

Febrero 2018

artus[®] CMV QS-RGQ Kit: Características de rendimiento

R4

IVD

CE
0197

REF

4503363, *artus* CMV QS-RGQ Kit, versión 1.



Compruebe la disponibilidad de nuevas versiones de la documentación electrónica en www.qiagen.com/products/artuscmvpcrkitce.aspx antes de realizar la prueba.

Límite de detección: plasma

El límite de detección (limit of detection, LOD) teniendo en cuenta la purificación (límite de sensibilidad) se evaluó para el *artus* CMV QS-RGQ Kit utilizando muestras clínicas positivas para el CMV en combinación con la extracción con el instrumento QIAasymphony® SP.

En el caso del plasma, el LOD teniendo en cuenta la purificación del *artus* CMV QS-RGQ Kit se determinó añadiendo una serie de diluciones de material viral CMV de 1000 a 0,316 copias/ml nominales de CMV a muestras clínicas de plasma. Estas diluciones se sometieron a la extracción de ADN con el QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit en combinación con el protocolo Cellfree1000_DSP (volumen de extracción: 1 ml, volumen de elución: 60 µl). Cada una de las 10 diluciones se analizó con el *artus* CMV QS-RGQ Kit en 4 días diferentes y en 4 series analíticas con 8 duplicados cada una. Los resultados se determinaron mediante un análisis probit. En la figura 1 se muestra una representación gráfica del análisis probit. El LOD teniendo en cuenta la purificación del *artus* CMV QS-RGQ Kit en combinación con el Rotor-Gene Q es de 42,5 copias/ml ($p = 0,05$). Esto significa que existe una probabilidad del 95% de que se detecten 42,5 copias/ml (correspondientes a 69,7 UI/ml).

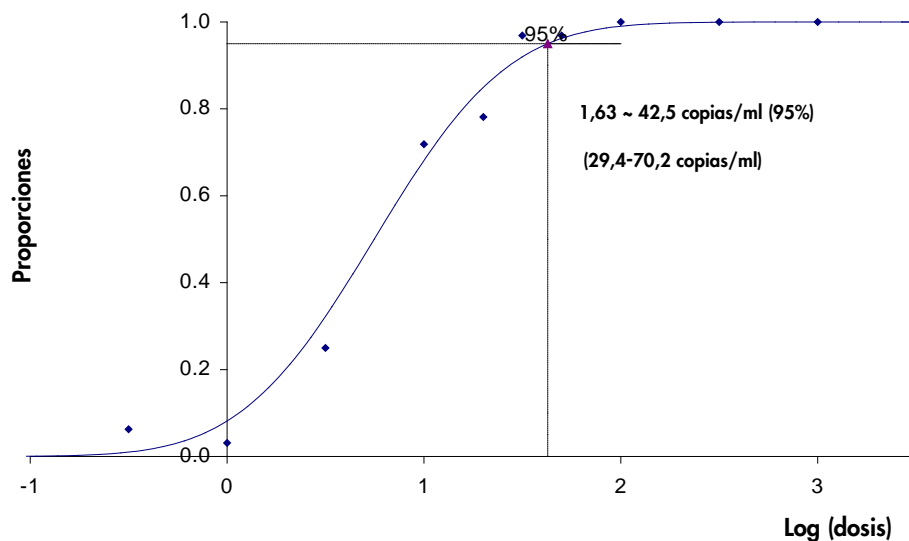


Figura 1. Análisis probit: plasma, CMV (Rotor-Gene Q). El límite de detección teniendo en cuenta la purificación (plasma, utilizando el QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit) del *artus* CMV QS-RGQ Kit en el Rotor-Gene Q.

Especificidad: plasma

La especificidad del *artus* CMV QS-RGQ Kit se asegura ante todo mediante la selección de los cebadores y de las sondas, así como mediante la selección de condiciones estrictas para la

reacción. Los cebadores y las sondas se comprobaron con respecto a posibles homologías con todas las secuencias publicadas en los bancos de genes por medio de un análisis de comparación de secuencias. De este modo se ha asegurado la detección de todos los genotipos relevantes. Además, la especificidad se validó con 100 muestras diferentes de plasma negativas para el CMV. Estas no generaron ninguna señal con los cebadores y las sondas específicos del CMV que se incluyen en la mezcla maestra CMV RG Master.

