

Oktober 2015

artus[®] VZV QS-RGQ Kit: Leistungsmerkmale

artus VZV QS-RGQ Kit, Version 1

REF

4502363



Prüfen Sie vor einer Testausführung die Verfügbarkeit neuer elektronischer Etikettierungsrevisionen im Internet unter www.qiagen.com/products/artusvzvpcrkitce.aspx. Der aktuelle Revisionsstand wird durch das Veröffentlichungsdatum angegeben (Format: Monat/Jahr).

Analytische Sensitivität – Liquor

Die analytische Nachweisgrenze unter Berücksichtigung der Aufreinigung (Sensitivitätsgrenze) wurde für den *artus* VZV QS-RGQ Kit anhand VZV-positiver klinischer Proben zusammen mit der Extraktion auf dem QIASymphony® SP bestimmt.

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des *artus* VZV QS-RGQ Kits unter Berücksichtigung der Aufreinigung wurde eine Verdünnungsreihe mit Virusmaterial des VZV-Stamms Ellen von 1.420 bis nominal 4,5 VZV-Kopien/ml in klinischen Liquorproben erstellt. Anschließend wurde unter Verwendung des QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kits aus diesen Proben die DNA nach dem Protokoll Cellfree200_DSP isoliert (Extraktionsvolumen: 0,2 ml, Elutionsvolumen: 60 µl). Jede der 8 Verdünnungsstufen wurde an 3 verschiedenen Tagen in 3 Analyserläufen mit jeweils 11 Replikaten unter Verwendung des *artus* VZV QS-RGQ Kits analysiert. Die Ergebnisse wurden mittels Probit-Analyse bestimmt. Abbildung 1 zeigt eine grafische Darstellung der Probit-Analyse. Demzufolge liegt für das *artus* VZV QS-RGQ Kit in Kombination mit dem Rotor-Gene Q die analytische Nachweisgrenze unter Berücksichtigung der Aufreinigung bei 80,67 Kopien/ml ($p = 0,05$). Dies bedeutet, dass 80,67 Kopien/ml mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % detektiert werden können.

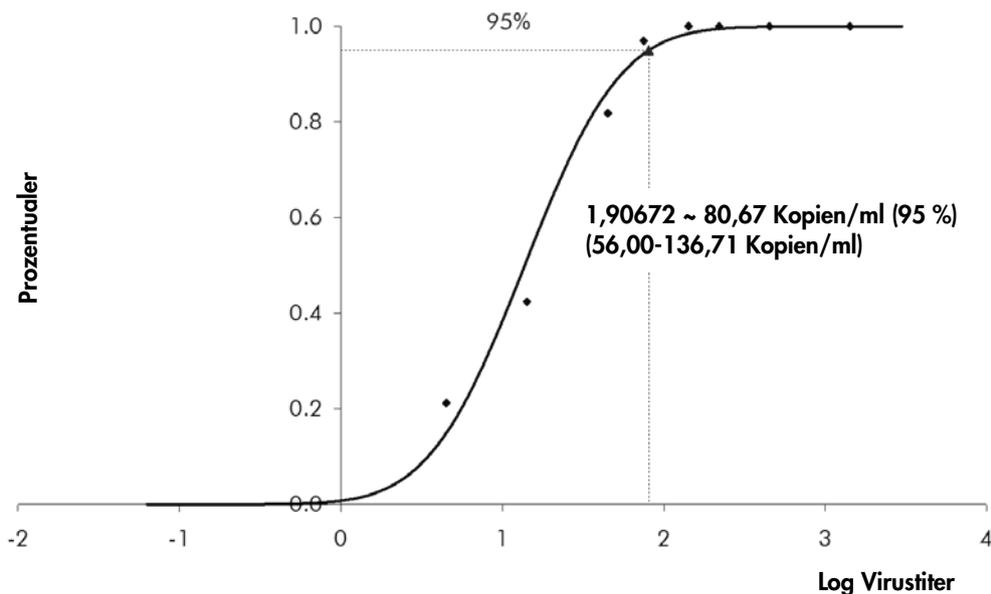


Abbildung 1. Probit-Analyse: Liquor, VZV (Rotor-Gene Q). Analytische Sensitivität unter Berücksichtigung der Aufreinigung (QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit) des *artus* VZV QS-RGQ Kits auf Rotor-Gene Q.

Spezifität – Liquor

Die Spezifität des *artus* VZV QS-RGQ Kits wird in erster Linie durch die Auswahl der Primer und Sonden sowie die Wahl stringenter Reaktionsbedingungen gewährleistet. Die Primer und Sonden sind anhand einer Sequenzvergleichsanalyse auf eventuelle Homologien zu allen in Genbanken publizierten Sequenzen überprüft worden. Die Nachweisbarkeit aller relevanten Genotypen ist dadurch sichergestellt.

