanza percentuale | Limite inferiore di confidenza bilaterale al 95% binomiale di Clopper-Pearson (esatto) | Limite superiore di confidenza bilaterale al 95% binomiale di Clopper-Pearson (esatto) |
|---------------------------------------|-----------|-------------------------|--|--|
| Concordanza percentuale totale | 163/163 | 100,00 | 97,76 | 100,00 |
| Concordanza percentuale di positività | 100/100 | 100,00 | 96,38 | 100,00 |
| Concordanza percentuale di negatività | 63/63 | 100,00 | 94,31 | 100,00 |

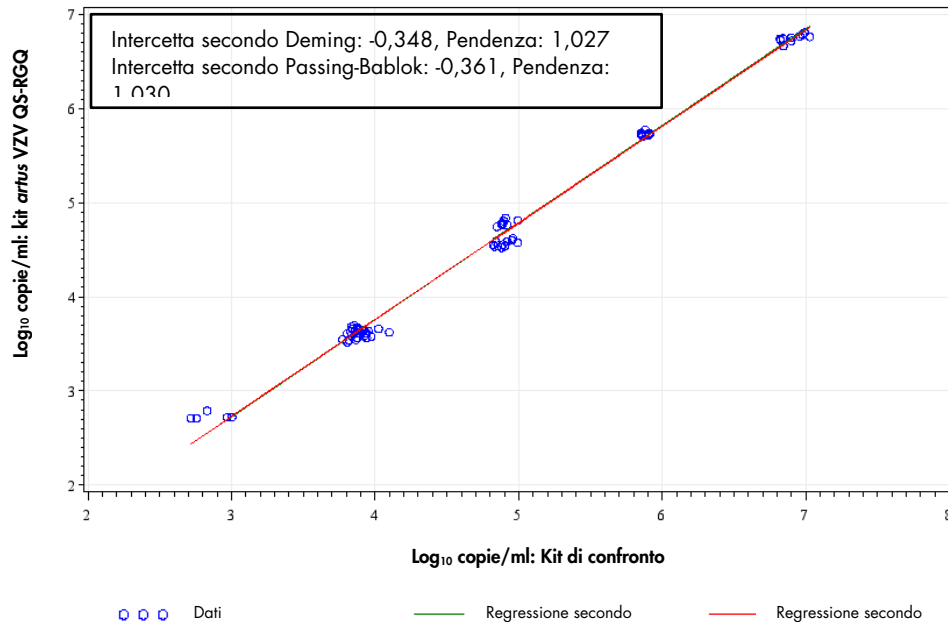


Figura 3. Grafico della regressione con rette di Passing-Bablok e Deming per campioni di FCS. Nell'analisi sono stati inclusi campioni compresi tra il limite inferiore e il limite superiore di quantificazione per entrambi i kit.

Il grafico di Bland-Altman nella Figura 4 mostra che la differenza logaritmica media approssimativa fra i kit è pari a 0,22 e che tale differenza non è influenzata dalla concentrazione di analisi.

