

Fevereiro 2018

artus[®] CMV QS-RGQ Kit: Caraterísticas de desempenho

R4

IVD

CE
0197

REF

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



Verificar a disponibilidade de novas revisões de rotulagem eletrónica em www.qiagen.com/products/artuscmvpcrkitce.aspx antes da realização do teste.

Limite de detecção – plasma

O limite de detecção (limit of detection, LOD) relativo à purificação (limite de sensibilidade) foi avaliado para o *artus* CMV QS-RGQ Kit utilizando amostras clínicas positivas para CMV em combinação com a extração no QIAasymphony® SP.

Para o plasma, o LOD relativo à purificação do *artus* CMV QS-RGQ Kit foi determinado utilizando amostras de plasma clínicas contaminadas com uma série de diluições de material do vírus CMV de 1000 até ao valor nominal de 0,316 cópias de CMV/ml. Estas amostras foram sujeitas a extração de ADN utilizando o QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit em combinação com o protocolo Cellfree1000_DSP (volume de extração: 1 ml, volume de eluição: 60 µl). Cada uma das 10 diluições foi analisada com o *artus* CMV QS-RGQ Kit em 4 dias diferentes, em 4 corridas com 8 modelos de replicação cada. Os resultados foram determinados por análise de probit. A Figura 1 apresenta uma ilustração gráfica da análise de probit. O LOD relativo à purificação do *artus* CMV QS-RGQ Kit em combinação com o Rotor-Gene Q é de 42,5 cópias/ml ($p = 0,05$). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de serem detetadas 42,5 cópias/ml (que correspondem a 69,7 UI/ml).

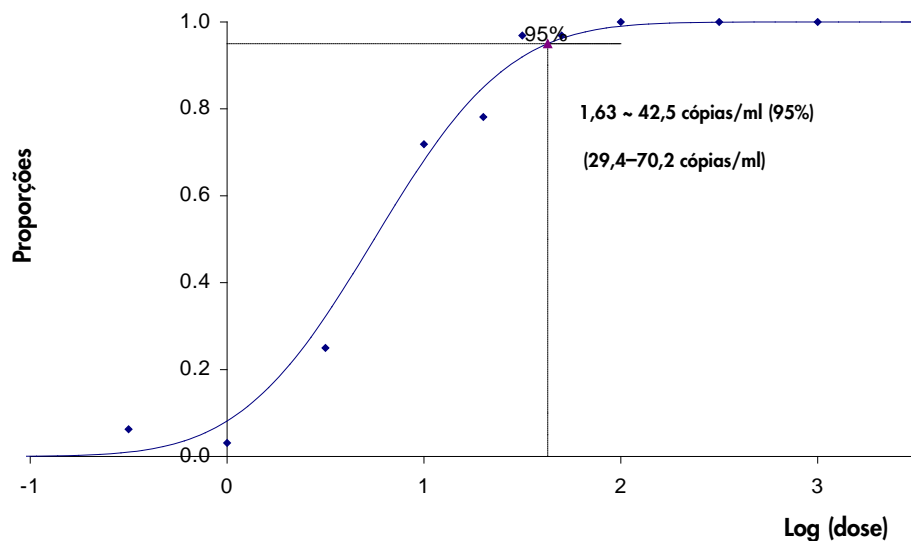


Figura 1. Análise de probit: plasma, CMV (Rotor-Gene Q). Limite de detecção relativo à purificação (plasma, utilizando o QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit) do *artus* CMV QS-RGQ Kit no Rotor-Gene Q.

Especificidade — plasma

A especificidade do *artus* CMV QS-RGQ Kit é, antes de mais, assegurada pela seleção dos iniciadores (primers) e sondas, bem como pela seleção de condições de reação rigorosas. Os iniciadores e as sondas foram verificados em termos de possível homologia com todas as sequências publicadas nos bancos de genes, por análise comparativa de sequências. A detetabilidade de todos os genótipos relevantes foi assim assegurada.

Além disso, a especificidade foi validada com 100 amostras diferentes de plasma negativo para CMV. Estas amostras não geraram quaisquer sinais com os iniciadores e as sondas específicos do CMV, os quais estão incluídos no CMV RG Master.