Die Validierung der Spezifität erfolgte zudem an 30 verschiedenen VZV-negativen Liquorproben. Bei diesen wurde mit den im VZV RG Master enthaltenen VZV-spezifischen Primern und Sonden kein Signal erzeugt.

Für die Überprüfung einer potentiellen Kreuzreaktivität des *artus* VZV QS-RGQ Kits wurde die in Tabelle 1 aufgeführte Gruppe von Kontrollen untersucht. Bei keinem der getesteten Erreger trat eine Reaktion auf. Bei Mischinfektionen traten keine Kreuzreaktivitäten auf.

Tabelle 1. Spezifitätstest des Kits mit potenziell kreuzreaktiven Pathogenen (Liquor)

Kontrollgruppe	VZV (Cycling Green)	Interne Kontrolle (Cycling Orange)
Humanes Herpesvirus 1 (Herpes-simplex-Virus 1)	-	+
Humanes Herpesvirus 2 (Herpes-simplex-Virus 2)	-	+
Humanes Herpesvirus 4 (Epstein-Barr-Virus)	-	+
Humanes Herpesvirus 5 (Zytomegalievirus)	-	+
Humanes Herpesvirus 6A	-	+
Humanes Herpesvirus 6B	-	+
Humanes Herpesvirus 7	-	+
Humanes Herpesvirus 8 (Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus)	-	+
Hepatitis-A-Virus	-	+
Hepatitis-B-Virus	-	+
Hepatitis-C-Virus	-	+
Humanes Immundefizienz-Virus 1	-	+
Humanes T-lymphotropes Virus 1	-	+
Humanes T-lymphotropes Virus 2	-	+
Enterovirus	-	+
Parvovirus B19	-	+
West-Nil-Virus	-	+

Linearer Bereich der Quantifizierung – Liquor

Der lineare Bereich der Quantifizierung unter Berücksichtigung der Aufreinigung wurde für den *artus* VZV QS-RGQ Kit bestimmt durch Analyse einer Verdünnungsreihe mit Standardmaterial des VZV-Stamms Ellen (ATCC® VR-1367) über einen Konzentrationsbereich von $1,00 \times 10^8$ Kopien/ml bis $5,00 \times 10^1$ Kopien/ml. Die Nukleinsäure-Reinigung wurde in mehreren Replikaten durchgeführt ($n = 4$ für Konzentrationen $\geq 1,00 \times 10^7$ Kopien/ml; $n = 8$ für Konzentrationen $< 1,00 \times 10^7$ Kopien/ml) mit dem QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit unter Verwendung des Protokolls Cellfree200_DSP (Extraktionsvolumen: 0,2 ml, Elutionsvolumen: 60 μ l). Jede Probe wurde mit dem *artus* VZV QS-RGQ Kit analysiert. Der lineare Bereich des *artus* VZV QS-RGQ Kits unter Berücksichtigung der Aufreinigung erstreckt sich demnach über Konzentrationen von $5,00 \times 10^2$ Kopien/ml bis $1,00 \times 10^8$ Kopien/ml (Abb. 2).

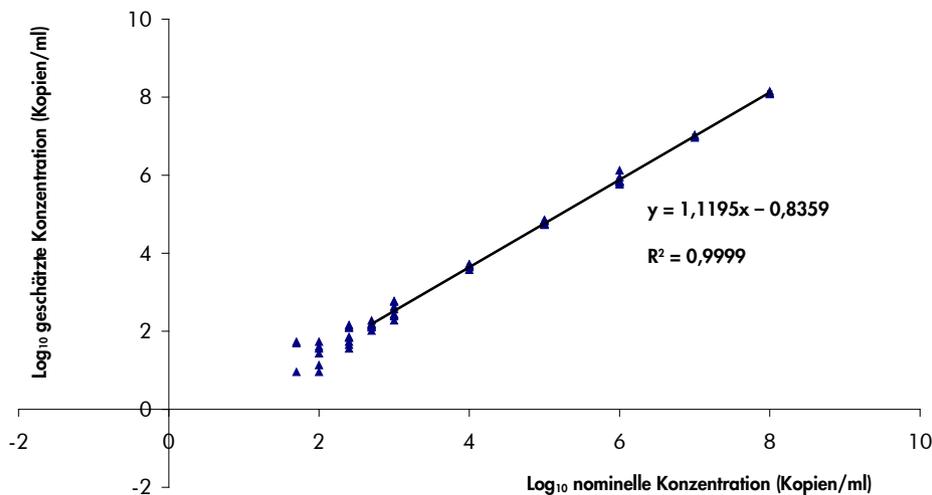


Abbildung 2. Linearer Bereich des *artus* VZV QS-RGQ Kits (Liquor). Berechnung des linearen Bereichs der Quantifizierung. Die Gerade wurde ermittelt durch eine lineare Regression der Log₁₀-Werte der berechneten Konzentrationen mit den Log₁₀-Werten der nominellen Konzentrationen. Die Gleichung der Regressionsgeraden ist in der Abbildung angegeben.