Se analizó una posible reactividad cruzada del *artus* CMV QS-RGQ Kit mediante el grupo de control indicado en la tabla 1 (a continuación). Ninguno de los patógenos analizados mostró reactividad. No se observó ninguna incidencia de reactividades cruzadas en el caso de infecciones mixtas.

Tabla 1. Análisis de la especificidad del kit con patógenos con posible reactividad cruzada

Grupo de control	CMV (Cycling Green)	Control interno (Cycling Yellow)
Virus del herpes humano 1 (virus del herpes simple 1)	-	+
Virus del herpes humano 2 (virus del herpes simple 2)	-	+
Virus del herpes humano 3 (virus de la varicela-zóster)	-	+
Virus del herpes humano 4 (virus de Epstein-Barr)	-	+
Virus del herpes humano 6A	-	+
Virus del herpes humano 6B	-	+
Virus del herpes humano 7	-	+
Virus del herpes humano 8 (virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi)	-	+
Virus de la hepatitis A	-	+
Virus de la hepatitis B	-	+
Virus de la hepatitis C	-	+
Virus de la inmunodeficiencia humana 1	-	+
Virus de la leucemia de células T humana de tipo 1	-	+
Virus de la leucemia de células T humana de tipo 2	-	+
Virus del Nilo Occidental	-	+
Enterovirus	-	+
Parvovirus B19	-	+

Intervalo lineal: plasma

El intervalo lineal teniendo en cuenta la purificación del *artus* CMV QS-RGQ Kit se determinó mediante el análisis de una serie de diluciones de material viral (CMV) que varía de $1,00 \times 10^8$

copias/ml a $3,16 \times 10^1$ copias/ml en plasma. La purificación se realizó en duplicados ($n = 4$ para concentraciones $\geq 1,00 \times 10^7$ copias/ml; $n = 8$ para concentraciones $< 1,00 \times 10^7$ copias/ml) mediante el QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit en combinación con el protocolo Cellfree1000_DSP (volumen de extracción: 1 ml, volumen de elución: 60 μ l). Cada una de las muestras se analizó con el *artus* CMV QS-RGQ Kit. Se determinó el intervalo lineal teniendo en cuenta la purificación del *artus* CMV QS-RGQ Kit para incluir concentraciones de $7,94 \times 10^1$ copias/ml hasta $1,00 \times 10^8$ copias/ml (correspondientes a $1,30 \times 10^2$ hasta $1,64 \times 10^8$ UI/ml) para plasma (figura 2).

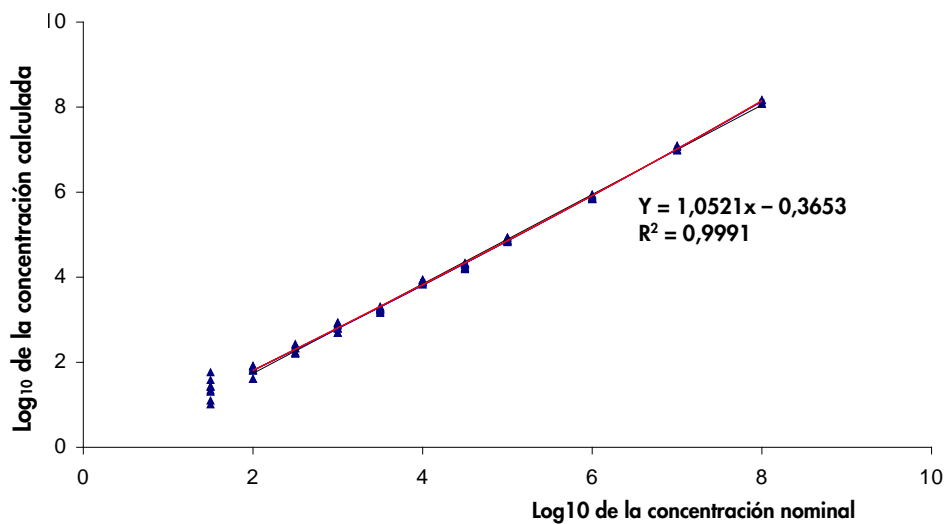


Figura 2. Intervalo lineal del *artus* CMV QS-RGQ Kit (plasma). Cálculo del intervalo lineal. La línea recta se determinó mediante una regresión lineal del \log_{10} de las concentraciones calculadas con el \log_{10} de las concentraciones nominales. En la figura se incluye la ecuación de la línea de regresión.

