

Febbraio 2018

artus[®] CMV QS-RGQ Kit: Caratteristiche prestazionali

R4

IVD

CE
0197

REF

4503363, artus CMV QS-RGQ Kit, versione 1.



Prima di eseguire il test verificare la disponibilità di nuove revisioni delle etichette elettroniche sul sito www.qiagen.com/products/artuscmvpcrkitce.aspx.

Limite di rilevabilità – plasma

Il limite di rilevabilità (Limit of detection, LOD), tenendo conto della purificazione (limite di sensibilità), è stato calcolato per l'*artus* CMV QS-RGQ Kit utilizzando campioni clinici CMV-positivi in combinazione con l'estrazione sul QIAAsymphony® SP.

Per il plasma, il LOD dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit (tenendo conto della purificazione) è stato determinato utilizzando una serie di diluizioni del virus CMV da 1000 copie al valore nominale di 0,316 copie di CMV/ml, aggiunte ai campioni clinici di plasma. I campioni sono stati sottoposti ad estrazione del DNA con il QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit in combinazione con il protocollo Cellfree1000_DSP (volume di estrazione: 1 ml, volume di eluizione: 60 µl). Ciascuna delle 10 diluizioni è stata analizzata con l'*artus* CMV QS-RGQ Kit in 4 giorni diversi nell'ambito di 4 sedute con 8 replicati ciascuna. I risultati sono stati determinati mediante un'analisi probit. La Figura 1 illustra graficamente l'analisi probit. Il LOD dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit, tenendo conto della purificazione in combinazione con il Rotor-Gene Q, è di 42,5 copie/ml ($p = 0,05$). Ciò significa che esiste una probabilità del 95% che vengano rilevate 42,5 copie/ml (corrispondenti a 69,7 UI/ml).

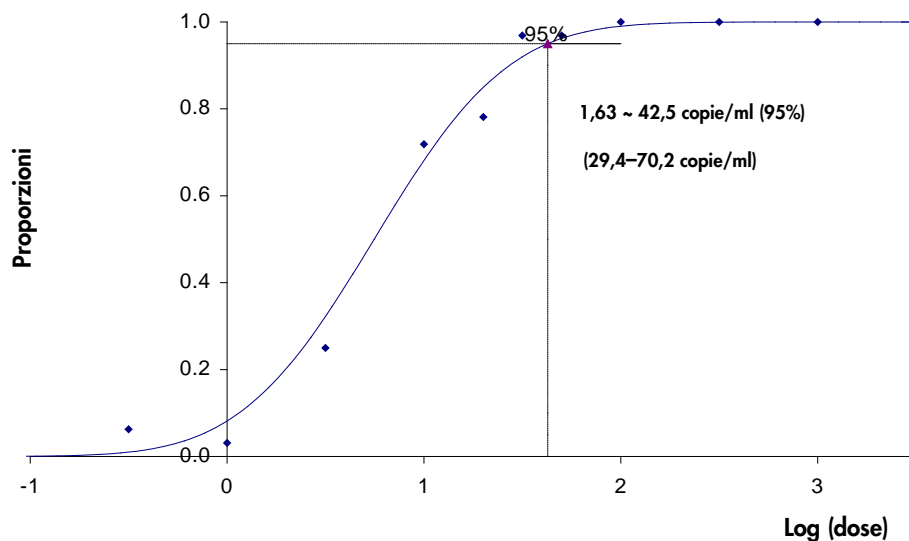


Figura 1. Analisi probit: plasma, CMV (Rotor-Gene Q). Limite di rilevabilità, tenendo conto della purificazione (plasma, utilizzando il QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit) dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit sul Rotor-Gene Q.

Specificità – plasma

La specificità dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit 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 100 diversi campioni di plasma CMV-negativi. Questi campioni non hanno generato segnali con i primer e le sonde specifici per CMV inclusi nel CMV RG Master.

È stata rilevata una potenziale cross-reattività dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit utilizzando il gruppo di controllo elencato nella sottostante Tabella 1. Nessuno dei patogeni testati è risultato reattivo. Non sono state osservate incidenze di cross-reattività con infezioni miste.