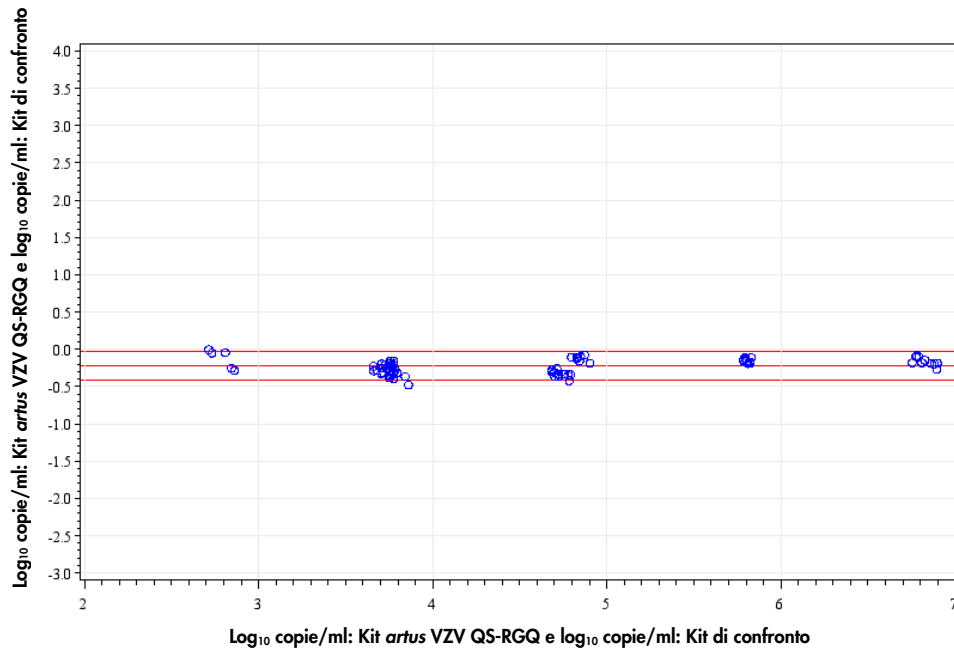


Figura 4. Grafico di Bland-Altman (plasma). Le rette orizzontali di riferimento sono in -0,22, -0,42 e -0,03 e denotano la differenza media (\log_{10} copie/ml: kit *artus* VZV QS-RGQ – \log_{10} copie/ml: kit di confronto) e il corrispondente intervallo di predizione al 95%. Nell'analisi sono stati inclusi campioni compresi tra il limite inferiore e il limite superiore di quantificazione per entrambi i kit.

Sensibilità analitica – plasma

Per il plasma, la sensibilità analitica del kit *artus* VZV QS-RGQ, tenendo conto della purificazione, è stata calcolata utilizzando una serie di diluizioni del materiale virale aggiunte al plasma umano, precisamente da 100 a 0,316 copie/ml.

I campioni sono stati sottoposti ad estrazione del DNA con il kit QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi in combinazione con il protocollo Cellfree1000_DSP (volume di estrazione: 1 ml, volume di eluizione: 60 μ l). Ciascuna delle 8 diluizioni è stata analizzata con il kit *artus* VSV QS-RGQ in 4 giorni diversi nell'ambito di 4 sedute con 11 replicati ciascuna. I risultati sono stati determinati mediante un'analisi probit.

La Figura 5 illustra graficamente l'analisi probit. Il limite di rilevabilità analitica per il VZV del kit *artus* VZV QS-RGQ, tenendo conto della purificazione in combinazione con il Rotor-Gene Q, è di 12,725 copie/ml ($p = 0,05$). Ciò significa che esiste una probabilità del 95% che vengano rilevate 12,725 copie/ml.

