

Říjen 2015

Sada *artus*[®] VZV QS-RGQ: Charakteristika výkonu

Sada *artus* VZV QS-RGQ, verze 1

REF

4502363

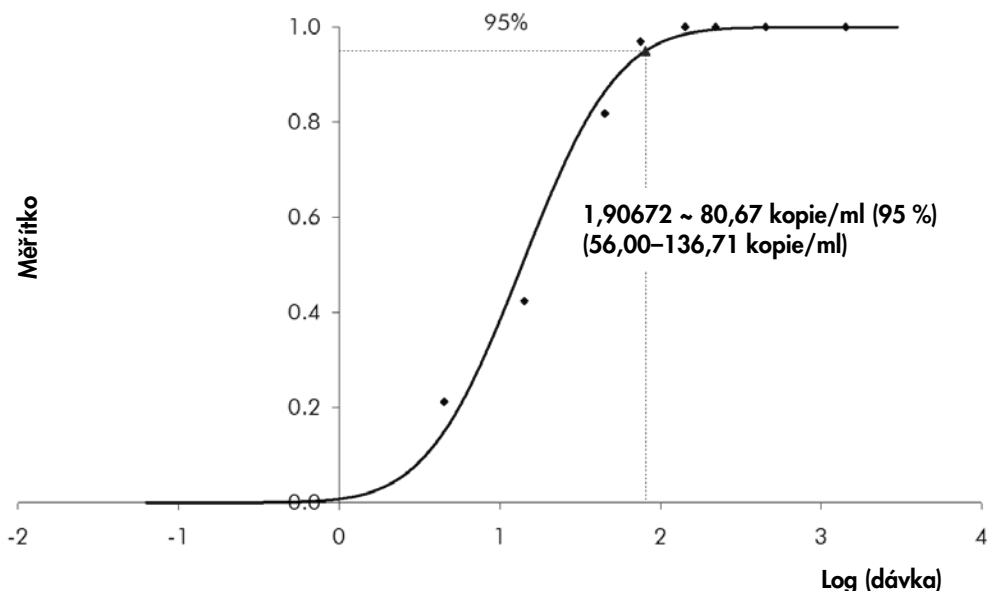


Před samotným testem si ověřte dostupnost nových verzí elektronického značení na adrese www.qiagen.com/products/artusvzvpcrkitce.aspx.
Současný stav verze je vyznačen datem vydání (formát: měsíc/rok).

Analytická senzitivita – CSF

Analytický limit detekce s ohledem na izolaci (limit senzitivity) byl pro sadu *artus* VZV QS-RGQ určen na základě VZV pozitivních klinických vzorků v kombinaci s extrakcí na přístroji QIASymphony® SP.

Analytický limit detekce s ohledem na izolaci sady *artus* VZV QS-RGQ byl určen řadou ředění virového materiálu VZV (kmen Ellen) od 1420 do nominálně 4,5 kopie/ml VZV smíšené v klinických vzorcích CSF. Tyto vzorky byly podrobeny izolaci DNA pomocí sady QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini v kombinaci s protokolem Cellfree200_DSP (extrakční objem: 0,2 ml, eluční objem: 60 µl). Každé ředění z celkově 8 bylo za užití sady *artus* VZV QS-RGQ analyzováno ve 3 bězích ve 3 různých dnech formou jedenáctinásobných určení. Výsledky byly zjištěny probitovou analýzou. Grafické znázornění probitové analýzy naleznete na obrázku 1. Mez analytické detekce, když se vezme v úvahu izolace sady *artus* VZV QS-RGQ v kombinaci s přístrojem Rotor-Gene Q, je 80,67 kopie/ml ($p = 0,05$). To znamená, že bude s 95% pravděpodobností detekováno 80,67 kopie/ml.



Obrázek 1. Probitová analýza: CSF, VZV (Rotor-Gene Q). Analytická senzitivita s ohledem na izolaci (sada QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini) sady *artus* VZV QS-RGQ na přístroji Rotor-Gene Q.

Specificita – CSF

Specificita sady *artus* VZV QS-RGQ je v první řadě zaručena výběrem primerů a sond, jakož i volbou nej přísnějších reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě sekvenční analýzy přezkoušeny na eventuelní homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Detekovatelnost všech relevantních genotypů byla takto zajištěna.

Specificita byla navíc validována pomocí 30 různých vzorků CSF negativních na VZV. Ty negenerovaly žádné signály s VZV specifickými primery a sondami, které jsou začleněny do masteru VZV RG.