Robustez: plasma

La verificación de la robustez permite determinar el índice total de fallos del *artus* CMV QS-RGQ Kit. Para verificar la robustez se añadieron 130 copias/ml de CMV (aproximadamente tres veces la concentración del LOD) a 100 muestras de plasma CMV negativas.

Tras realizar la extracción con el QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit en combinación con el protocolo Cellfree1000_DSP para plasma (volumen de extracción: 1 ml, volumen de elución: 60 µl), las muestras se analizaron con el *artus* CMV QS-RGQ Kit. Además, la robustez del control interno se evaluó mediante la purificación y el análisis de las 100 muestras de plasma a las que se había añadido el virus. No se observaron inhibiciones. Así, la robustez del *artus* CMV QS-RGQ Kit es $\geq 99\%$.

Sustancias causantes de interferencias: plasma

Se han identificado cuatro sustancias endógenas (bilirrubina, hemoglobina, triglicéridos y albúmina) en una concentración elevada como posibles sustancias causantes de interferencias presentes en muestras de plasma con EDTA. Sus efectos se evaluaron en plasma que contenía CMV en niveles de aproximadamente 10 veces el valor LOD (425 copias/ml). Como control se incluyeron muestras de plasma a las que se había añadido CMV sin adición de ninguna sustancia causante de interferencia. Todas las muestras, con o sin la adición de sustancias causantes de interferencia, se analizaron en 4 duplicados con el QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit en combinación con el protocolo Cellfree1000 (volumen de extracción: 1 ml, volumen de elución: 60 µl). En las muestras que contenían niveles elevados de inhibidores endógenos (30 mg/dl de bilirrubina, 2 g/dl de hemoglobina, 1 g/dl de triglicéridos y 6 g/dl de albúmina) no se observó interferencia para la detección del CMV.

Evaluación clínica: plasma

El rendimiento clínico del *artus* CMV QS-RGQ Kit se evaluó analizando muestras clínicas y comparando los resultados con los obtenidos con un método de comparación. Se analizó un total de 174 muestras de plasma recogidas en tubos con EDTA de pacientes infectados por el CMV o preparadas artificialmente utilizando el primer estándar de la OMS para el CMV, así como de controles negativos, con el *artus* CMV QS-RGQ Kit y con el método de comparación en un centro externo. La concordancia cualitativa de ambos kits fue del 100%. Se llevó a cabo un análisis de regresión de Deming y Passing-Bablok con el resultado del análisis con el kit de QIAGEN en el eje de ordenadas (Y) y con el resultado del análisis con el método de comparación en el eje de abscisas (X) (consulte la figura 3). La diferencia estimada en \log_{10} (UI/ml) en el punto de decisión médica (1000 UI/ml) entre el kit de QIAGEN y el kit de comparación fue de 0,074 \log_{10} UI/ml, calculado a partir de la regresión de Deming.

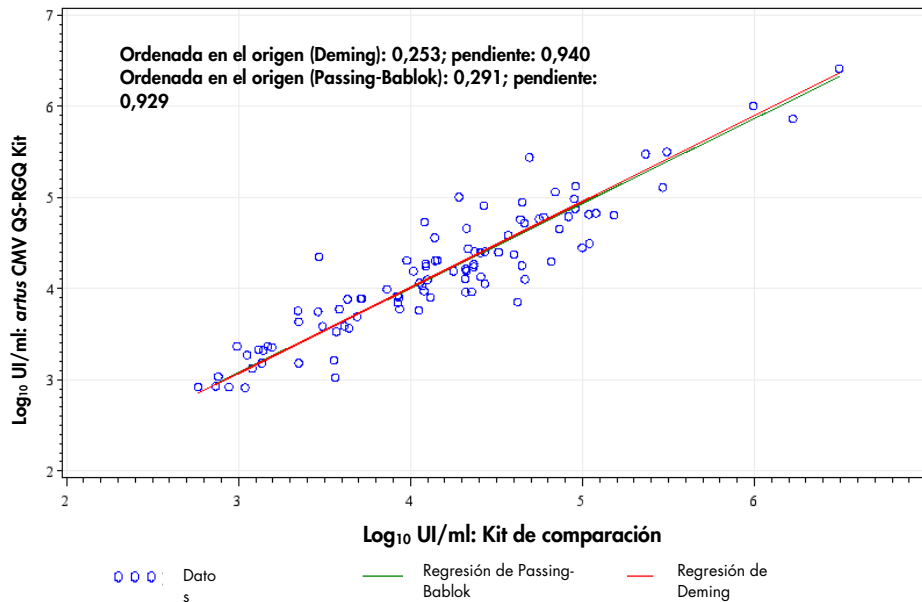


Figura 3. Gráfico de regresión con las líneas de Passing-Bablok y de Deming (plasma). Se incluyeron en el análisis las muestras que se encontraban entre el límite inferior de cuantificación (lower limit of quantification, LLOQ) y el límite superior de cuantificación (upper limit of quantification, ULOQ) para ambos kits.