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

Gruppo di controllo	CMV (Cycling Green, ciclo verde)	Controllo interno (Cycling Yellow, ciclo giallo)
Virus dell'herpes umano 1 (virus herpes simplex 1)	-	+
Virus dell'herpes umano 2 (virus herpes simplex 2)	-	+
Virus dell'herpes umano 3 (virus della varicella-zoster)	-	+
Virus dell'herpes umano 4 (virus di Epstein-Barr)	-	+
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	-	+
Virus del Nilo occidentale	-	+
Enterovirus	-	+
Parvovirus B19	-	+

Range lineare — plasma

Il range lineare dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit (tenendo conto della purificazione) è stato determinato analizzando una serie di diluizioni del materiale del virus CMV in un range da $1,00 \times 10^8$ copie/ml a $3,16 \times 10^1$ copie/ml nel plasma. La purificazione è stata eseguita in replicati (n = 4 ciascuno per concentrazioni $\geq 1,00 \times 10^7$ copie/ml; n = 8 ciascuno per concentrazioni $< 1,00 \times 10^7$ copie/ml) utilizzando il QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit in combinazione con il protocollo Cellfree1000_DSP (volume di estrazione: 1 ml, volume di eluzione: 60 µl).

Ogni campione è stato analizzato con l'artus CMV QS-RGQ Kit. Il range lineare dell'artus CMV QS-RGQ Kit, tenendo conto della purificazione, è stato determinato per coprire le concentrazioni da $7,94 \times 10^1$ copie/ml a $1,00 \times 10^8$ copie/ml (corrispondenti al range da $1,30 \times 10^2$ a $1,64 \times 10^8$ UI/ml) per il plasma (Figura 2).

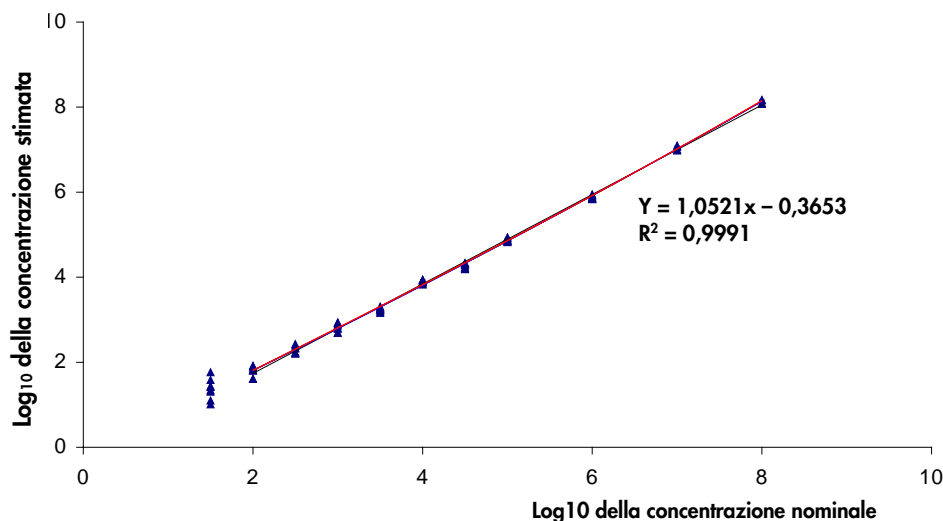


Figura 2. Range lineare dell'artus CMV QS-RGQ Kit (plasma). Calcolo del range lineare. La linea retta è stata determinata mediante una regressione lineare del \log_{10} delle concentrazioni calcolate con il \log_{10} delle concentrazioni nominali. La figura mostra l'equazione della linea di regressione.