Robustheit – Liquor

Die Überprüfung der Robustheit dient der Ermittlung der Gesamtausfallrate des *artus* VZV QS-RGQ Kits. Hierzu wurden 30 VZV-negative Liquorproben mit je 300 Kopien/ml VZV-Virusmaterial dotiert (ca. dreifache Konzentration der analytischen Sensitivitätsgrenze). Nach Nukleinsäure-Extraktion mit dem QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit unter Verwendung des Protokolls Cellfree200_DSP (Extraktionsvolumen: 0,2 ml, Elutionsvolumen: 60 µl) wurden die Proben mit dem *artus* VZV QS-RGQ Kit analysiert.

Zusätzlich wurde auch die Robustheit der internen Kontrolle durch die Aufreinigung und Analyse der 30 dotierten Liquorproben überprüft. Inhibitionen wurden nicht beobachtet. Damit beträgt die Robustheit des *artus* VZV QS-RGQ Kits ≥ 99 %.

Störsubstanzen – Liquor

Erythrozyten und genomische DNA sind zwei endogene Substanzen, die das Potenzial aufweisen, die Assays zu stören, wenn diese in Liquor vorliegen. Um ihr Störpotenzial zu untersuchen, wurde die Wirkung dieser Substanzen auf die Leistung des Assays anhand von Liquorproben evaluiert, die eine VZV-Konzentration von ungefähr dem 10-fachen Wert der Nachweisgrenze (LOD) enthielten (1.000 Kopien/ml). Diese getesteten Substanzen zeigten keine Störungen mit den Reagenzien des *artus* VZV QS-RGQ Kits (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2. Störsubstanzen in Liquorproben

VZV-Konzentration (Kopien/ml)	Störsubstanz		$C_{T(IK)}$			$C_{T(IK) SS} - C_{T(IK) Kontrolle}$
	Parameter	Konzentration	Mittelwert C_T	SA	VK (%)	Absolut
1.000	Erythrozyten	–	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
	Kontrolle	–	23,58	0,06	0,26	–

VK: Variationskoeffizient; IK: interne Kontrolle; SS: Störsubstanz; SA: Standardabweichung.

Klinische Bewertung – Liquor

Die klinische Leistung des *artus* VZV QS-RGQ Kits wurde durch Testen von insgesamt 163 künstlicher Proben und Analysieren der Befunde gegen die Ergebnisse aus einem vergleichbaren Verfahren an einem externen klinischen Labor bewertet. Die Ergebnisse wurden in zwei Teilen analysiert: Teil Eins war eine kategorische Übereinstimmungsanalyse der positiven prozentualen Übereinstimmung (PPA, Positive Percent Agreement), der negativen prozentualen Übereinstimmung (NPA, Negative Percent Agreement) und der gesamten prozentualen Übereinstimmung (OPA, Overall Percent Agreement); Teil Zwei war eine Analyse der Ergebnisse von insgesamt 75 Liquorproben, die in den gemeinsamen dynamischen Bereich des Assays unter Verwendung der Regressionsanalysen nach Deming und Passing-Bablok fielen, wobei die Ergebnisse zusammen mit dem entsprechenden Achsenabschnitt und der Steigung berichtet wurden (siehe Tabelle 3 und Abbildung 3).

Tabelle 3. Daten der klinischen Leistungsstudie für EDTA-Plasmaproben

Übereinstimmungsmessung	Häufigkeiten	Prozentuale Übereinstimmung	(Exakte) binominale zweiseitige untere 95%-Vertrauensgrenze nach Clopper-Pearson	(Exakte) binominale zweiseitige obere 95%-Vertrauensgrenze nach Clopper-Pearson
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	163/163	100,00	97,76	100,00
Prozentuale positive Übereinstimmung	100/100	100,00	96,38	100,00
Prozentuale negative Übereinstimmung	63/63	100,00	94,31	100,00