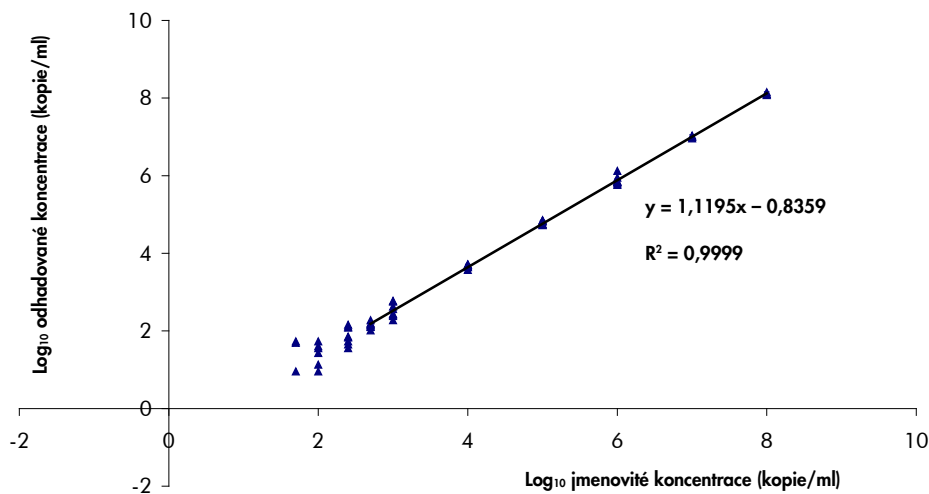
Potenciální křížová reaktivita sady *artus* VZV QS-RGQ byla testována pomocí kontrolní skupiny uvedené v tabulce 1. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní. Při smíšených infekcích se nevyskytly žádné křížové reaktivity.

Tabulka 1. Testování specificity diagnostické sady pomocí potenciálně křížově reaktivních patogenů (CSF)

Kontrolní skupina	VZV (Cycling Green)	Interní kontrola (Cycling Orange)
Lidský herpesvirus 1 (Herpes simplex virus 1)	–	+
Lidský herpesvirus 2 (Herpes simplex virus 2)	–	+
Lidský herpesvirus 4 (virus Epsteina a Barrové)	–	+
Lidský herpesvirus 5 (cytomegalovirus)	–	+
Lidský herpesvirus 6A	–	+
Lidský herpesvirus 6B	–	+
Lidský herpesvirus 7	–	+
Lidský herpesvirus 8 (herpesvirus asociovaný s Kaposiho sarkomem)	–	+
Virus hepatitidy A	–	+
Virus hepatitidy B	–	+
Virus hepatitidy C	–	+
Virus lidské imunodeficiency 1	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 1	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 2	–	+
Enterovirus	–	+
Parvovirus B19	–	+
Virus západonilské horečky	–	+

Lineární oblast kvantifikace – CSF

Lineární oblast kvantifikace s ohledem na izolaci sady *artus* VZV QS-RGQ byla určena analýzou řady ředění materiálu standardu ATCC® VR-1367 VZV kmenu Ellen v rozsahu od $1,00 \times 10^8$ kopií/ml do $5,00 \times 10^1$ kopií/ml. Izolace byla provedena v replikátech ($n = 4$ pro koncentrace $\geq 1,00 \times 10^7$ kopií/ml; $n = 8$ pro koncentrace $< 1,00 \times 10^7$ kopií/ml) za užití sady QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini v kombinaci s protokolem Cellfree200_DSP (extrakční objem: 0,2 ml, eluční objem: 60 μ l). Všechny vzorky byly analyzovány pomocí sady *artus* VZV QS-RGQ. Lineární oblast kvantifikace s ohledem na izolaci sady *artus* VZV QS-RGQ se vztahuje na koncentrace od $5,00 \times 10^2$ kopií/ml do $1,00 \times 10^8$ kopií/ml (obrázek 2).



Obrázek 2. Lineární rozsah sady *artus* VZV QS-RGQ (CSF). Výpočet lineární oblasti kvantifikace. Přímka byla stanovena lineární regresi z \log_{10} vypočítaných koncentrací a z \log_{10} nominálních koncentrací. Rovnice regresních přímek je součástí obrázku.

Robustnost – CSF

Přezkoušení robustnosti slouží k stanovení celkové četnosti chyb sady *artus* VZV QS-RGQ. Za tímto účelem bylo 30 VZV negativních vzorků CSF smíšeno se 300 kopiemi/ml materiálu obsahujícího VZV (cca trojnásobná koncentrace analytického limitu senzitivity). Po izolaci pomocí sady QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini v kombinaci s protokolem Cellfree200_DSP (extrakční objem: 0,2 ml, eluční objem: 60 µl), byly tyto vzorky analyzovány pomocí sady *artus* VZV QS-RGQ.