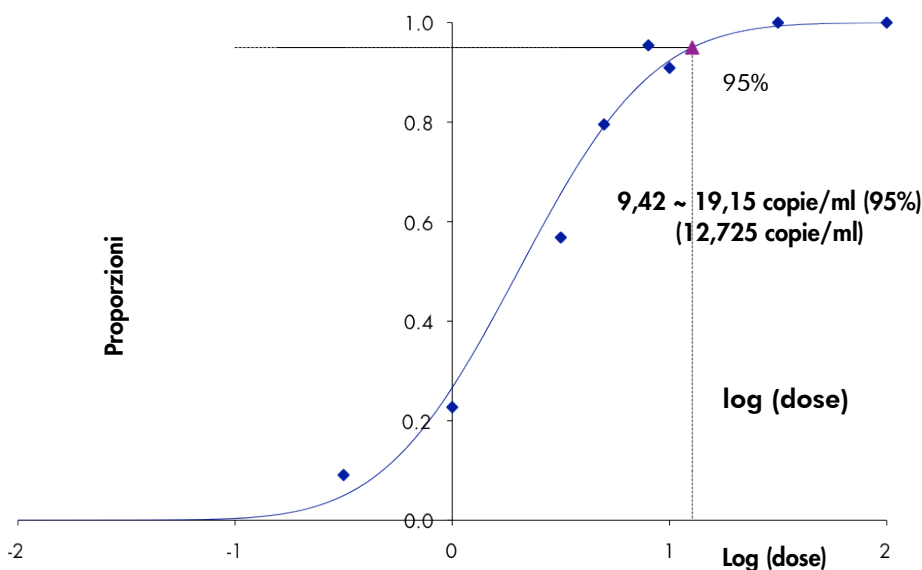
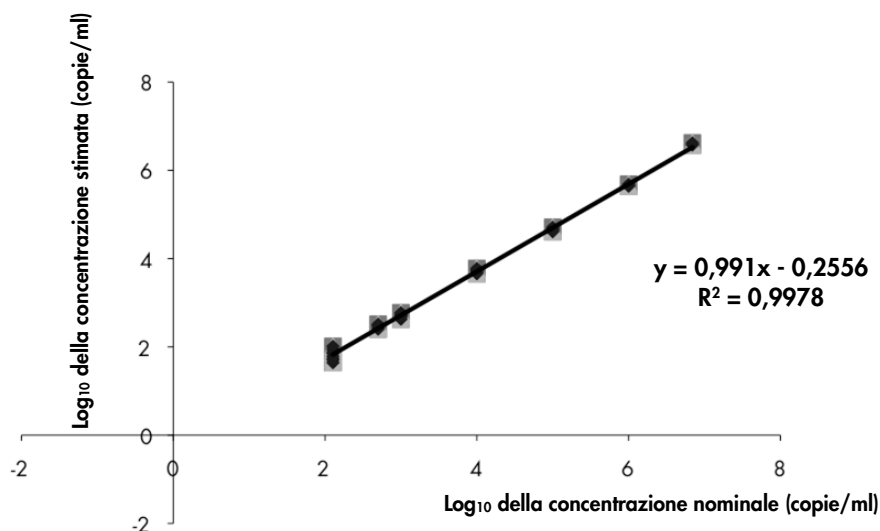


Figura 5. Analisi probit: plasma, VZV (Rotor-Gene Q). Sensibilità analitica, tenendo conto della purificazione (utilizzando il kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi) del kit *artus* VZV QS-RGQ sul Rotor-Gene Q.

Range lineare – plasma

Il range lineare del kit *artus* VZV QS-RGQ, tenendo conto della purificazione, è stato determinato analizzando una serie di diluizioni del materiale virale nel plasma, da $6,92 \times 10^6$ copie/ml a $1,0 \times 10^1$ copie/ml. La purificazione è stata eseguita in replicati ($n = 4$ per concentrazioni $\geq 1,00 \times 10^6$ copie/ml; $n = 8$ per concentrazioni $< 1,00 \times 10^6$ copie/ml) utilizzando il kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi in combinazione con il protocollo Cellfree1000_DSP (volume di estrazione: 1 ml, volume di eluizione: 60 μ l). Ogni campione è stato analizzato con il kit *artus* VZV QS-RGQ.

Nel plasma, il range lineare del kit *artus* VZV QS-RGQ per VZV, tenendo conto della purificazione, è stato determinato per coprire le concentrazioni da 127 copie/ml a $6,92 \times 10^6$ copie/ml (Figura 6).



)]

Figura 6. Range lineare del kit *artus* VZV QS-RGQ (plasma). Calcolo del range lineare. La linea retta è stata determinata mediante una regressione lineare del log₁₀ delle concentrazioni calcolate con il log₁₀ delle concentrazioni nominali. La figura mostra l'equazione della linea di regressione.

Robustezza – plasma

La verifica della robustezza nel plasma consente la determinazione del tasso globale d'errore del kit *artus* VZV QS-RGQ. Per verificare la robustezza, 30 campioni di plasma VZV-negativi sono stati arricchiti con 38,175 copie/ml di VZV (concentrazione pari all'incirca a tre volte il limite di sensibilità analitica). In seguito ad estrazione del DNA con il kit QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi in combinazione con il protocollo Cellfree1000_DSP (volume di estrazione: 1 ml, volume di eluizione: 60 µl), i campioni sono stati analizzati con il kit *artus* VZV QS-RGQ. Per quanto concerne la robustezza nelle analisi del bersaglio VZV, tutti i campioni (30/30) sono risultati positivi per VZV.

Inoltre, la robustezza del controllo interno è stata valutata dopo purificazione e analisi dei 116 campioni di plasma arricchiti. Questi campioni sono risultati completamente negativi per VZV e completamente positivi per il controllo interno. Non sono state osservate inibizioni. La robustezza del kit *artus* VZV QS-RGQ è pari al $\geq 99\%$.