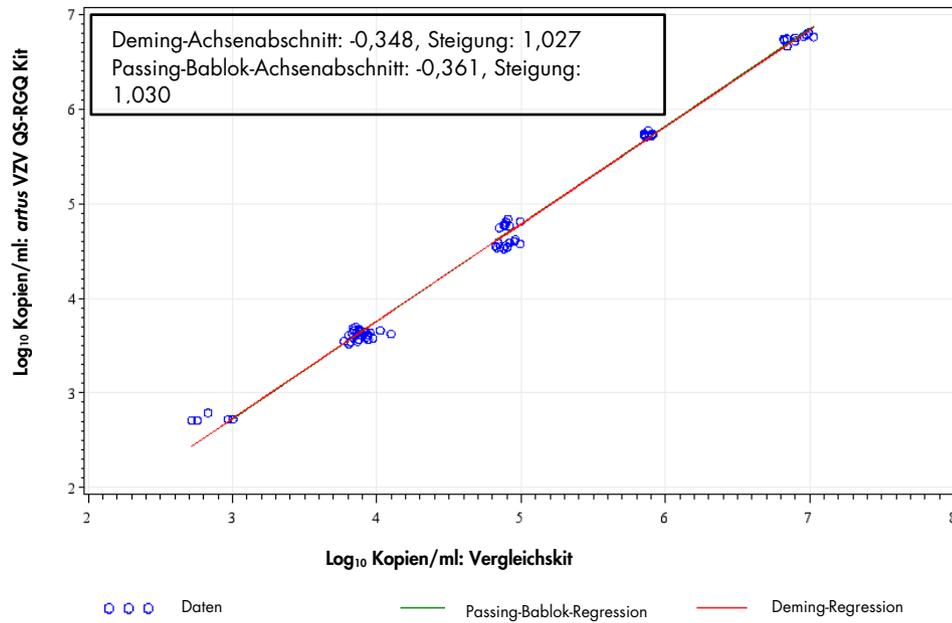


Abbildung 3. Regressionsauftragung mit Passing-Bablok- und Deming-Geraden für Liquorproben. Proben, die für beide Kits zwischen der unteren Quantifizierungsgrenze und der oberen Quantifizierungsgrenze liegen, wurden in die Analyse einbezogen.

Die Bland-Altman-Auftragung in Abbildung 4 zeigt, dass die ungefähre Differenz der Log-Mittelwerte, die zwischen den Kits beobachtet wird, 0,22 beträgt, und diese Differenz wird nicht durch die Testkonzentration beeinflusst.

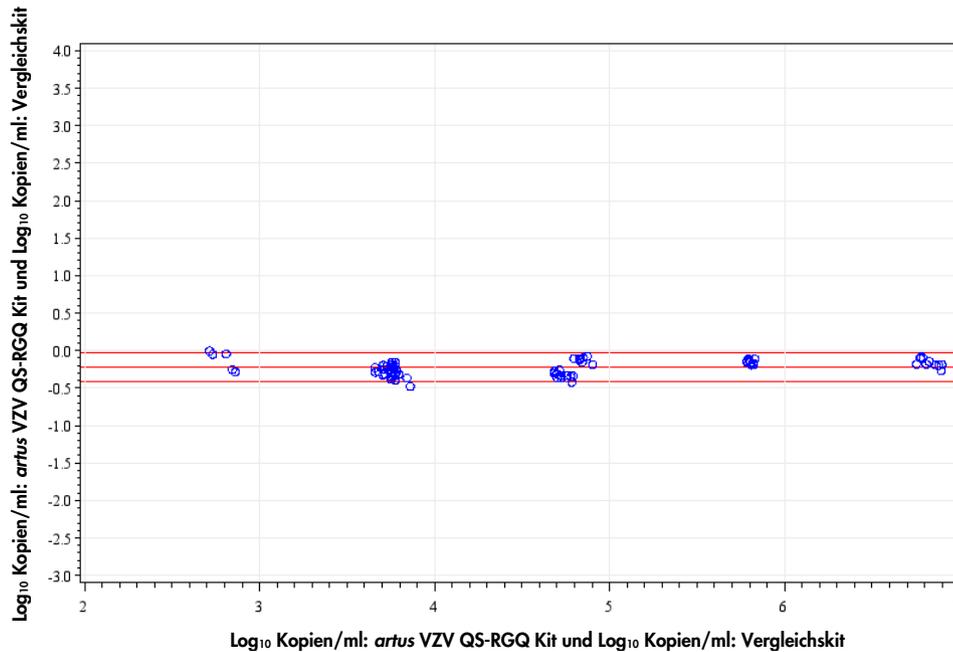


Abbildung 4. Bland-Altman-Auftragung (Plasma). Die horizontalen Referenzgeraden liegen bei -0,22, -0,42 und -0,03 und bezeichnen die mittlere Differenz (Log_{10} Kopien/ml: artus VZV QS-RGQ Kit – Log_{10} Kopien/ml: Vergleichskit) und ihren entsprechenden 95%-Vorhersagebereich. Proben, die für beide Kits zwischen der unteren Quantifizierungsgrenze und der oberen Quantifizierungsgrenze lagen, wurden in die Analyse einbezogen.

Analytische Sensitivität – Plasma

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des artus VZV QS-RGQ Kits unter Berücksichtigung der Aufreinigung wurde für Plasma eine Verdünnungsreihe mit Virusmaterial von 100 bis 0,316 Kopien/ml in Humanplasma erstellt.

Anschließend wurde unter Verwendung des QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kits aus diesen Proben die DNA nach dem Protokoll Cellfree1000_DSP isoliert (Extraktionsvolumen: 1 ml, Elutionsvolumen: 60 µl). Jede der 8 Verdünnungsstufen wurde an 4 verschiedenen Tagen in 4 Analyseläufen mit jeweils 11 Replikaten unter Verwendung des artus VZV QS-RGQ Kits analysiert. Die Ergebnisse wurden mittels Probit-Analyse bestimmt.