Robustezza — plasma

La verifica della robustezza consente la determinazione del tasso globale d'errore dell'artus CMV QS-RGQ Kit. Per verificare la robustezza, 100 campioni di plasma CMV-negativi sono stati arricchiti con 130 copie/ml di CMV (concentrazione pari all'incirca a 3 volte il LOD). In seguito ad estrazione con il QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit in combinazione con il protocollo Cellfree 1000_DSP per il plasma (volume di estrazione: 1 ml, volume di eluizione: 60 μ l), i campioni sono stati analizzati con l'artus CMV QS-RGQ Kit. Inoltre, la robustezza del controllo interno è stata valutata mediante purificazione e analisi dei 100 campioni di plasma arricchiti. Non sono state riscontrate inibizioni di alcun genere. La robustezza dell'artus CMV QS-RGQ Kit 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 trattato con EDTA. È stato valutato il loro effetto nel plasma contenente CMV a concentrazioni pari a circa 10 volte il valore LOD (425 copie/ml). Come controllo sono stati inclusi campioni di plasma arricchiti con CMV senza l'aggiunta di sostanze interferenti. Tutti i campioni, con o senza l'aggiunta di sostanze interferenti, sono stati analizzati in 4 replicati utilizzando il QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit in combinazione con il protocollo Cellfree1000 (volume di estrazione: 1 ml, volume di eluizione: 60 µl). Per i campioni contenenti livelli elevati di inibitori endogeni (bilirubina 30 mg/dl, emoglobina 2 g/dl, trigliceridi 1 g/dl e proteina albumina 6 g/dl) non sono state osservate interferenze sul rilevamento di CMV.

Valutazione clinica – plasma

Le prestazioni cliniche dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit sono state valutate utilizzando campioni clinici e analizzando i relativi riscontri rispetto ai risultati ottenuti applicando un metodo confrontabile. Con l'*artus* CMV QS-RGQ Kit e il metodo confrontabile, presso un centro esterno sono stati analizzati in totale 174 campioni di plasma prelevati in provette con EDTA da pazienti affetti da infezione da CMV o preparati artificialmente utilizzando il primo standard OMS per CMV, nonché prelevati da controlli negativi. La concordanza qualitativa di entrambi i kit è stata pari al 100%. È stata condotta un'analisi di regressione di Deming e Passing-Bablok con il risultato del test condotto con il kit QIAGEN sull'asse Y e con il risultato del test di confronto sull'asse X (vedere Figura 3). La differenza stimata in \log_{10} (UI/ml) nel punto di decisione clinica (1000 UI/ml) tra il kit QIAGEN e il kit di confronto è stata di 0,074 \log_{10} UI/ml, calcolata in base a regressione di Deming.

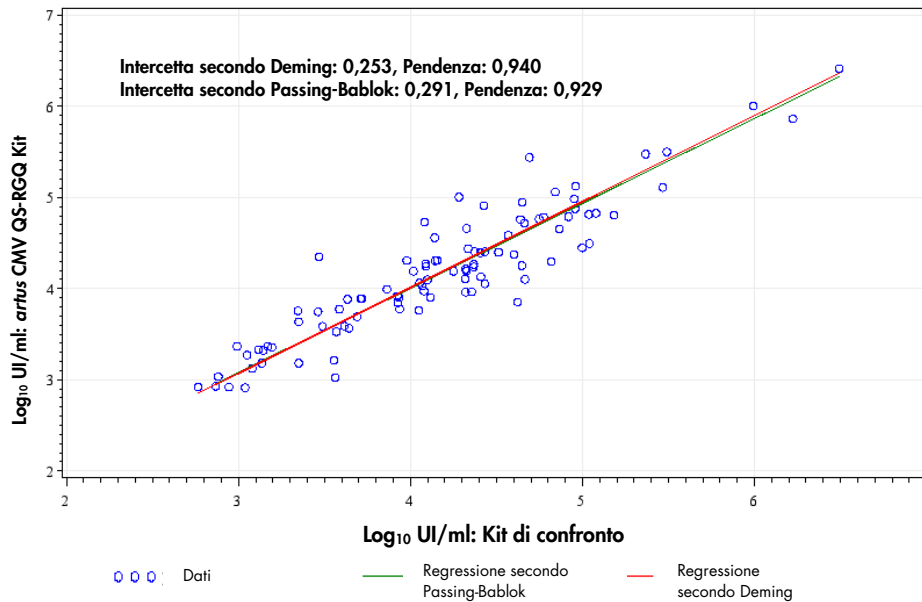


Figura 3. Grafico della regressione con rette di Passing-Bablok e Deming (plasma). Nell'analisi sono stati inclusi campioni compresi tra il limite inferiore di quantificazione (Lower limit of quantification, LLOQ) e il limite superiore di quantificazione (Upper limit of quantification, ULOQ) per entrambi i kit.