Sostanze interferenti – plasma

Quattro sostanze endogene (bilirubina, emoglobina, trigliceridi e proteina albumina) a concentrazioni elevate sono state identificate come potenzialmente interferenti se presenti nei campioni di plasma. È stato valutato il loro effetto nel plasma contenente VZV a concentrazioni pari a circa 10 volte il valore LOD (127,25 copie/ml). Come controllo sono stati inclusi campioni di plasma arricchiti con VZV senza l'aggiunta di sostanze interferenti. Tutti i campioni, con o senza sostanze interferenti, sono stati analizzati in 4 replicati utilizzando il kit QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi in combinazione con il protocollo Cellfree1000_DSP (volume di estrazione: 1 ml, volume di eluizione: 60 µl). Per i campioni contenenti livelli elevati di inibitori endogeni (bilirubina, emoglobina, trigliceridi e proteina albumina) non sono state osservate interferenze sul rilevamento di VZV.

Valutazione clinica – plasma

Le prestazioni cliniche del kit *artus* VZV QS-RGQ sono state valutate utilizzando un totale di 161 campioni di plasma artificiale trattati con EDTA e analizzando i relativi riscontri rispetto ai risultati ottenuti con un metodo confrontabile presso un laboratorio esterno. I risultati sono stati analizzati in due parti: per la parte uno si è trattato di un'analisi categorica di Concordanza Percentuale di Positività (PPA), Concordanza Percentuale di Negatività (NPA) e Concordanza Percentuale Complessiva (OPA); nella parte due è stata condotta un'analisi dei risultati su un totale di 97 campioni di plasma trattati con EDTA che rientravano entro l'intervallo dinamico comune del test utilizzando le analisi di regressione di Deming e Passing-Bablok, riportando i risultati assieme alla corrispondente intercetta e pendenza (vedere Tabella 4 e Figura 7).

Tabella 4. Dati dello studio sulle prestazioni cliniche per campioni di plasma trattati con EDTA

| Misura della concordanza | Frequenze | Concordanza percentuale | Limite inferiore di confidenza bilaterale al 95% binomiale di Clopper-Pearson (esatto) | Limite superiore di confidenza bilaterale al 95% binomiale di Clopper-Pearson (esatto) |
|---------------------------------------|-----------|-------------------------|--|--|
| Concordanza percentuale totale | 161/161 | 100,00 | 97,73 | 100,00 |
| Concordanza percentuale di positività | 101/101 | 100,00 | 96,41 | 100,00 |
| Concordanza percentuale di negatività | 60/60 | 100,00 | 94,04 | 100,00 |