Se generó un gráfico de Bland-Altman para estudiar la diferencia en el \log_{10} (UI/ml) calculado. Además, se calculó la diferencia media del \log_{10} (UI/ml) y su intervalo del 95% correspondiente y se superpuso en el gráfico (consulte la figura 4).

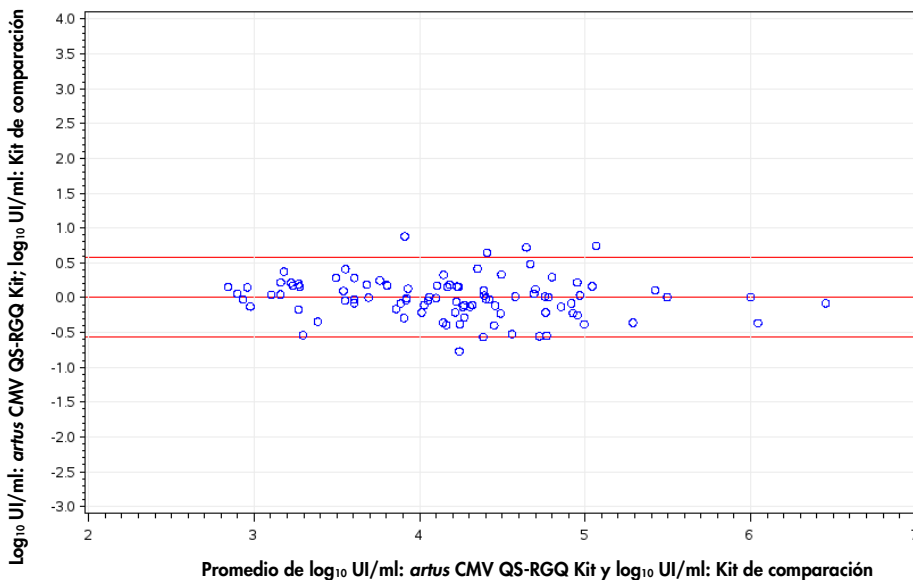


Figura 4. Gráfico de Bland-Altman (plasma). Las líneas de referencia horizontales corresponden a 0,00, -0,57 y 0,58 e indican la diferencia media (\log_{10} UI/ml: artus CMV QS-RGQ Kit; \log_{10} UI/ml: kit de comparación) y su intervalo predictivo del 95% correspondiente. Se incluyeron en el análisis las muestras que se encontraban entre el límite inferior de cuantificación y el límite superior de cuantificación para ambos kits.

Límite de detección: sangre completa

El LOD teniendo en cuenta la purificación (límite de sensibilidad) se evaluó para el *artus* CMV QS-RGQ Kit mediante muestras clínicas CMV positivas en combinación con la extracción con el QIAAsymphony SP.

En el caso de la sangre completa, el LOD teniendo en cuenta la purificación del *artus* CMV QS-RGQ Kit se determinó añadiendo una serie de diluciones de material viral (CMV) de 1000 a 3,16 copias/ml nominales de CMV a muestras clínicas de sangre completa.

Estas se sometieron a la extracción de ADN con el QIAAsymphony DNA Mini Kit en combinación con el protocolo VirusBlood200_DSP (volumen de extracción: 200 µl, volumen de elución: 60 µl). Cada una de las 8 diluciones se analizó con el *artus* CMV QS-RGQ Kit en 3 días diferentes y en 6 series analíticas con 11 duplicados cada una. Los resultados se determinaron mediante un análisis probit.

En la figura 5 se muestra una representación gráfica del análisis probit. El LOD teniendo en cuenta la purificación del *artus* CMV QS-RGQ Kit en combinación con el Rotor-Gene Q es de 164,55 copias/ml ($p = 0,05$). Esto significa que existe una probabilidad del 95% de que se detecten 164,55 copias/ml (correspondientes a 122,59 UI/ml).