È stato tracciato un grafico Bland-Altman per osservare la differenza nel $\log_{10}(\text{UI/ml})$ calcolato. La differenza media di $\log_{10}(\text{UI/ml})$ e il suo corrispondente intervallo al 95% sono stati inoltre calcolati e sovrapposti sul grafico (vedere Figura 4).

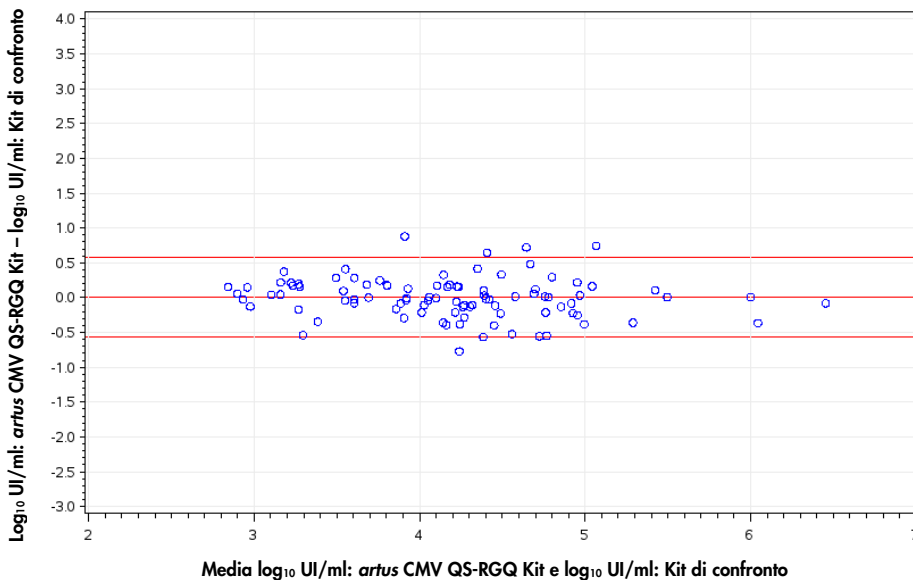


Figura 4. Grafico di Bland-Altman (plasma). Le rette orizzontali di riferimento sono in 0,00, -0,57 e 0,58 e denotano la differenza media ($\log_{10} \text{UI/ml: artus CMV QS-RGQ Kit} - \log_{10} \text{UI/ml: kit di confronto}$) e il corrispondente intervallo di predizione al 95%. Nell'analisi sono stati inclusi campioni compresi tra il limite inferiore e il limite superiore di quantificazione per entrambi i kit.

Limite di rilevabilità – sangue intero

Il LOD, tenendo conto della purificazione (limite di sensibilità), è stato calcolato per l'*artus* CMV QS-RGQ Kit utilizzando campioni clinici CMV-positivi in combinazione con l'estrazione sul QIAAsymphony SP.

Per il sangue intero, il LOD (tenendo conto della purificazione) dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit è stato determinato utilizzando una serie di diluizioni del virus CMV da 1000 copie al valore nominale di 3,16 CMV/ml, aggiunte ai campioni di sangue intero umano.

I campioni sono stati poi sottoposti ad estrazione del DNA con il QIAAsymphony DNA Mini Kit in combinazione con il protocollo VirusBlood200_DSP (volume di estrazione: 200 µl, volume di eluizione: 60 µl). Ciascuna delle 8 diluizioni è stata analizzata con l'*artus* CMV QS-RGQ Kit in 3 giorni diversi nell'ambito di 6 sedute con 11 replicati ciascuna. I risultati sono stati determinati mediante un'analisi probit.