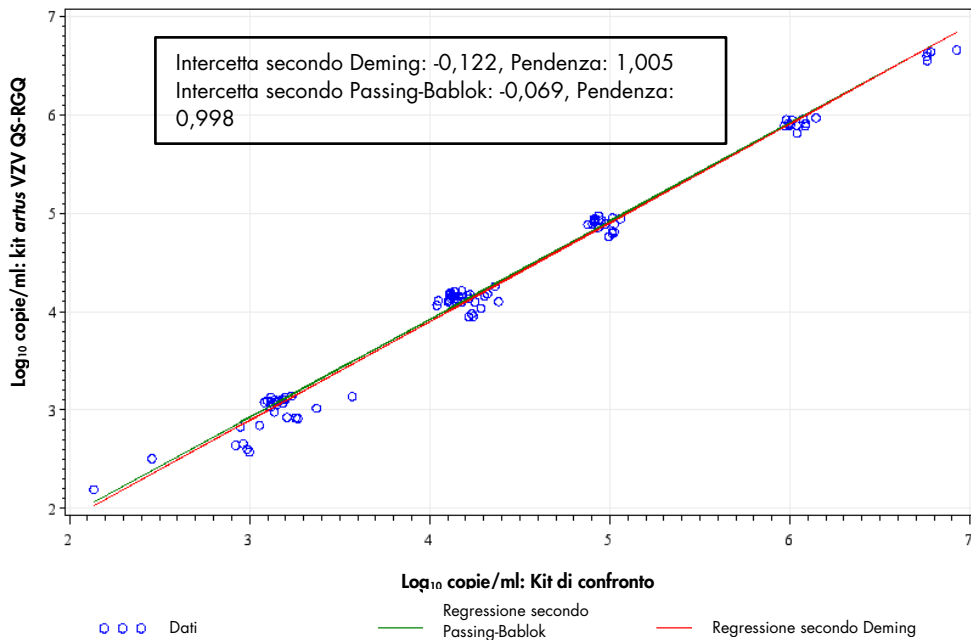


Figura 7. Grafico della regressione con rette di Passing-Bablok e Deming per campioni di plasma. Nell'analisi sono stati inclusi campioni compresi tra il limite inferiore e il limite superiore di quantificazione per entrambi i kit.

Il grafico di Bland-Altman nella Figura 8 mostra che la differenza logaritmica media approssimativa fra i kit è pari a -0,10 e che tale differenza non è influenzata dalla concentrazione di analisi.

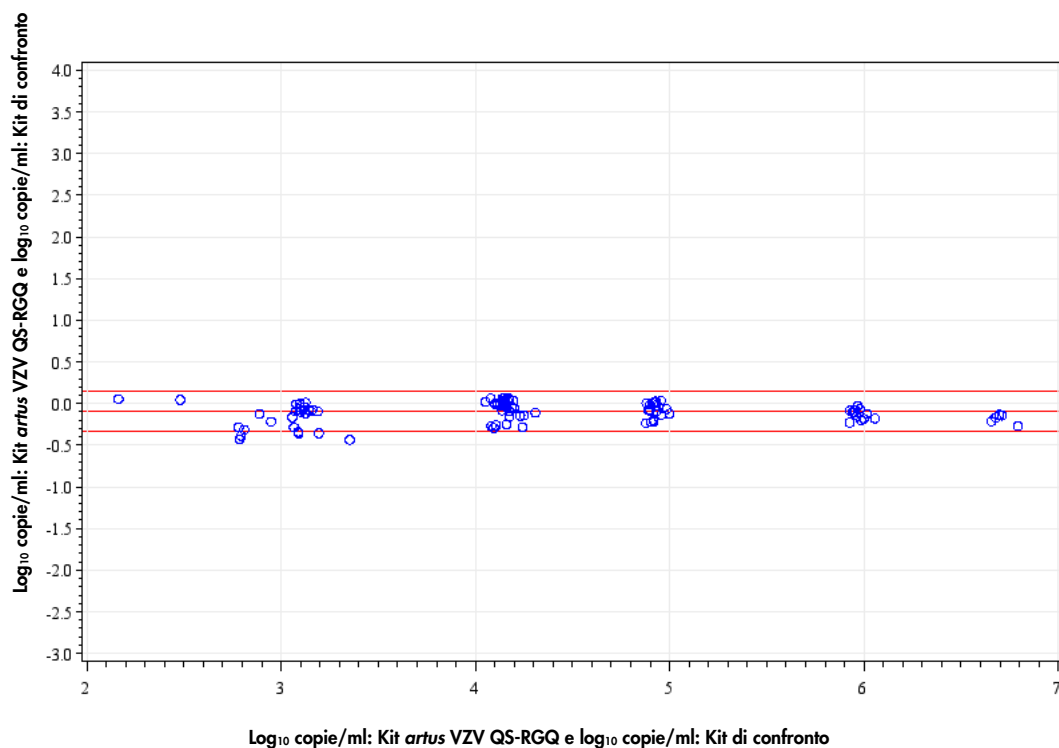


Figura 8. Grafico di Bland-Altman (plasma). Le rette orizzontali di riferimento sono in -0,10, -0,34 e 0,14 e denotano la differenza media (\log_{10} copie/ml: Kit *artus* VZV QS-RGQ – \log_{10} copie/ml: kit di confronto) e il corrispondente intervallo di predizione al 95%. Nell'analisi sono stati inclusi campioni compresi tra il limite inferiore e il limite superiore di quantificazione per entrambi i kit.