Robustnost interní kontroly byla přezkoušena izolací a analýzou 30 smíšených vzorků CSF. Inhibice nebyly pozorovány. Robustnost sady *artus* VZV QS-RGQ činí tedy ≥ 99 %.

Rušivé látky – CSF

Erytrocyty a genomová DNA představují dvě endogenní látky, které mohou svou přítomností v CSF narušovat průběh analýzy. Abychom posoudili tento rušivý účinek, vyhodnotili jsme vliv těchto látek na výkon analýzy ve vzorcích CSF s obsahem VZV, jehož koncentrace byla zhruba 10násobkem limitu detekce (LOD; 1 000 kopií/ml). U hodnocených látek se neprokázal žádný rušivý účinek na reagentie sady *artus* VZV QS-RGQ (viz tabulka 2).

Tabulka 2. Rušivé látky ve vzorcích CSF

Koncentrace VZV (kopie/ml)	Rušivá látka		$C_{T(IC)}$			$C_{T(IC) IS} - C_{T(IC) kontrola}$
	Položka	Koncentrace	Průměrné C_T	SD	CV (%)	Absolutní hodnota
1 000	Erytrocyty	–	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
	Kontrola	–	23,58	0,06	0,26	–

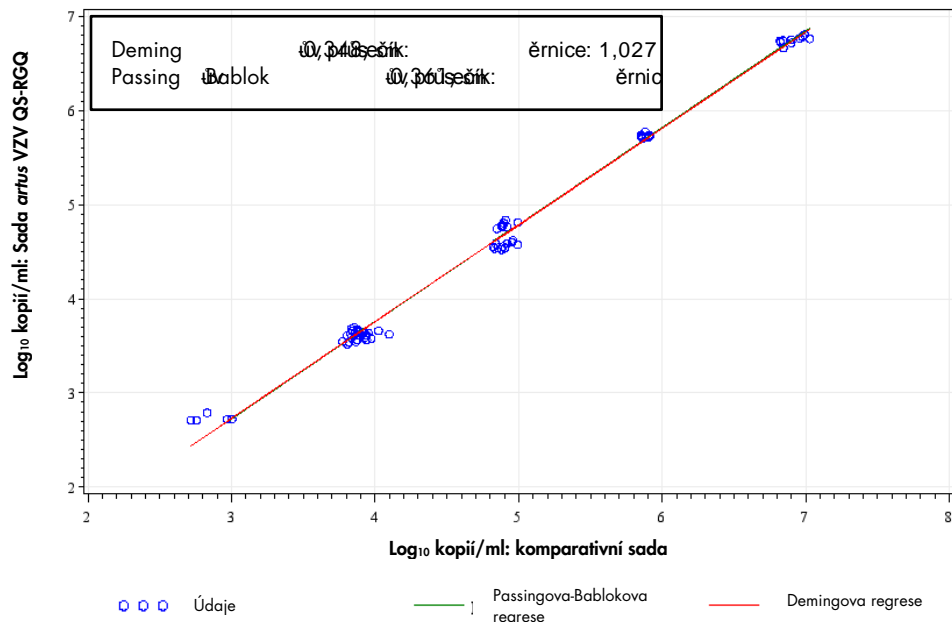
CV: koeficient variace; IC: interní kontrola; IS: rušivá látka; SD: standardní odchylka.

Klinické hodnocení – CSF

Klinický výkon sady *artus* VZV QS-RGQ byl vyhodnocen na základě testu celkem 163 upravených vzorků a porovnání nálezu s výsledky komparativní metody získanými v nezávislé klinické laboratoři. Výsledky byly analyzovány ve dvou fázích: první fáze spočívala v analýze shody v následujících kategoriích: míra pozitivní shody (Positive Percent Agreement; PPA), míra negativní shody (Negative Percent Agreement; NPA) a celková míra shody (Overall Percent Agreement (OPA); druhá fáze zahrnovala analýzu výsledků celkem 75 vzorků CSF, které s využitím Demingovy a Passingovy-Bablokovy regresivní analýzy spadaly do dynamického rozsahu společného rozboru, v porovnání s výsledky určenými z odpovídajícího průsečíku a směrnice přímkou (viz tabulka 3 a obrázek 3).