Abbildung 5 zeigt eine grafische Darstellung der Probit-Analyse. Demzufolge liegt für das *artus* VZV QS-RGQ Kit in Kombination mit dem Rotor-Gene Q die analytische Nachweisgrenze für VZV unter Berücksichtigung der Aufreinigung bei 12,725 Kopien/ml ($p = 0,05$). Dies bedeutet, dass 12,725 Kopien/ml mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % detektiert werden können.

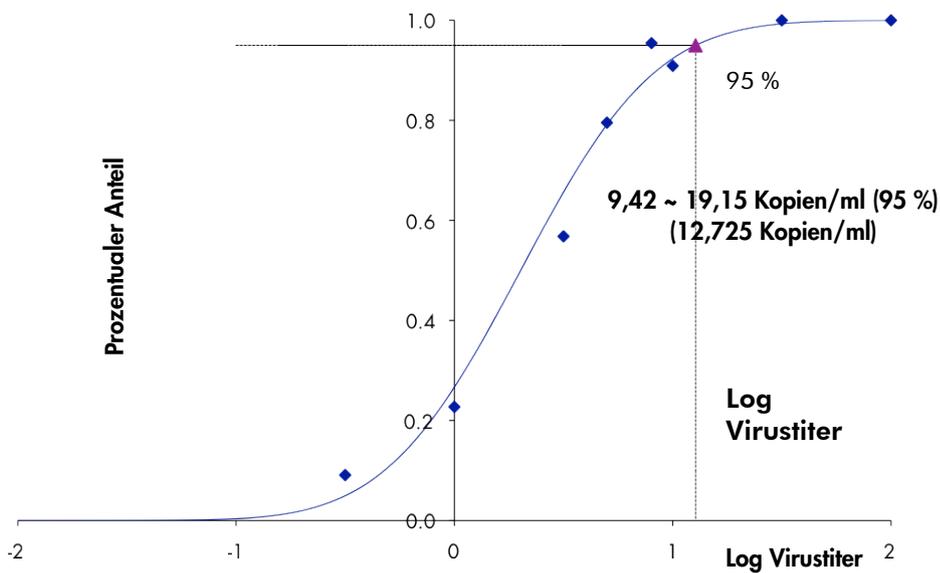


Abbildung 5. Probit-Analyse: Plasma, VZV (Rotor-Gene Q). Analytische Sensitivität unter Berücksichtigung der Aufreinigung (unter Verwendung des QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kits) und des *artus* VZV QS-RGQ Kits auf dem Rotor-Gene Q.

Linearer Bereich der Quantifizierung – Plasma

Der lineare Bereich der Quantifizierung unter Berücksichtigung der Aufreinigung wurde für den *artus* VZV QS-RGQ Kit durch Analyse einer Verdünnungsreihe mit Virusmaterial in Plasma über einen Konzentrationsbereich von $6,92 \times 10^6$ Kopien/ml bis $1,0 \times 10^1$ Kopien/ml bestimmt. Die Nukleinsäure-Reinigung wurde in mehreren Replikaten durchgeführt ($n = 4$ für Konzentrationen $\geq 1,00 \times 10^6$ Kopien/ml; $n = 8$ für Konzentrationen $< 1,00 \times 10^6$ Kopien/ml) mit dem QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit unter Verwendung des Protokolls Cellfree1000_DSP (Extraktionsvolumen: 1 ml, Elutionsvolumen: 60 μ l). Jede Probe wurde mit dem *artus* VZV QS-RGQ Kit analysiert.

In Plasma erstreckt sich der lineare Bereich des *artus* VZV QS-RGQ Kits unter Berücksichtigung der Nukleinsäure-Reinigung demnach für VZV-Material über Konzentrationen von 127 Kopien/ml bis $6,92 \times 10^6$ Kopien/ml (siehe Abb. 6).