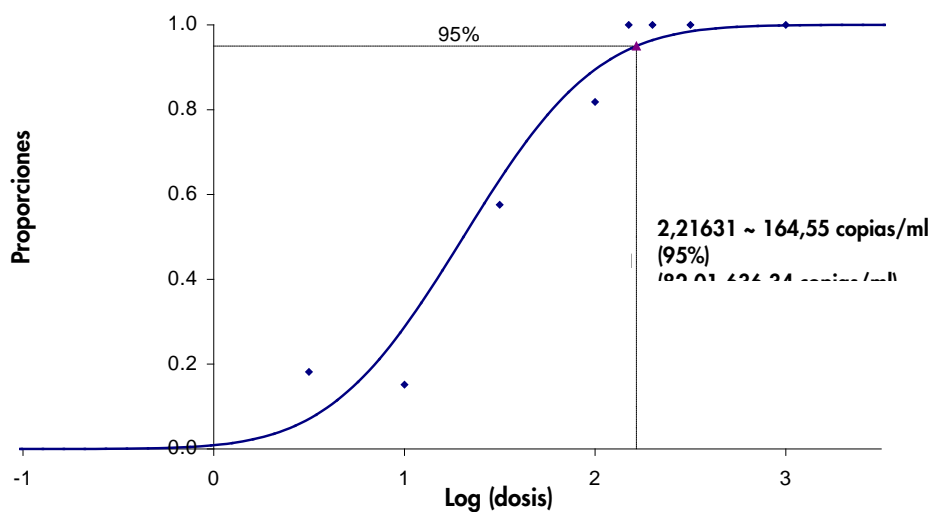


Figura 5. Análisis Probit: sangre completa, CMV (Rotor-Gene Q). Límite de detección teniendo en cuenta la purificación (sangre completa, utilizando el QIAAsymphony DNA Mini Kit) del *artus* CMV QS-RGQ Kit en el Rotor-Gene Q.

Especificidad: sangre completa

La especificidad del *artus* CMV QS-RGQ Kit se asegura ante todo mediante la selección de los cebadores y de las sondas, así como mediante la selección de condiciones estrictas para la reacción. Los cebadores y las sondas se comprobaron con respecto a posibles homologías con todas las secuencias publicadas en los bancos de genes por medio de un análisis de comparación de secuencias. De este modo se ha asegurado la detección de todos los genotipos relevantes.

La especificidad se evaluó además con 100 muestras de sangre completa CMV negativas diferentes. Estas no generaron ninguna señal con los cebadores y las sondas específicos del CMV que se incluyen en la mezcla maestra CMV RG Master.

Se analizó una posible reactividad cruzada del *artus* CMV QS-RGQ Kit mediante el grupo de control indicado en la tabla 1 (véase la página 3). Ninguno de los patógenos analizados mostró reactividad. No se observó ninguna incidencia de reactividad cruzada en el caso de infecciones mixtas.

Intervalo lineal: sangre completa

El intervalo lineal teniendo en cuenta la purificación del *artus* CMV QS-RGQ Kit se determinó mediante el análisis de una serie de diluciones de material viral (CMV) que varía de $5,00 \times 10^7$ a $1,00 \times 10^2$ en sangre completa. La purificación se realizó en duplicados ($n = 4$ para concentraciones $\geq 1,00 \times 10^7$ copias/ml; $n = 8$ para concentraciones $< 1,00 \times 10^7$ copias/ml) mediante el QIA Symphony DNA Mini Kit en combinación con el protocolo VirusBlood200_DSP (volumen de extracción: 200 μ l, volumen de elución: 60 μ l). Cada una de las muestras se analizó con el *artus* CMV QS-RGQ Kit. Se determinó el intervalo lineal teniendo en cuenta la purificación del *artus* CMV QS-RGQ Kit para incluir concentraciones de $1,00 \times 10^3$ copias/ml hasta $5,00 \times 10^7$ copias/ml (correspondientes a $7,45 \times 10^2$ hasta $3,73 \times 10^7$ UI/ml) para sangre completa (figura 6).