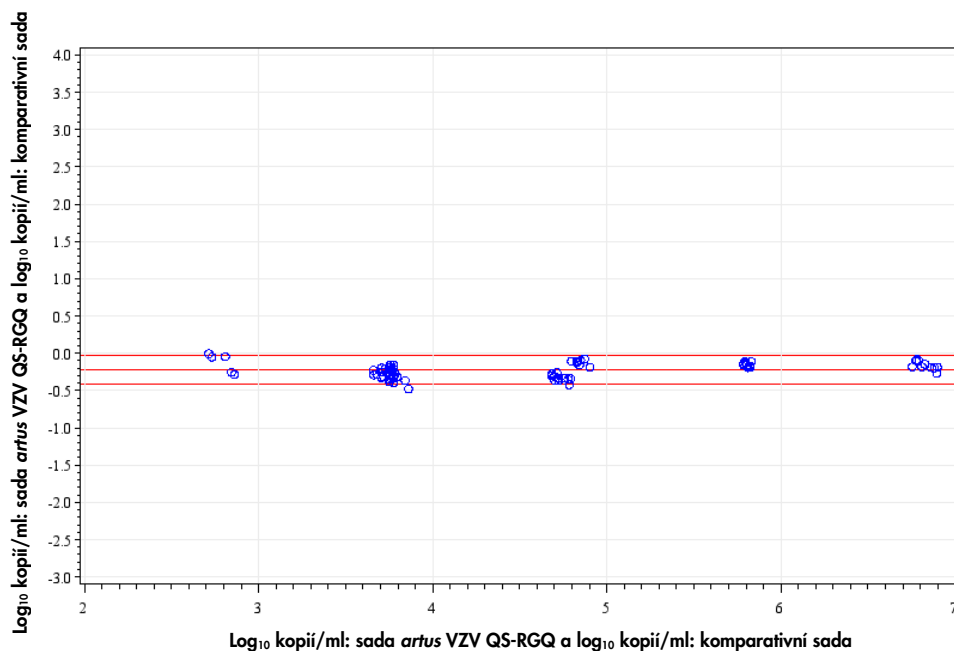
Tabulka 3. Údaje ze studie klinického výkonu u vzorků EDTA plazmy

Míra shody	Frekvence	Procentní shoda	Dolní mez 95% Clopperova-Pearsonova oboustranného intervalu spolehlivosti založeného na binomickém (přesném) rozložení	Horní mez 95% Clopperova-Pearsonova oboustranného intervalu spolehlivosti založeného na binomickém (přesném) rozložení
Celková míra shody	163/163	100,00	97,76	100,00
Míra pozitivní shody	100/100	100,00	96,38	100,00
Míra negativní shody	63/63	100,00	94,31	100,00



Obrázek 3. Graf regrese s Passingovou-Bablokovou a Demingovou přímkou u vzorků CSF. Do analýzy byly zahrnuty vzorky, které se nacházejí mezi dolním a horním limitem kvantifikace pro obě sady.

Blandův-Altmanův graf na obrázku 4 ukazuje, že průměrný střední logaritmičkový rozdíl zjištěný mezi oběma sadami činí 0,22 a že tento rozdíl není ovlivněn koncentrací použitou při testování.



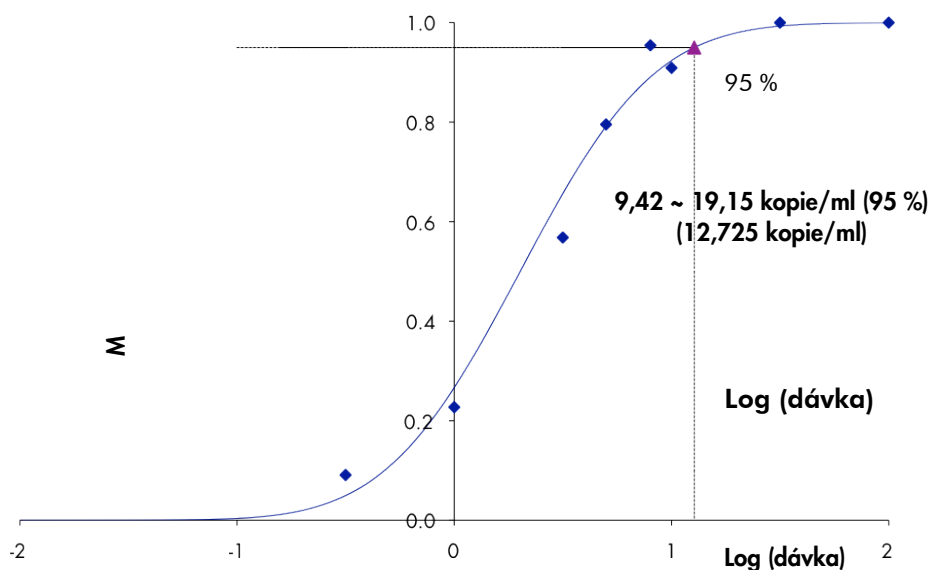
Obrázek 4. Blandův-Altmanův graf (plazma). Horizontální referenční přímky mají hodnotu -0,22, -0,42 a -0,03 a označují střední rozdíl (\log_{10} kopií/ml: sada *artus* VZV QS-RGQ – \log_{10} kopií/ml: komparativní sada) a jím odpovídající 95% předpovědní interval. Do analýzy byly zahrnuty vzorky, které se nacházely mezi dolním a horním limitem kvantifikace pro obě sady.