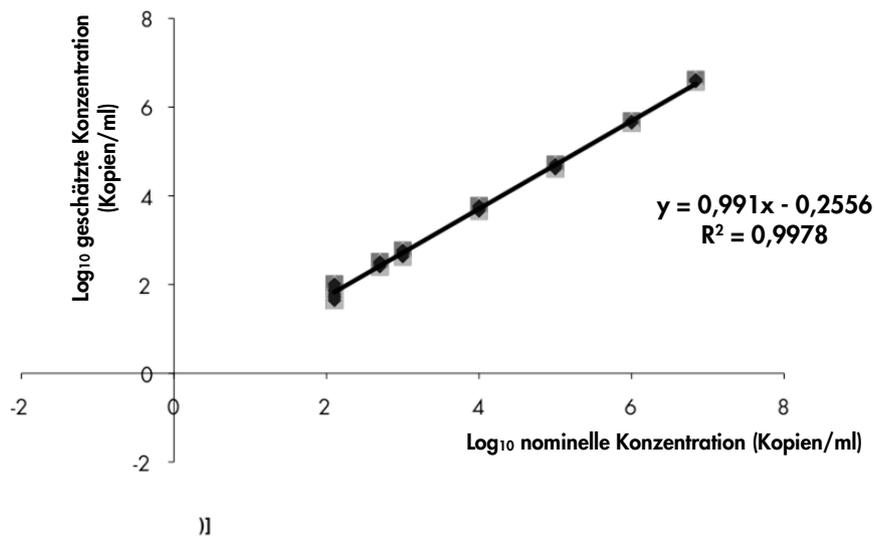


Abbildung 6. Linearer Bereich des *artus* VZV QS-RGQ Kits (Plasma). Berechnung des linearen Bereichs der Quantifizierung. Die Gerade wurde ermittelt durch eine lineare Regression der Log₁₀-Werte der berechneten Konzentrationen mit den Log₁₀-Werten der nominellen Konzentrationen. Die Gleichung der Regressionsgeraden ist in der Abbildung angegeben.

Robustheit – Plasma

Die Überprüfung der Robustheit für Plasma dient der Ermittlung der Gesamtausfallrate des *artus* VZV QS-RGQ Kits. Hierzu wurden 30 VZV-negative Plasmaproben mit je 38,175 Kopien/ml VZV-Material dotiert (ca. dreifache Konzentration der analytischen Sensitivitätsgrenze). Nach Nukleinsäure-Extraktion mit dem QlAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit unter Verwendung des Protokolls Cellfree1000_DSP (Extraktionsvolumen: 1 ml, Elutionsvolumen: 60 µl) wurden die Proben mit dem *artus* VZV QS-RGQ Kit analysiert. In Bezug auf Robustheit wurden bei Zielprüfung auf VZV 100 % (30/30) Proben positiv auf VZV getestet.

Zusätzlich wurde auch die Robustheit der internen Kontrolle nach der Aufreinigung und Analyse von 116 dotierten Plasmaproben überprüft. Diese Proben waren 100 % negativ auf VZV-Ziele und 100 % positiv auf das Ziel der internen Kontrolle. Inhibitionen wurden nicht beobachtet. Damit beträgt die Robustheit des *artus* VZV QS-RGQ Kits ≥ 99 %.

Störsubstanzen – Plasma

Vier endogene Substanzen (Bilirubin, Hämoglobin, Triglycerid und Albumin-Protein) wurden bei einer erhöhten Konzentration als potenzielle Störsubstanzen identifiziert, die in Plasmaproben vorliegen. Ihre Wirkungen wurden in Plasma untersucht, das VZV mit dem 10-fachen Wert der Nachweisgrenze (LOD) enthielt (127,25 Kopien/ml). Als eine Kontrolle wurden VZV dotierte Plasmaproben ohne Zusatz von Störsubstanzen einbezogen. Alle Proben sowohl mit als auch ohne Zusatz von Störsubstanzen wurden in 4 Replikaten analysiert mit dem QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit unter Verwendung des Protokolls Cellfree1000_DSP (Extraktionsvolumen: 1 ml, Elutionsvolumen: 60 µl). Für Proben, die erhöhte Konzentrationen endogener Inhibitoren (Bilirubin, Hämoglobin, Triglycerid und Albumin-Protein) enthielten, wurde für den Nachweis von VZV keine Störung beobachtet.

Klinische Bewertung – Plasma

Die klinische Leistung des *artus* VZV QS-RGQ Kits wurde durch Testen von insgesamt 161 künstlicher EDTA-Plasmaproben und Analysieren der Befunde gegen die Ergebnisse aus einem vergleichbaren Verfahren an einem externen Standort bewertet. Die Ergebnisse wurden in zwei Teilen analysiert: Teil Eins war eine kategorische Übereinstimmungsanalyse der positiven prozentualen Übereinstimmung (PPA, Positive Percent Agreement), der negativen prozentualen Übereinstimmung (NPA, Negative Percent Agreement) und der gesamten prozentualen Übereinstimmung (OPA, Overall Percent Agreement); Teil Zwei war eine Analyse der Ergebnisse von insgesamt 97 EDTA-Plasmaproben, die in den gemeinsamen dynamischen Bereich des Assays unter Verwendung der Regressionsanalysen nach Deming und Passing-Bablok fielen, wobei die Ergebnisse zusammen mit dem entsprechenden Achsenabschnitt und der Steigung berichtet wurden (siehe Tabelle 4 und Abbildung 7).