La Figura 5 illustra graficamente l'analisi probit. Il LOD dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit, tenendo conto della purificazione in combinazione con il Rotor-Gene Q, è di 164,55 copie/ml ($p = 0,05$). Ciò significa che esiste una probabilità del 95% che vengano rilevate 164,55 copie/ml (corrispondenti a 122,59 UI/ml).

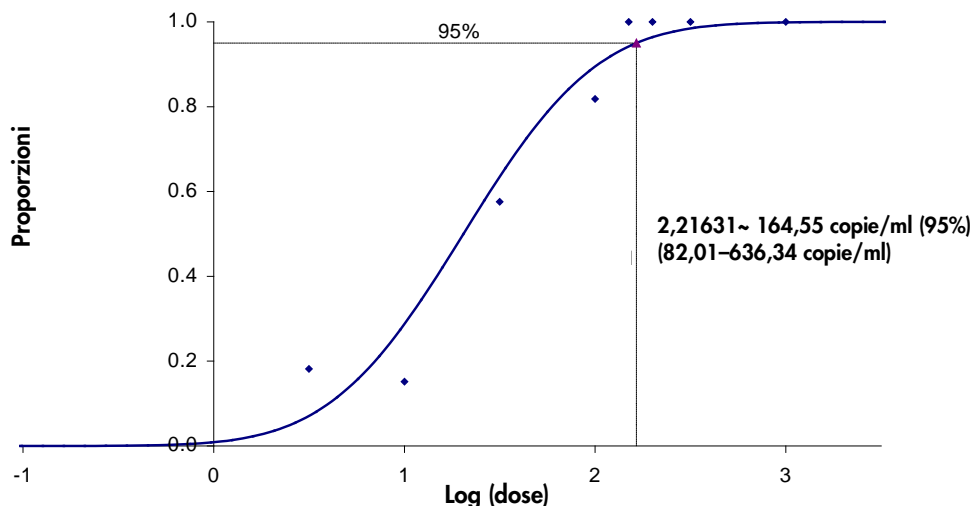


Figura 5. Analisi probit: sangue intero, CMV (Rotor-Gene Q). Limite di rilevabilità, tenendo conto della purificazione (sangue intero, utilizzando il QIAAsymphony DNA Mini Kit), dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit sul Rotor-Gene Q.

Specificità – sangue intero

La specificità dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit 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 100 diversi campioni di sangue intero CMV-negativi. Questi campioni non hanno generato segnali con i primer e le sonde specifici per CMV inclusi nel CMV RG Master.

È stata rilevata una potenziale cross-reattività dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit utilizzando il gruppo di controllo elencato nella Tabella 1 (vedere pag. 4). Nessuno dei patogeni testati è risultato reattivo. Non sono state osservate incidenze di cross-reattività con infezioni miste.

Range lineare – sangue intero

Il range lineare dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit (tenendo conto della purificazione) è stato determinato analizzando una serie di diluizioni del virus CMV da $5,00 \times 10^7$ a $1,00 \times 10^2$ nel sangue intero. La purificazione è stata eseguita in replicati ($n = 4$ ciascuno per concentrazioni $\geq 1,00 \times 10^7$ copie/ml; $n = 8$ ciascuno per concentrazioni $< 1,00 \times 10^7$ copie/ml) utilizzando il QIASymphony DNA Mini Kit in combinazione con il protocollo VirusBlood200 _DSP (volume di estrazione: 200 μ l, volume di eluzione: 60 μ l). Ogni campione è stato analizzato con l'*artus* CMV QS-RGQ Kit. Il range lineare dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit, tenendo conto della purificazione, è stato determinato per coprire le concentrazioni da $1,00 \times 10^3$ copie/ml a $5,00 \times 10^7$ copie/ml (corrispondenti al range da $7,45 \times 10^2$ a $3,73 \times 10^7$ UI/ml) per il sangue intero (Figura 6).