Analytická senzitivita – plazma

Pro plazmu byla stanovena analytická senzitivita s ohledem na purifikaci sady *artus* VZV QS-RGQ pomocí řady ředění virového materiálu přidaného do lidské plazmy od 100 do 0,316 kopie/ml.

Tyto vzorky byly podrobeny izolaci DNA pomocí sady QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi v kombinaci s protokolem Cellfree1000_DSP (extrakční objem: 1 ml, eluční objem: 60 μ l). Každé ředění z celkově 8 bylo za užití sady *artus* VZV QS-RGQ analyzováno ve 4 bězích ve 4 různých dnech formou jedenáctinásobných určení. Výsledky byly zjištěny probitovou analýzou.

Grafické znázornění probitové analýzy naleznete na obrázku 5. Mez analytické detekce pro VZV, když se vezme v úvahu izolace sady *artus* VZV QS-RGQ v kombinaci s přístrojem Rotor-Gene Q, je 12,725 kopie/ml ($p = 0,05$). To znamená, že bude s 95% pravděpodobností detekováno 12,725 kopie/ml.

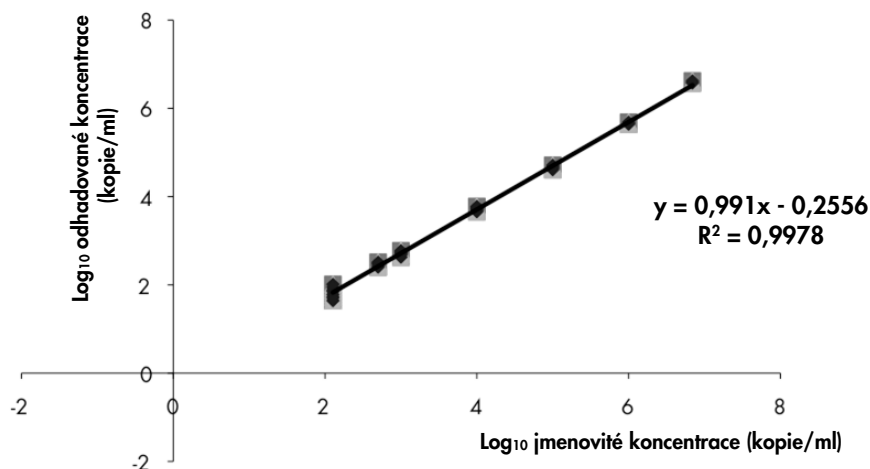


Obrázek 5. Probitová analýza: plazma, VZV (Rotor-Gene Q). Analytická senzitivita s ohledem na izolaci (za užití sady QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi) sady *artus* VZV QS-RGQ na přístroji Rotor-Gene Q.

Lineární oblast kvantifikace – plazma

Lineární oblast kvantifikace s ohledem na izolaci sady *artus* VZV QS;-RGQ byla určena analýzou řady ředění virového materiálu v plazmě v rozsahu od $6,92 \times 10^6$ kopií/ml do $1,0 \times 10^1$ kopií/ml. Izolace byla provedena v replikátech ($n = 4$ pro koncentrace $\geq 1,00 \times 10^6$ kopií/ml; $n = 8$ pro koncentrace $< 1,00 \times 10^6$ kopií/ml) za užití sady QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi v kombinaci s protokolem Cellfree1000_DSP (extrakční objem: 1 ml, eluční objem: 60 μ l). Všechny vzorky byly analyzovány pomocí sady *artus* VZV QS-RGQ.

V plazmě se lineární oblast kvantifikace s ohledem na izolaci sady *artus* VZV QS-RGQ pro materiál VZV vztahuje na koncentrace od 127 kopií/ml do $6,92 \times 10^6$ kopií/ml (obrázek 6).