Tabelle 4. Daten der klinischen Leistungsstudie für EDTA-Plasmaproben

Übereinstimmungsmessung	Häufigkeiten	Prozentuale Übereinstimmung	(Exakte) binominale zweiseitige untere 95- %-Vertrauensgrenze nach Clopper-Pearson	(Exakte) binominale zweiseitige obere 95- %-Vertrauensgrenze nach Clopper-Pearson
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	161/161	100,00	97,73	100,00
Prozentuale positive Übereinstimmung	101/101	100,00	96,41	100,00
Prozentuale negative Übereinstimmung	60/60	100,00	94,04	100,00

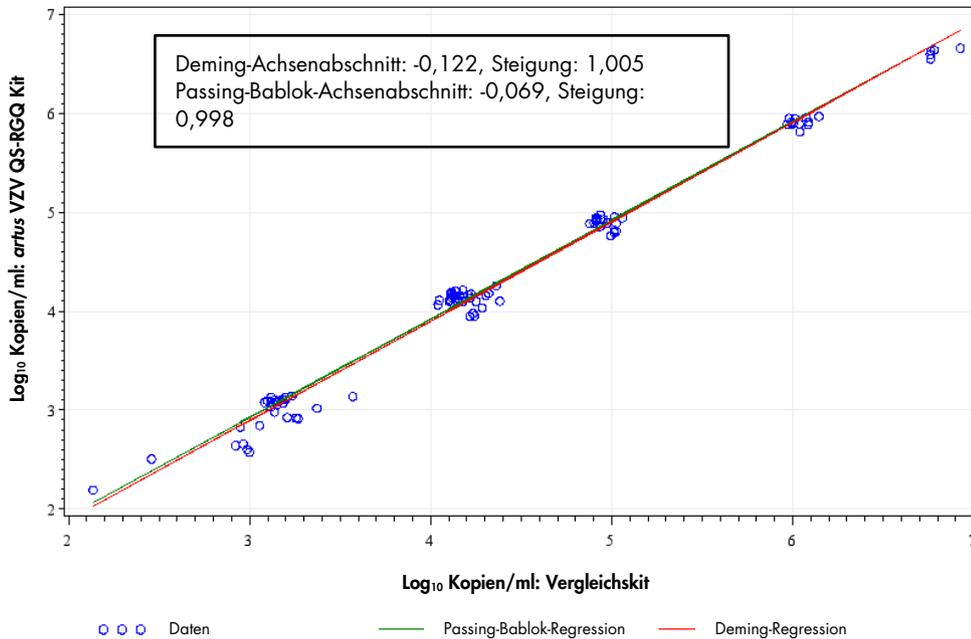


Abbildung 7. Regressionsauftragung mit Passing-Bablok- und Deming-Geraden für Plasmaproben. Proben, die für beide Kits zwischen der unteren Quantifizierungsgrenze und der oberen Quantifizierungsgrenze liegen, wurden in die Analyse einbezogen.

Die Bland-Altman-Auftragung in Abbildung 8 zeigt, dass die ungefähre Differenz der Log-Mittelwerte, die zwischen den Kits beobachtet wird, -0,10 beträgt, und diese Differenz wird nicht durch die Testkonzentration beeinflusst.