Foi também testada a possibilidade de reações cruzadas do *artus* CMV QS-RGQ Kit, usando o grupo de controlo listado na Tabela 1 (abaixo). Nenhum dos agentes patogénicos testados demonstrou reatividade. Não se observaram incidências de reações cruzadas com infeções mistas.

Tabela 1. Testes de especificidade do kit com agentes patogénicos com potencial de reação cruzada

Grupo de controlo	CMV (Cycling Green)	Controlo Interno (Cycling Yellow)
Vírus herpes humano 1 (vírus herpes simplex 1)	-	+
Vírus herpes humano 2 (vírus herpes simplex 2)	-	+
Vírus herpes humano 3 (vírus varicela-zoster)	-	+
Vírus herpes humano 4 (vírus Epstein-Barr)	-	+
Vírus herpes humano 6A	-	+
Vírus herpes humano tipo 6B	-	+
Vírus herpes humano 7	-	+
Vírus herpes humano 8 (vírus herpes associado ao sarcoma de Kaposi)	-	+
Vírus da Hepatite A	-	+
Vírus da Hepatite B	-	+
Vírus da Hepatite C	-	+
Vírus da imunodeficiência humana 1	-	+
Vírus da leucemia de células T humano tipo 1	-	+
Vírus da leucemia de células T humano tipo 2	-	+
Vírus do Nilo Ocidental	-	+
Enterovírus	-	+
Parvovírus B19	-	+

Intervalo linear — plasma

O intervalo linear relativo à purificação do *artus* CMV QS-RGQ Kit foi determinado por análise de uma série de diluições do material do vírus CMV, variando entre $1,00 \times 10^8$ cópias/ml e $3,16 \times 10^1$ cópias/ml, em plasma. A purificação foi efetuada em modelos de replicação ($n = 4$ cada para concentrações $\geq 1,00 \times 10^7$ cópias/ml; $n = 8$ cada para concentrações $< 1,00 \times 10^7$ cópias/ml) usando o QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit em combinação com o protocolo Cellfree1000_DSP (volume de extração: 1 ml, volume de eluição: 60 μ l). Cada uma das amostras foi analisada usando o *artus* CMV QS-RGQ Kit. O intervalo linear relativo à purificação do *artus* CMV QS-RGQ Kit foi determinado para abranger as concentrações de $7,94 \times 10^1$ cópias/ml a $1,00 \times 10^8$ cópias/ml (que corresponde a $1,30 \times 10^2$ a $1,64 \times 10^8$ UI/ml) para plasma (Figura 2).

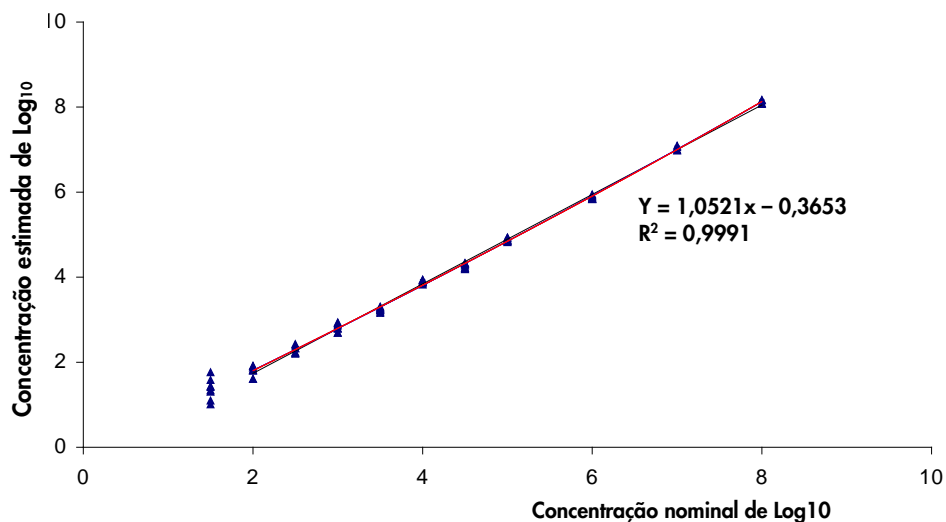


Figura 2. Intervalo linear do artus CMV QS-RGQ Kit (plasma). Cálculo do intervalo linear. A linha reta foi determinada por uma regressão linear das concentrações calculadas de \log_{10} com as concentrações nominais de \log_{10} . A equação da linha de regressão está incluída na figura.