)]

Obrázek 6. Lineární rozsah sady artus VZV QS-RGQ (plazma). Výpočet lineární oblasti kvantifikace. Přímka byla stanovena lineární regresi z \log_{10} vypočítaných koncentrací a z \log_{10} nominálních koncentrací. Rovnice regresních přímek je zahrnuta v obrázku.

Robustnost – plazma

Přezkoušení robustnosti v plazmě slouží ke stanovení celkové četnosti chyb sady *artus* VZV QS-RGQ. Za tímto účelem bylo 30 VZV negativních vzorků plazmy smíšeno se 38,175 kopie/ml materiálu obsahujícího VZV (cca trojnásobná koncentrace analytického limitu senzitivity). Po izolaci pomocí sady QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi v kombinaci s protokolem Cellfree1000_DSP (extrakční objem: 1 ml, eluční objem: 60 μ l) byly tyto vzorky analyzovány pomocí sady *artus* VZV QS-RGQ. Pokud jde o robustnost při cílovém testování VZV, 100 % (30/30) vzorků bylo detekováno jako pozitivní na VZV.

Kromě toho byla robustnost interní kontroly přezkoušena po purifikaci a analýze 116 smíšených vzorků plazmy. Tyto vzorky byly 100% negativní pro VZV a 100% pozitivní pro cílovou interní kontrolu. Inhibice nebyly pozorovány. Robustnost sady *artus* VZV QS-RGQ činí tedy ≥ 99 %.

Rušivé látky – plazma

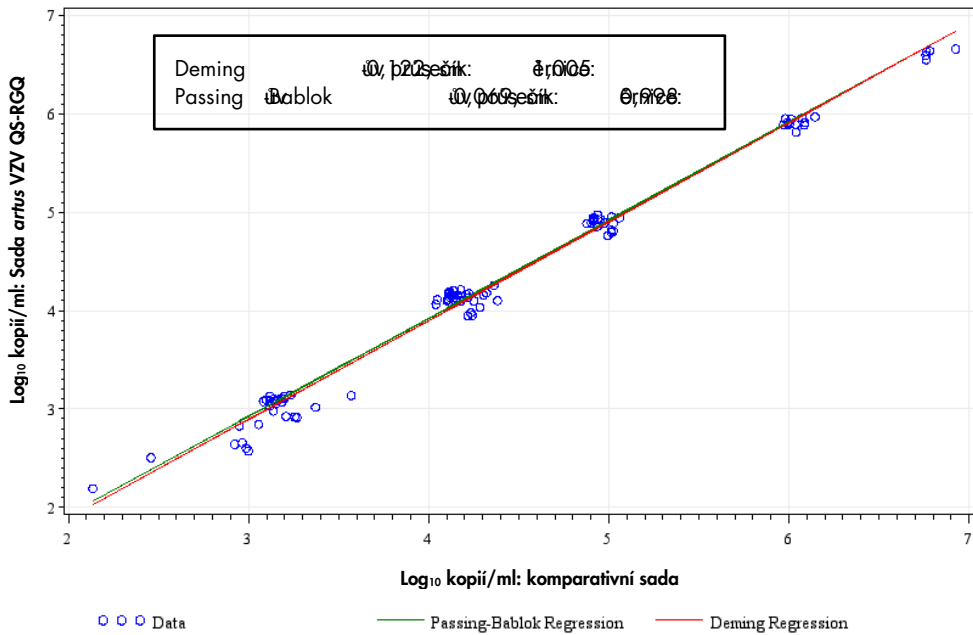
Ukázalo se, že čtyři endogenní látky (bilirubin, hemoglobin, triglycerid a protein albumin) ve zvýšených koncentracích mohou potenciálně interferovat s látkami přítomnými ve vzorcích plazmy. Jejich účinky byly vyhodnoceny v plazmě obsahující VZV v přibližně 10násobku hodnoty LOD (127,25 kopie/ml). Jako kontrola byly zařazeny vzorky plazmy s přimíchaným VZV bez přídavku jakékoliv rušivé látky. Všechny vzorky, s přídavkem interferujících látek nebo bez něj, byly analyzovány ve 4 replikátech pomocí sady QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi v kombinaci s protokolem Cellfree1000_DSP (extrakční objem: 1 ml, eluční objem: 60 µl). U vzorků obsahujících zvýšené hladiny endogenních inhibitorů (bilirubin, hemoglobin, triglycerid a protein albumin) nebyla pozorována u detekce VZV žádná interference.