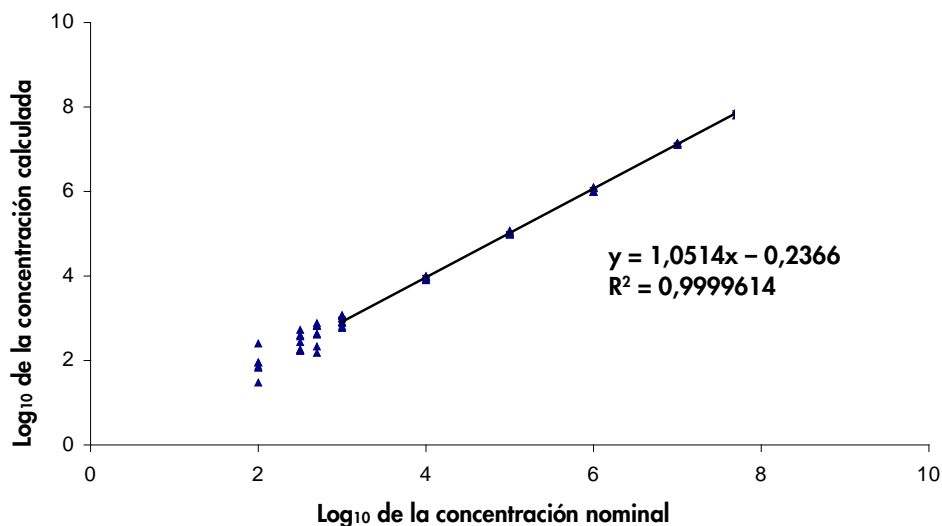


Figura 6. Intervalo lineal del artus CMV QS-RGQ Kit (sangre completa). Cálculo del intervalo lineal. La línea recta se determinó mediante una regresión lineal del \log_{10} de las concentraciones calculadas con el \log_{10} de las concentraciones nominales. En la figura se incluye la ecuación de la línea de regresión.

Robustez: sangre completa

La verificación de la robustez permite determinar el índice total de fallos del artus CMV QS-RGQ Kit. Para verificar la robustez se añadieron 500 copias/ml de CMV (aproximadamente tres veces la concentración del LOD) a 100 muestras de sangre completa de CMV negativas. Tras la extracción mediante el QIAasymphony DNA Mini Kit en combinación con el protocolo VirusBlood200_DSP para sangre completa, estas muestras se analizaron con el artus CMV QS-RGQ Kit. Además, la robustez del control interno se evaluó mediante la purificación y el análisis de 100 muestras de sangre completa adicionadas. No se observaron inhibiciones. Así, la robustez del artus CMV QS-RGQ Kit es $\geq 99\%$.

Sustancias causantes de interferencias: sangre completa

Se han identificado tres sustancias endógenas (bilirrubina, triglicéridos y ADNg) en una concentración elevada como posibles sustancias causantes de interferencias presentes en muestras de sangre completa con EDTA. Sus efectos se evaluaron en sangre completa que contenía CMV en niveles de aproximadamente 10 veces el valor LOD (1650 copias/ml). Como control se incluyeron muestras de sangre completa a las que se había añadido CMV sin adición de ninguna sustancia causante de interferencia. Todas las muestras, con o sin la adición de sustancias causantes de interferencias, se analizaron en 4 duplicados con el QIA Symphony DNA Mini Kit en combinación con el protocolo VirusBlood200_DSP (volumen de extracción: 0,2 ml. volumen de elución: 60 µl). En las muestras que contenían niveles elevados de inhibidores endógenos (30 mg/dl de bilirrubina, 1 g/dl de triglicéridos y hasta 3 µg/muestra de ADNg) no se observó interferencia para la detección del CMV.

Evaluación clínica: sangre completa

El rendimiento clínico del *artus* CMV QS-RGQ Kit se evaluó analizando muestras clínicas y comparando los resultados con los obtenidos con un método de comparación. Se analizó un total de 115 muestras clínicas de sangre completa obtenidas de pacientes infectados por el CMV, así como de controles negativos, con el *artus* CMV QS-RGQ Kit y con el método de comparación en un centro externo. Se llevó a cabo un análisis de regresión de Deming y Passing-Bablok con el resultado del análisis con el kit de QIAGEN en el eje de ordenadas (Y) y con el resultado del análisis con el método de comparación en el eje de abscisas (X) (consulte la figura 7).