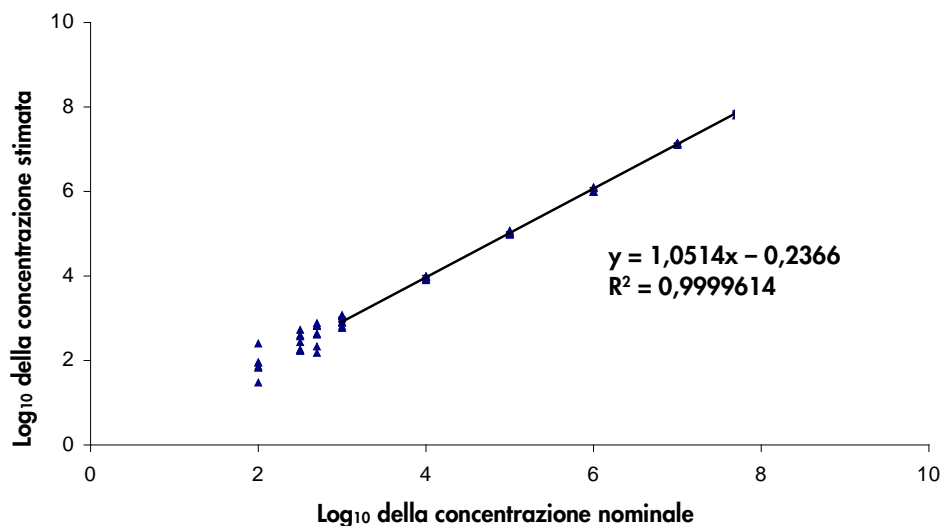


Figura 6. Range lineare dell'artus CMV QS-RGQ Kit (sangue intero). Calcolo del range lineare. La linea retta è stata determinata mediante una regressione lineare del \log_{10} delle concentrazioni calcolate con il \log_{10} delle concentrazioni nominali. La figura mostra l'equazione della linea di regressione.

Robustezza – sangue intero

La verifica della robustezza consente la determinazione del tasso globale d'errore dell'artus CMV QS-RGQ Kit. Per verificare la robustezza, 100 campioni di sangue intero CMV-negativi sono stati arricchiti con 500 copie/ml di CMV (concentrazione pari all'incirca a 3 volte il LOD). In seguito ad estrazione con il QIA Symphony DNA Mini Kit in combinazione con il protocollo VirusBlood200_DSP per il sangue intero, questi campioni sono stati analizzati con l'artus CMV QS-RGQ Kit. Inoltre, la robustezza del controllo interno è stata valutata mediante purificazione e analisi dei 100 campioni di sangue intero arricchiti. Non sono state riscontrate inibizioni di alcun genere. La robustezza dell'artus CMV QS-RGQ Kit è pari al $\geq 99\%$.

Sostanze interferenti – sangue intero

Tre sostanze endogene (bilirubina, trigliceridi e DNA genomico) a concentrazioni elevate sono state identificate come potenzialmente interferenti se presenti nei campioni di sangue intero trattato con EDTA. È stato valutato il loro effetto nel sangue intero contenente CMV a concentrazioni pari a circa 10 volte il valore LOD (1650 copie/ml). Come controllo sono stati inclusi campioni di sangue intero arricchiti con CMV senza l'aggiunta di sostanze interferenti. Tutti i campioni, con o senza l'aggiunta di sostanze interferenti, sono stati analizzati in 4 replicati utilizzando il QIAsymphony DNA Mini Kit in combinazione con il protocollo VirusBlood200_DSP (volume di estrazione: 0,2 ml, volume di eluizione: 60 µl). Per i campioni contenenti livelli elevati di inibitori endogeni (bilirubina 30 mg/dl, trigliceridi 1 g/dl e DNA genomico fino a 3 µg/campione) non sono state osservate interferenze sul rilevamento di CMV.

Valutazione clinica – sangue intero

Le prestazioni cliniche dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit sono state valutate utilizzando campioni clinici e analizzando i relativi riscontri rispetto ai risultati ottenuti applicando un metodo confrontabile. Con l'*artus* CMV QS-RGQ Kit e il metodo confrontabile, presso un centro esterno sono stati analizzati in totale 115 campioni di sangue intero prelevati da pazienti affetti da infezione da CMV e da controlli negativi. È stata condotta un'analisi di regressione di Deming e Passing-Bablok con il risultato del test condotto con il kit QIAGEN sull'asse Y e con il risultato del test di confronto sull'asse X (vedere Figura 7).