Klinické hodnocení – plazma

Klinický výkon sady *artus* VZV QS-RGQ byl vyhodnocen na základě testu celkem 161 upravených vzorků a porovnání nálezu s výsledky komparativní metody získanými v nezávislé laboratoři. Výsledky byly analyzovány ve dvou fázích: první fáze spočívala v analýze shody v následujících kategoriích: míra pozitivní shody (Positive Percent Agreement; PPA), míra negativní shody (Negative Percent Agreement; NPA) a celková míra shody (Overall Percent Agreement (OPA)); druhá fáze zahrnovala analýzu výsledků celkem 97 vzorků EDTA plazmy, které s využitím Demingovy a Passingovy-Bablokovy regresivní analýzy spadaly do dynamického rozsahu společného rozboru, v porovnání s výsledky určenými z odpovídajícího průsečíku a směrnice přímkou (viz tabulka 4 a obrázek 7).

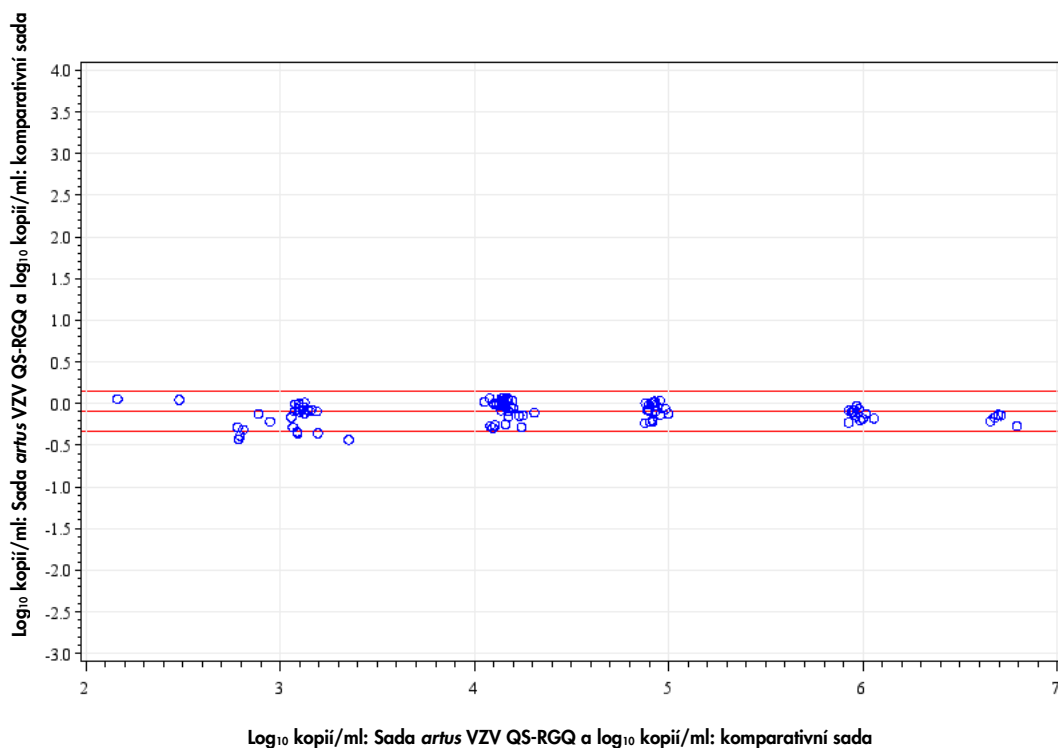
Tabulka 4. Údaje ze studie klinického výkonu u vzorků EDTA plazmy

Míra shody	Frekvence	Procentní shoda	Dolní mez 95% Clopperova-Pearsonova oboustranného intervalu spolehlivosti založeného na binomickém (přesném) rozložení	Horní mez 95% Clopperova-Pearsonova oboustranného intervalu spolehlivosti založeného na binomickém (přesném) rozložení
Celková míra shody	161/161	100,00	97,73	100,00
Míra pozitivní shody	101/101	100,00	96,41	100,00
Míra negativní shody	60/60	100,00	94,04	100,00



Obrázek 7. Graf regrese s Passingovou-Bablokovou a Demingovou přímkou u vzorků plazmy. Do analýzy byly zahrnuty vzorky, které se nacházejí mezi dolním a horním limitem kvantifikace pro obě sady.

Blandův-Altmanův graf na obrázku 8 ukazuje, že průměrný střední logaritmický rozdíl zjištěný mezi oběma sadami činí $-0,10$ a že tento rozdíl není ovlivněn koncentrací použitou při testování.