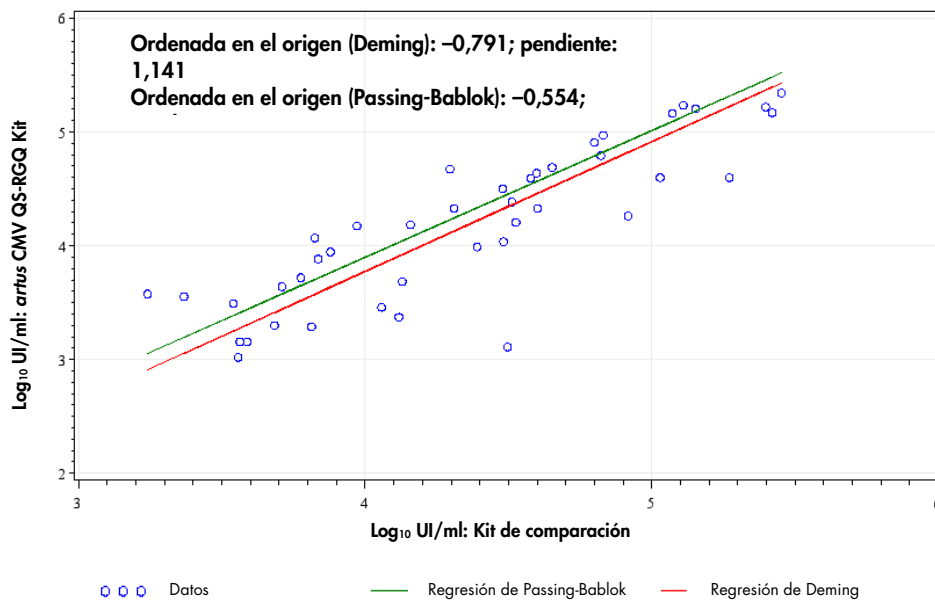


Figura 7. Gráfico de regresión con las líneas de Passing-Bablok y de Deming (sangre completa). Solamente se incluyeron muestras clínicas en el análisis. Se incluyeron en el análisis las muestras que se encontraban entre el límite inferior de cuantificación (lower limit of quantification, LLOQ) y el límite superior de cuantificación (upper limit of quantification, ULOQ) para ambos kits.

Se generó un gráfico de Bland-Altman para estudiar la diferencia en el \log_{10} (UI/ml) calculado. Además, se calculó la diferencia media del \log_{10} (UI/ml) y su intervalo del 95% correspondiente y se superpuso en el gráfico (consulte la figura 8).

La diferencia media en \log_{10} (UI/ml) entre el kit de QIAGEN y el kit de comparación fue de 0,18 \log_{10} UI/ml. La concordancia cualitativa de ambos kits fue del 100%.

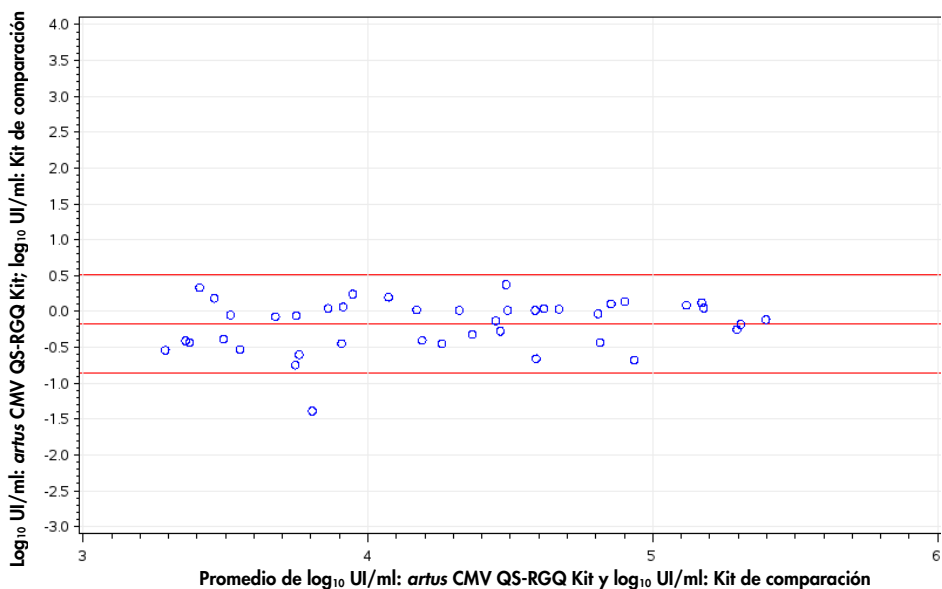


Figura 8. Gráfico de Bland-Altman (sangre completa). Las líneas de referencia horizontales corresponden a $-0,18$, $-0,86$ y $0,51$ e indican la diferencia media (\log_{10} UI/ml: *artus* CMV QS-RGQ Kit; \log_{10} UI/ml: kit de comparación) y su intervalo predictivo del 95% correspondiente. Solamente se incluyeron muestras clínicas en el análisis. Se incluyeron en el análisis las muestras que se encontraban entre el límite inferior de cuantificación y el límite superior de cuantificación para ambos kits.