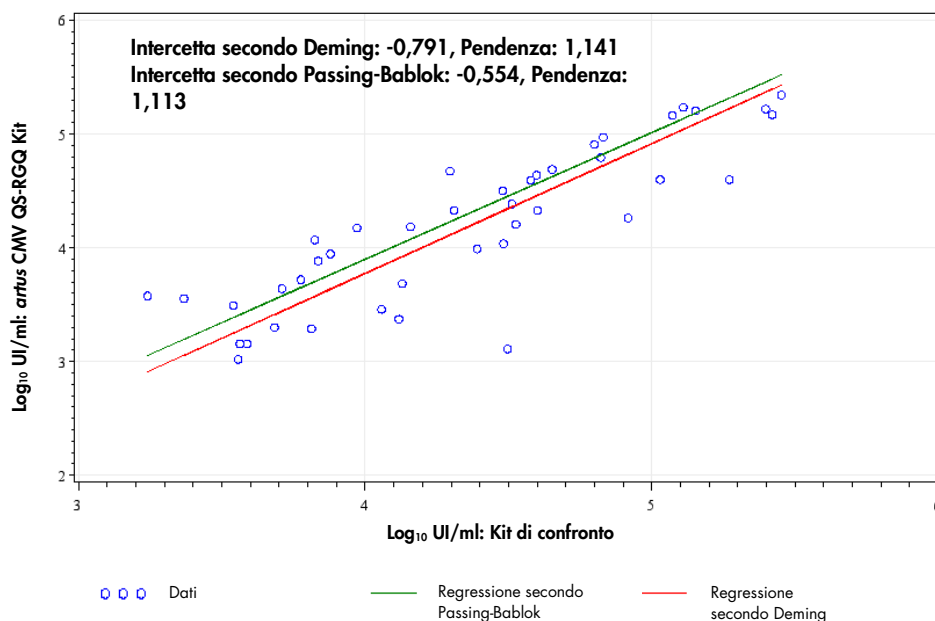


Figura 7. Grafico della regressione con rette di Passing-Bablok e Deming (sangue intero). Solo campioni clinici inclusi nell'analisi. Nell'analisi sono stati inclusi campioni compresi tra il limite inferiore di quantificazione (Lower limit of quantification, LLOQ) e il limite superiore di quantificazione (Upper limit of quantification, ULOQ) per entrambi i kit.

È stato tracciato un grafico Bland-Altman per osservare la differenza nel $\log_{10}(\text{UI/ml})$ calcolato. La differenza media di $\log_{10}(\text{UI/ml})$ e il suo corrispondente intervallo al 95% sono stati inoltre calcolati e sovrapposti sul grafico (vedere Figura 8).

La differenza media in $\log_{10}(\text{UI/ml})$ tra il kit QIAGEN e il kit di confronto è stata di 0,18 $\log_{10} \text{UI/ml}$. La concordanza qualitativa di entrambi i kit è stata pari al 100%.