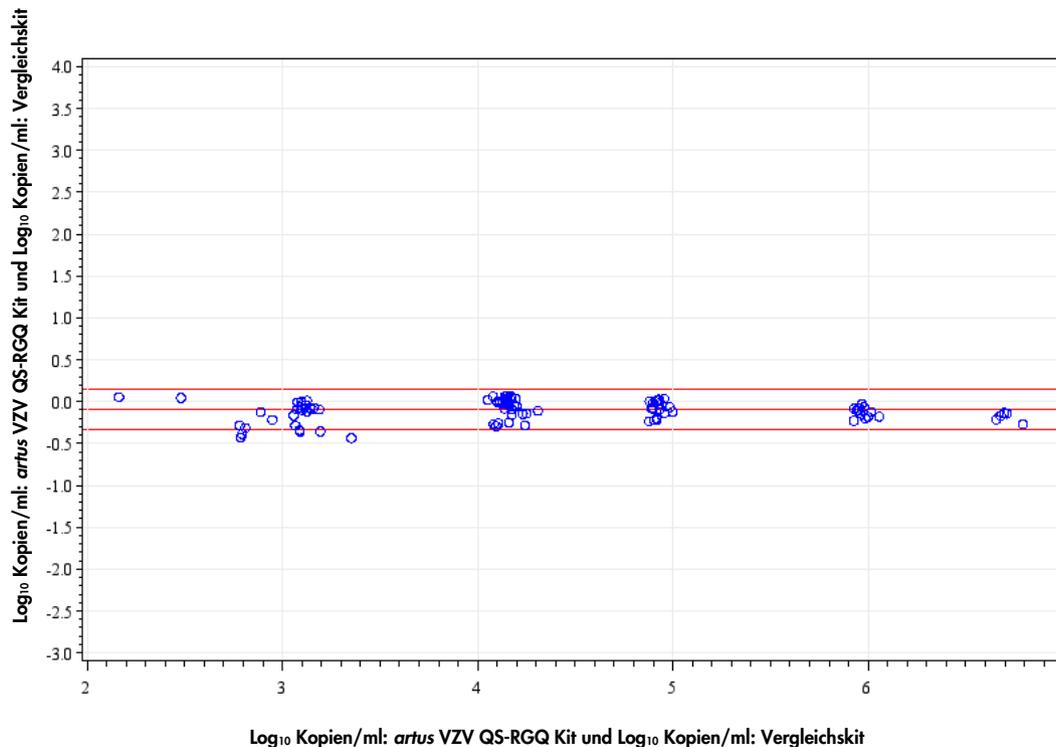


Abbildung 8. Bland-Altman-Auftragung (Plasma). Die horizontalen Referenzgeraden liegen bei -0,10, -0,34 und 0,14 und bezeichnen die mittlere Differenz (Log_{10} Kopien/ml: *artus* VZV QS-RGQ Kit – Log_{10} Kopien/ml: Vergleichskit) und ihren entsprechenden 95%-Vorhersagebereich. Proben, die für beide Kits zwischen der unteren Quantifizierungsgrenze und der oberen Quantifizierungsgrenze lagen, wurden in die Analyse einbezogen.

Präzision

Die Präzisionsdaten des *artus* VZV QS-RGQ Kits erlauben die Ermittlung der Totalvarianz (Gesamtstreuung) des Testsystems. Diese Totalvarianz setzt sich zusammen aus der Intra-Assay-Variabilität (Streuung von Proben derselben Konzentration innerhalb eines Versuchsansatzes), der Inter-Assay-Variabilität (Streuung bei Anwendung durch verschiedene Personen innerhalb eines Labors unter Benutzung verschiedener Geräte gleichen Typs) und der Inter-Chargenvariabilität (Streuung bei Verwendung unterschiedlicher Chargen). Aus den erhaltenen Daten wurden jeweils die Standardabweichung, die Varianz und der Variationskoeffizient sowohl für die erregerspezifische PCR als auch für die PCR der internen Kontrolle berechnet.

Die Daten zur analytischen Präzision des *artus* VZV QS-RGQ Kits (ohne Berücksichtigung der Aufreinigung) wurden mit dem Quantifizierungsstandard mit der geringsten Konzentration (QS 4; 10 Kopien/ μ l) erhoben. Die Tests wurden in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse wurde anhand der C_T -Werte der Amplifikationskurven (C_T : threshold cycle, siehe Tabelle 2) vorgenommen. Zusätzlich wurden auch die Präzisionsdaten der quantitativen Werte in Kopien/ μ l mittels

der entsprechenden C_T -Werte ermittelt (Tabelle 3). Demnach beträgt die Gesamtstreuung einer beliebigen Probe der genannten Konzentration 0,45 % (C_T) bzw. 8,32 % (Konzentration) und für den Nachweis der internen Kontrolle 2,81 % (C_T). Diese Werte basieren auf der Gesamtheit aller Einzelwerte der ermittelten Variabilitäten.

Tabelle 5. Präzision für VZV auf Grundlage der C_T -Werte

	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient (%)
Intra-Assay-Variabilität: VZV QS 4	0,08	0,01	0,26
Intra-Assay-Variabilität: Interne Kontrolle	0,04	0,002	0,17
Inter-Assay-Variabilität: VZV QS 4	0,15	0,02	0,50
Inter-Assay-Variabilität: Interne Kontrolle	0,39	0,15	1,63
Inter-Chargenvariabilität: VZV QS 4	0,10	0,01	0,34
Inter-Chargenvariabilität: Interne Kontrolle	0,66	0,43	2,65
Totalvarianz: VZV QS 4	0,13	0,02	0,45
Totalvarianz: Interne Kontrolle	0,68	0,47	2,81

Tabelle 6. Präzisionsdaten für VZV auf Grundlage der quantitativen Ergebnisse (in Kopien/ml)

	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient (%)
Intra-Assay-Variabilität: VZV QS 4	0,50	0,25	5,46
Inter-Assay-Variabilität: VZV QS 4	0,85	0,72	8,72
Inter-Chargenvariabilität: VZV QS 4	0,75	0,56	7,67
Totalvarianz: VZV QS 4	0,81	0,66	8,32

Reproduzierbarkeit

Die Daten zur Reproduzierbarkeit erlauben eine regelmäßige Leistungsbewertung des *artus* VZV QS-RGQ Kits sowie einen Leistungsvergleich mit anderen Produkten. Diese Daten werden durch die Teilnahme an etablierten Ringversuchsprogrammen erhoben.

Kreuzkontaminationen

Die Abwesenheit von Kreuzkontaminationen zwischen Proben während des gesamten Arbeitsablaufs wurde durch korrekten Nachweis aller abwechselnd angeordneten Positiv- und Negativproben (Schachbrettmuster) mit einem repräsentativen *artus* QS-RGQ System gezeigt.

Notizen

Verwandte Produkte und Bestellinformationen sind im Handbuch des *artus* VZV QS-RGQ PCR Kits aufgeführt.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch des jeweiligen QIAGEN®-Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN-Kits finden Sie im Internet unter www.qiagen.com abrufbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Distributor angefordert werden.

Bestellungen www.qiagen.com/contact | Technische Beratung support.qiagen.com | Internetseite
www.qiagen.com