Robustez — plasma

A verificação da robustez permite a determinação da taxa de insucesso total do artus CMV QS-RGQ Kit. Para verificação da robustez, 100 amostras de plasma negativas para CMV foram contaminadas com 130 cópias/ml de CMV (uma concentração aproximadamente 3 vezes superior ao LOD). Após extração usando o QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, em combinação com o protocolo Cellfree1000_DSP, para plasma (volume de extração: 1 ml, volume de eluição: 60 μ l), estas amostras foram analisadas com o artus CMV QS-RGQ Kit. Adicionalmente, a robustez do controlo interno foi avaliada por purificação e análise das 100 amostras de plasma contaminadas. Não foram observadas inibições. A robustez do artus CMV QS-RGQ Kit é, assim, $\geq 99\%$.

Substâncias interferentes – plasma

Foram identificadas quatro substâncias endógenas (bilirrubina, hemoglobina, triglicédeos e proteína albumina) numa elevada concentração como potenciais substâncias interferentes presentes em amostras de plasma tratado com EDTA. Os respetivos efeitos foram avaliados em plasma contendo CMV numa concentração que era aproximadamente 10 vezes o valor do LOD (425 cópias/ml). Como controlo, foram incluídas amostras contaminadas com CMV sem a adição de qualquer substância interferente. Todas as amostras, com ou sem a adição de substâncias interferentes, foram analisadas em 4 modelos de replicação utilizando o QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit em combinação com o protocolo Cellfree1000 (volume de extração: 1

ml, volume de eluição: 60 µl). Para as amostras contendo níveis elevados de inibidores endógenos (bilirrubina 30 mg/dl, hemoglobina 2 g/dl, triglicérides 1 g/dl e proteína albumina 6 g/dl), não foi observada qualquer interferência para a detecção de CMV.

Avaliação clínica – plasma

O desempenho clínico do *artus* CMV QS-RGQ Kit foi avaliado testando amostras clínicas e analisando os resultados obtidos relativamente aos resultados de um método de comparação. Foi testado um total de 174 amostras de plasma, colhidas em tubos com EDTA, de doentes infetados por CMV ou preparadas artificialmente utilizando o primeiro padrão da OMS (Organização Mundial de Saúde) para o CMV, assim como de controlos negativos, com o *artus* CMV QS-RGQ Kit e o método de comparação num local externo. A concordância qualitativa de ambos os kits foi de 100%. Foram realizadas análises de regressão de Deming e de Passing-Bablok com o resultado do teste do kit QIAGEN no eixo Y e o resultado do teste de comparação no eixo X (consultar a figura 3). A diferença prevista no \log_{10} (UI/ml) no ponto de decisão médica (1000 UI/ml) entre o kit QIAGEN e o kit de comparação foi de 0,074 \log_{10} UI/ml, conforme o cálculo obtido da regressão de Deming.