Precisión

Los datos de precisión del *artus* CMV QS-RGQ Kit permiten la determinación de la varianza total del ensayo. La varianza total consta de la variabilidad intraensayo (variabilidad de múltiples resultados de muestras de la misma concentración en un único experimento), la variabilidad interensayo (variabilidad de múltiples resultados del ensayo generados en diferentes instrumentos del mismo tipo por diferentes operadores en un mismo laboratorio) y la variabilidad interlote (variabilidad de múltiples resultados del ensayo con diferentes lotes). Los datos obtenidos se

utilizaron para determinar la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación para la PCR específica del patógeno y para la PCR del control interno.

Se recopilaron datos de precisión analítica del *artus* CMV QS-RGQ Kit (sin tener en cuenta la purificación) utilizando el estándar de cuantificación de la concentración más baja (QS 4; 10 copias/ μ l). El análisis se realizó por octuplicado. Los datos de precisión se calcularon según los valores de C_T de las curvas de amplificación (C_T : umbral del ciclo, consulte la tabla 2 en la página 12). Además, se determinaron los datos de precisión para los resultados cuantitativos en copias/ μ l mediante los valores C_T correspondientes (tabla 3, página 13). En base a estos resultados, la dispersión estadística de cualquier muestra existente con la concentración mencionada es del 1,21% (C_T) o del 14,38% (concentración) y del 1,93% (C_T) para la detección del control interno. Estos valores se basan en la totalidad de los valores individuales de las variabilidades determinadas.

Tabla 2. Datos de precisión en función de los valores de C_T

	Desviación estándar	Varianza	Coficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo: CMV QS 4	0,17	0,03	0,57
Variabilidad intraensayo: Control interno	0,31	0,10	1,16
Variabilidad interensayo: CMV QS 4	0,38	0,14	1,27
Variabilidad interensayo: Control interno	0,47	0,22	1,77
Variabilidad interlote: CMV QS 4	0,33	0,11	1,10
Variabilidad interlote: Control interno	0,53	0,28	2,02
Varianza total: CMV QS 4	0,36	0,13	1,21
Varianza total: Control interno	0,51	0,26	1,93

Tabla 3. Datos de precisión según los resultados cuantitativos (en copias/μl)

	Desviación estándar	Varianza	Coficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo: CMV QS 4	1,34	1,80	13,30
Variabilidad interensayo: CMV QS 4	1,54	2,38	15,25
Variabilidad interlote: CMV QS 4	1,46	2,12	14,41
Varianza total: CMV QS 4	1,45	2,11	14,38

Reproducibilidad

Los datos de reproducibilidad permiten evaluar periódicamente el rendimiento del *artus* CMV QS-RGQ Kit y comparar su eficiencia con la de otros productos. Estos datos se obtienen por medio de la participación en programas de competencia establecidos.

Contaminación cruzada

Se ha demostrado la ausencia de una contaminación cruzada entre las muestras para el flujo de trabajo completo por medio de la detección correcta de todas las muestras positivas y negativas conocidas en posiciones alternantes (patrón de cuadrícula) para un sistema *artus* QS-RGQ representativo.

En el manual de uso del *artus* CMV QS-RGQ Kit encontrará los productos relacionados y la información para pedidos.

Historial de revisiones del documento

R4, Febrero 2018	Se cambió "sensibilidad analítica" a "límite de detección" o "LOD"; se añadió información sobre las "sustancias interferentes"; se añadieron valores en UI/ml (además de los datos existentes en copias/ml) en función de la información del factor de conversión en las hojas de aplicación respectivas.
------------------	---

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual del usuario o el manual del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales del usuario y los manuales del kit de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, artus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).
Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación. 02/2018 HB-0356-D01-004.
© 2012-2018 QIAGEN, todos los derechos reservados.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Asistencia técnica support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com