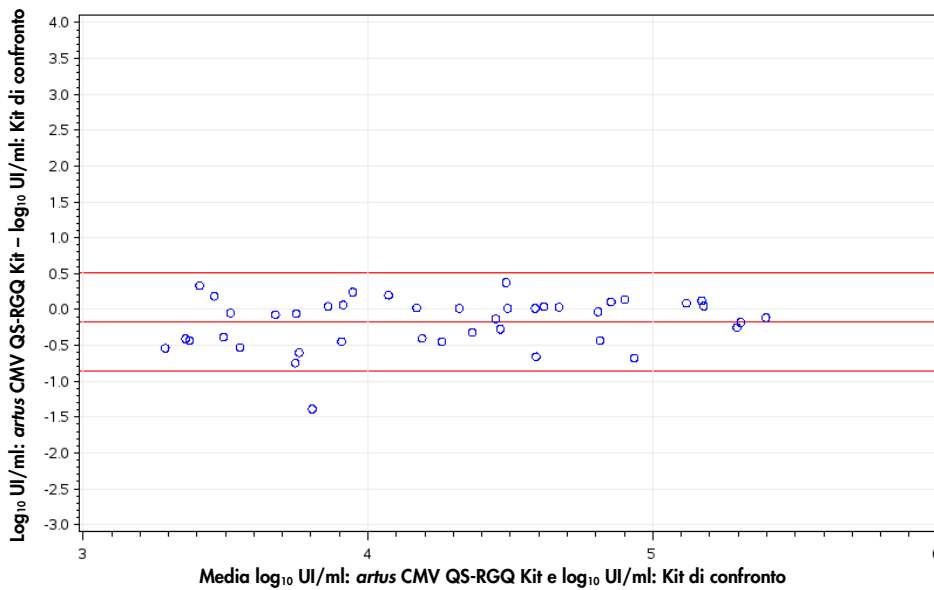


Figura 8. Grafico di Bland-Altman (sangue intero). Le rette orizzontali di riferimento sono in -0,18, -0,86 e 0,51 e denotano la differenza media ($\log_{10} \text{UI/ml: artus CMV QS-RGQ Kit} - \log_{10} \text{UI/ml: kit di confronto}$) e il corrispondente intervallo di predizione al 95%. Nell'analisi sono stati inclusi solo campioni clinici. 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 dell'*artus CMV QS-RGQ Kit* 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 la reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) del controllo interno.

I dati sulla precisione analitica dell'*artus* CMV 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, pag. 13). Inoltre, i dati di precisione per i risultati quantitativi in copie/ μ l sono stati stabiliti utilizzando i corrispondenti valori C_T (Tabella 3, pag. 14). Sulla base di questi risultati, lo scarto statistico generale di un dato campione alla concentrazione menzionata è pari a 1,21% (C_T) o 14,38% (concentrazione) e a 1,93% (C_T) per il rilevamento del controllo interno. Questi valori si basano sulla totalità dei singoli valori delle variabilità stabilite.

Tabella 2. Dati sulla precisione basati sui valori C_T

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-assay: CMV QS 4	0,17	0,03	0,57
Variabilità intra-assay: Controllo interno	0,31	0,10	1,16
Variabilità inter-assay: CMV QS 4	0,38	0,14	1,27
Variabilità inter-assay: Controllo interno	0,47	0,22	1,77
Variabilità inter-lotto: CMV QS 4	0,33	0,11	1,10
Variabilità inter-lotto: Controllo interno	0,53	0,28	2,02
Varianza totale: CMV QS 4	0,36	0,13	1,21
Varianza totale: Controllo interno	0,51	0,26	1,93

Tabella 3. Dati sulla precisione basati sui risultati quantitativi (in copie/ μ l)

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-assay: CMV QS 4	1,34	1,80	13,30
Variabilità inter-assay: CMV QS 4	1,54	2,38	15,25
Variabilità inter-lotto: CMV QS 4	1,46	2,12	14,41
Varianza totale: CMV QS 4	1,45	2,11	14,38

Riproducibilità

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

Contaminazione crociata

L'assenza di contaminazione crociata 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.

I prodotti correlati e le informazioni per l'ordine sono elencati nel manuale dell'*artus* CMV QS-RGQ Kit.

Cronologia delle revisioni del documento

R4, Febbraio 2018	"Sensibilità analitica" modificato in "limite di rilevabilità" o "LOD"; Aggiunte informazioni su "Sostanze interferenti"; aggiunti valori in UI/ml (oltre ai dati già presenti in copie/ml) in base alle informazioni sul fattore di conversione nelle rispettive Schede di Applicazione.
-------------------	--

Per le informazioni aggiornate sulla licenza e sulle clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN specifico. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, *artus*®, Rotor-Gene® (Gruppo QIAGEN).

I marchi registrati, i marchi di fabbrica ecc. utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, non devono essere considerati come non protetti dalla legge. 02/2018 HB-0356-D01-004.
© 2012-2018 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

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