Obrázek 8. Blandův-Altmanův graf (plazma). Horizontální referenční přímky mají hodnotu $-0,10$, $-0,34$ a $0,14$ a označují střední rozdíl (\log_{10} kopii/ml: sada *artus* VZV QS-RGQ – \log_{10} kopii/ml: komparativní sada) a jim odpovídající 95% předpovědní interval. Do analýzy byly zahrnuty vzorky, které se nacházely mezi dolním a horním limitem kvantifikace pro obě sady.

Přesnost

Údaje o přesnosti sady *artus* VZV QS-RGQ umožňují stanovení celkové variability testovacího systému. Tato celková variabilita se skládá z intra-assay variability (variabilita výsledků vzorků stejné koncentrace v rámci jednoho pokusu), z inter-assay variability (variabilita výsledků rozboru generovaných na různých přístrojích stejného typu a provedených různými osobami v jedné laboratoři) a z inter-batch variability (variabilita výsledků rozboru za užití různých šarží). Získaná data byla použita k vypočítání standardní odchylky, variance a koeficientu variace jak pro specifickou PCR původce, tak i pro PCR interní kontroly.

Analytické údaje o přesnosti sady *artus* VZV QS-RGQ (bez ohledu na izolaci) byly stanoveny pomocí kvantifikačního standardu s nejnižší koncentrací (QS 4; 10 kopií/ μ l). Experimenty byly provedeny formou osminásobných určení. Data o přesnosti byla vypočítána na základě C_T hodnot amplifikačních křivek (C_T : prahový cyklus, viz tabulka 2). Údaje o přesnosti pro kvantitativní výsledky v kopiích/ μ l byly určeny pomocí odpovídajících C_T hodnot (tabulka 3). Na základě těchto výsledků činí celkový statistický rozptyl libovolného vzorku uvedené koncentrace 0,45 % (C_T) resp. 8,32 % (koncentrace), a 2,81 % (C_T) pro průkaz interní kontroly. Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.

Tabulka 5. Data o přesnosti VZV na základě hodnot C_T

	Směrodatná odchylna	Variance	Koeficient variace (%)
Variabilita v rámci jednoho pokusu: VZV QS 4	0,08	0,01	0,26
Variabilita v rámci jednoho pokusu: Interní kontrola	0,04	0,002	0,17
Variabilita mezi různými pokusy: VZV QS 4	0,15	0,02	0,50
Variabilita mezi různými pokusy: Interní kontrola	0,39	0,15	1,63
Variabilita mezi různými šaržemi: VZV QS 4	0,10	0,01	0,34
Variabilita mezi různými šaržemi: Interní kontrola	0,66	0,43	2,65
Celková variabilita: VZV QS 4	0,13	0,02	0,45
Celková variabilita: Interní kontrola	0,68	0,47	2,81

Tabulka 6. Údaje o přesnosti pro VZV na základě kvantitativních výsledků (v kopii/ml)

	Směrodatná odchylna	Variance	Koeficient variace (%)
Variabilita v rámci jednoho pokusu: VZV QS 4	0,50	0,25	5,46
Variabilita mezi různými pokusy: VZV QS 4	0,85	0,72	8,72
Variabilita mezi různými šaržemi: VZV QS 4	0,75	0,56	7,67
Celková variabilita: VZV QS 4	0,81	0,66	8,32

Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti jsou pořizovány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti sady *artus* VZV QS-RGQ a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaje jsou získávány na základě účasti v uznávaných programech pro výkonnostní hodnocení.

Křížové kontaminace

Nepřítomnost křížových kontaminací mezi vzorky po dobu celého pracovního procesu byla pro reprezentativní systém *artus* QS-RGQ prokázána správnou detekcí všech známých pozitivních a negativních vzorků ve střídajících se pozicích (šachovnicové rozmístění).

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdná.

Související produkty a informace o možnostech objednávky jsou uvedeny v příručce pro sadu *artus* VZV QS-RGQ PCR.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příslušné příručce pro sadu QIAGEN® nebo v příručce uživatele. Příručky k sadám QIAGEN a příručky uživatele jsou dostupné na www.qiagen.com nebo na požádání u technického servisu QIAGEN nebo místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC®, VR-1367™ (American Type Culture Collection).
Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, a to i v případě, že takto nejsou výslovně označeny, nejsou považovány za nechráněné zákonem 10/2015 HB-0401-D01-002
© 2012–2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena

Objednávky: www.qiagen.com/contact | Technická podpora: support.qiagen.com | Webové stránky:
www.qiagen.com