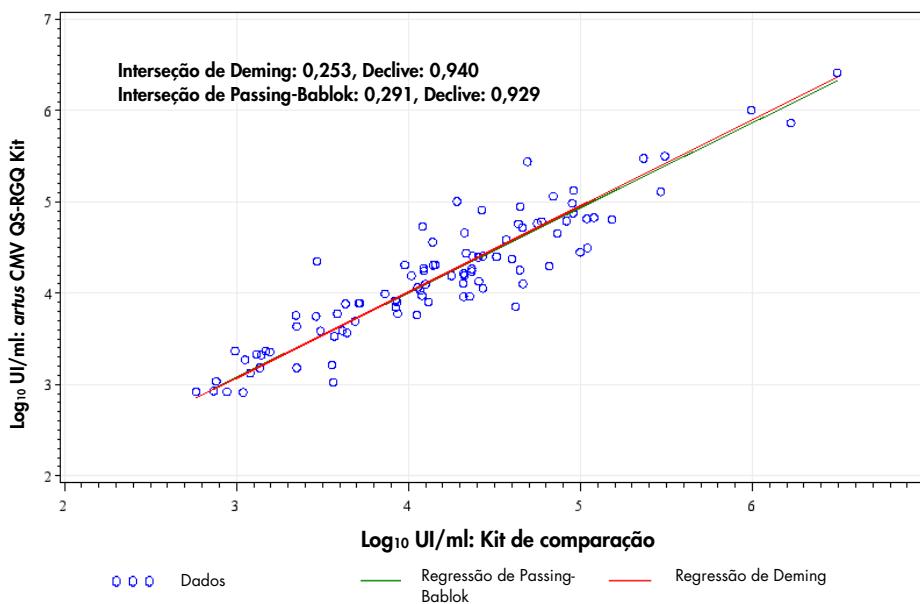


Figura 3. Gráfico de regressão com linhas de Passing-Bablok e de Deming (plasma). Foram incluídas na análise as amostras que se encontravam entre o limite inferior de quantificação (lower limit of quantification, LLOQ) e o limite superior de quantificação (upper limit of quantification, ULOQ) para ambos os kits.

Foi produzido um gráfico de Bland-Altman para avaliar a diferença no \log_{10} calculado (UI/ml). Além disso, foi calculada a diferença média do \log_{10} (UI/ml) e o intervalo de 95% correspondente, e colocados em sobreposição no gráfico (consultar a Figura 4).

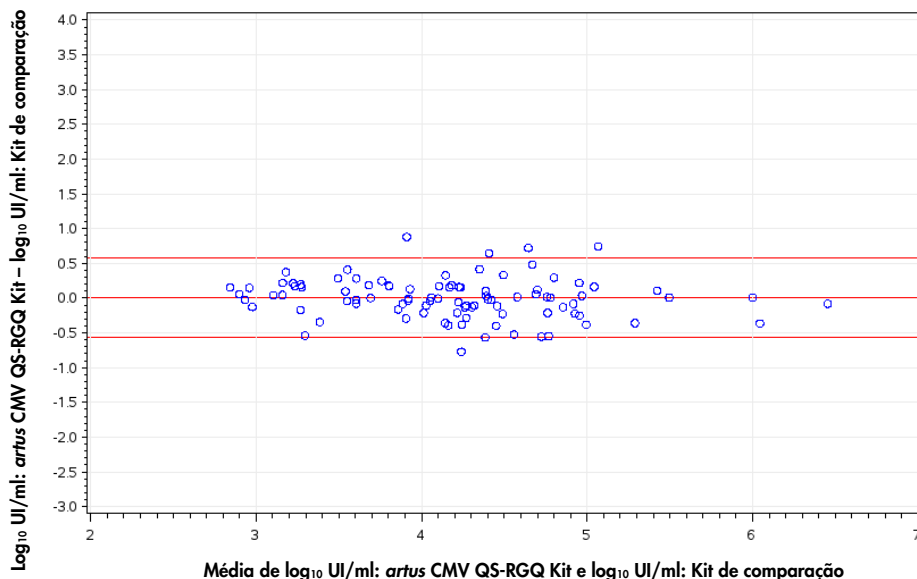


Figura 4. Gráfico de Bland-Altman (plasma). As linhas de referência horizontal localizam-se em 0,00, -0,57 e 0,58 e indicam a diferença média (\log_{10} UI/ml: *artus* CMV QS-RGQ Kit – \log_{10} UI/ml: kit de comparação) e o respectivo intervalo de previsão de 95% correspondente. Foram incluídas na análise as amostras que se encontravam entre o limite inferior de quantificação e o limite superior de quantificação para ambos os kits.

Limite de detecção – sangue total

O LOD relativo à purificação (limite de sensibilidade) foi avaliado para o *artus* CMV QS-RGQ Kit utilizando amostras clínicas positivas para CMV em combinação com a extração no QIAAsymphony SP.

Para o sangue total, o LOD relativo à purificação do *artus* CMV QS-RGQ Kit foi determinado utilizando amostras de sangue total humano contaminadas com uma série de diluições de material do vírus CMV de 1000 até ao valor nominal de 3,16 cópias de CMV/ml.

Estas amostras foram sujeitas a extração de ADN utilizando o QIAAsymphony DNA Mini Kit em combinação com o protocolo VirusBlood200_DSP (volume de extração: 200 μ l, volume de eluição: 60 μ l). Cada uma das 8 diluições foi analisada com o *artus* CMV QS-RGQ Kit em 3 dias diferentes, em 6 corridas com 11 modelos de replicação cada. Os resultados foram determinados por análise de probit.