Precisione

I dati sulla precisione del kit *artus* VZV QS-RGQ consentono la determinazione della varianza totale del test. La varianza totale è composta dalla variabilità intra-test (variabilità di risultati multipli di campioni con la stessa concentrazione in uno stesso esperimento), dalla variabilità inter-test (variabilità di risultati multipli del test generati su strumenti differenti dello stesso tipo da operatori differenti in uno stesso laboratorio) e dalla variabilità inter-lotto (variabilità di risultati multipli del test ottenuti con lotti diversi). I dati ottenuti sono stati utilizzati per determinare la deviazione standard, la varianza e il coefficiente di variazione per il patogeno specifico e il controllo interno di PCR.

I dati sulla precisione analitica del kit *artus* VZV QS-RGQ (senza tenere conto della purificazione) sono stati raccolti utilizzando lo standard di quantificazione della concentrazione più bassa (QS 4; 10 copie/ μ l). I test sono stati effettuati con 8 replicati. I dati sulla precisione sono stati calcolati sulla base dei valori C_T delle curve di amplificazione (C_T : ciclo soglia, vedi Tabella 2). Inoltre, i dati di precisione per i risultati quantitativi in copie/ μ l sono stati stabiliti utilizzando i corrispondenti valori C_T (Tabella 3). Sulla base di questi risultati, lo scarto statistico generale di un dato campione alla concentrazione menzionata è

pari a 0,45% (C_T) o 8,32% (concentrazione), e a 2,81% (C_T) per il rilevamento del controllo interno. Questi valori si basano sulla totalità dei singoli valori delle variabilità stabilite.

Tabella 5. Dati sulla precisione per VZV basati sui valori C_T

| | Deviazione standard | Varianza | Coefficiente di variazione (%) |
|---|----------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| Variabilità intra-assay: VZV QS 4 | 0,08 | 0,01 | 0,26 |
| Variabilità intra-assay: Controllo interno | 0,04 | 0,002 | 0,17 |
| Variabilità inter-assay: VZV QS 4 | 0,15 | 0,02 | 0,50 |
| Variabilità inter-assay: Controllo interno | 0,39 | 0,15 | 1,63 |
| Variabilità inter-lotto: VZV QS 4 | 0,10 | 0,01 | 0,34 |
| Variabilità inter-lotto: Controllo interno | 0,66 | 0,43 | 2,65 |
| Varianza totale: VZV QS 4 | 0,13 | 0,02 | 0,45 |
| Varianza totale: Controllo interno | 0,68 | 0,47 | 2,81 |

Tabella 6. Dati sulla precisione per VZV basati sui risultati quantitativi (in copie/ml)

| | Deviazione standard | Varianza | Coefficiente di variazione (%) |
|--------------------------------------|----------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| Variabilità intra-assay: VZV QS 4 | 0,50 | 0,25 | 5,46 |
| Variabilità inter-assay: VZV QS 4 | 0,85 | 0,72 | 8,72 |
| Variabilità inter-lotto: VZV QS 4 | 0,75 | 0,56 | 7,67 |
| Varianza totale: VZV QS 4 | 0,81 | 0,66 | 8,32 |

Riproducibilità

I dati di riproducibilità consentono una regolare valutazione delle prestazioni del kit *artus* VZV QS-RGQ, nonché un confronto di efficacia con altri prodotti. Questi dati sono ottenuti dalla partecipazione a programmi di valutazione consolidati.

Cross-contaminazione

L'assenza di cross-contaminazione fra i campioni per l'intero flusso di lavoro è stata dimostrata dal corretto rilevamento di tutti i campioni positivi e negativi in posizioni alternate (modello a scacchiera) per un sistema *artus* QS-RGQ rappresentativo.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente.

I prodotti correlati e le informazioni per l'ordine sono elencati nel manuale del kit *artus* VZV QS-RGQ.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN®. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, *artus*®, Rotor-Gene® (Gruppo QIAGEN); ATCC®, VR-1367™ (American Type Culture Collection).
I marchi, i nomi registrati ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non contrassegnati specificamente come tali, vanno considerati protetti dalla legge 10/2015 HB-0401-D01-002
© 2012-2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati

Ordini www.qiagen.com/contact | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com