A Figura 5 apresenta uma ilustração gráfica da análise de probit. O LOD relativo à purificação do *artus* CMV QS-RGQ Kit em combinação com o Rotor-Gene Q é de 164,55 cópias/ml ($p = 0,05$). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de serem detetadas 164,55 cópias/ml (que correspondem a 122,59 UI/ml).

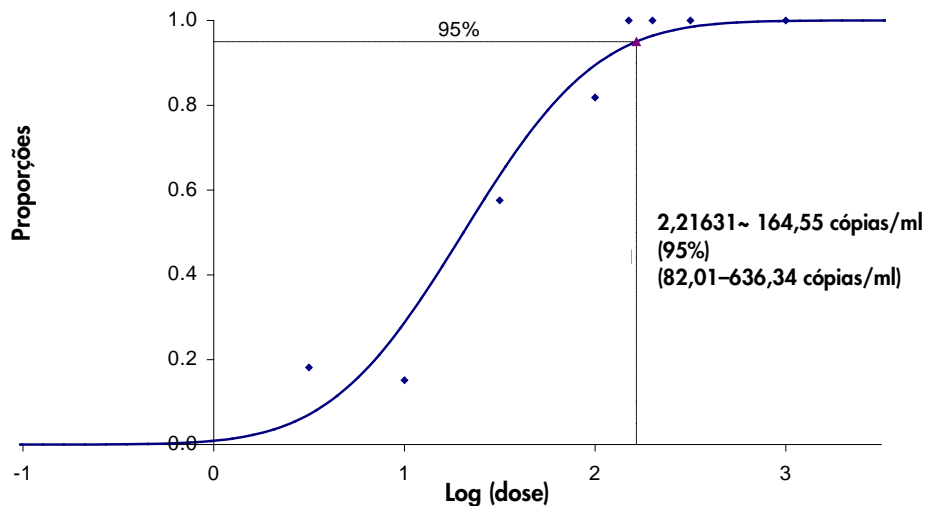


Figura 5. Análise de probit: sangue total, CMV (Rotor-Gene Q). Limite de detecção relativo à purificação (sangue total, utilizando o QIAAsymphony DNA Mini Kit) do *artus* CMV QS-RGQ Kit no Rotor-Gene Q.

Especificidade — sangue total

A especificidade do *artus* CMV QS-RGQ Kit é, antes de mais, assegurada pela seleção dos iniciadores (primers) e sondas, bem como pela seleção de condições de reação rigorosas. Os iniciadores e as sondas foram verificados em termos de possível homologia com todas as sequências publicadas nos bancos de genes, por análise comparativa de sequências. A detetabilidade de todos os genótipos relevantes foi assim assegurada.

Além disso, a especificidade foi validada com 100 amostras diferentes de sangue total negativo para CMV. Estas amostras não geraram quaisquer sinais com os iniciadores e as sondas específicos do CMV, os quais estão incluídos no CMV RG Master.

Foi também testada a possibilidade de reações cruzadas do *artus* CMV QS-RGQ Kit, utilizando o grupo de controlo listado na Tabela 1 (consultar a página 4). Nenhum dos agentes patogénicos testados demonstrou reatividade. Não se observaram incidências de reações cruzadas com infeções mistas.

Intervalo linear – sangue total

O intervalo linear relativo à purificação do *artus* CMV QS-RGQ Kit foi determinado por análise de uma série de diluições do material do vírus CMV, variando entre $5,00 \times 10^7$ e $1,00 \times 10^2$, em sangue total. A purificação foi efetuada em modelos de replicação ($n = 4$ para concentrações $\geq 1,00 \times 10^7$ cópias/ml; $n = 8$ cada para concentrações $< 1,00 \times 10^7$ cópias/ml) usando o QIASymphony DNA Mini Kit em combinação com o protocolo VirusBlood200_DSP (volume de extração: 200 μ l, volume de eluição: 60 μ l). Cada uma das amostras foi analisada usando o *artus* CMV QS-RGQ Kit. O intervalo linear relativo à purificação do *artus* CMV QS-RGQ Kit foi determinado para abranger as concentrações de $1,00 \times 10^3$ cópias/ml a $5,00 \times 10^7$ cópias/ml (que corresponde a $7,45 \times 10^2$ a $3,73 \times 10^7$ UI/ml) para sangue total (Figura 6).

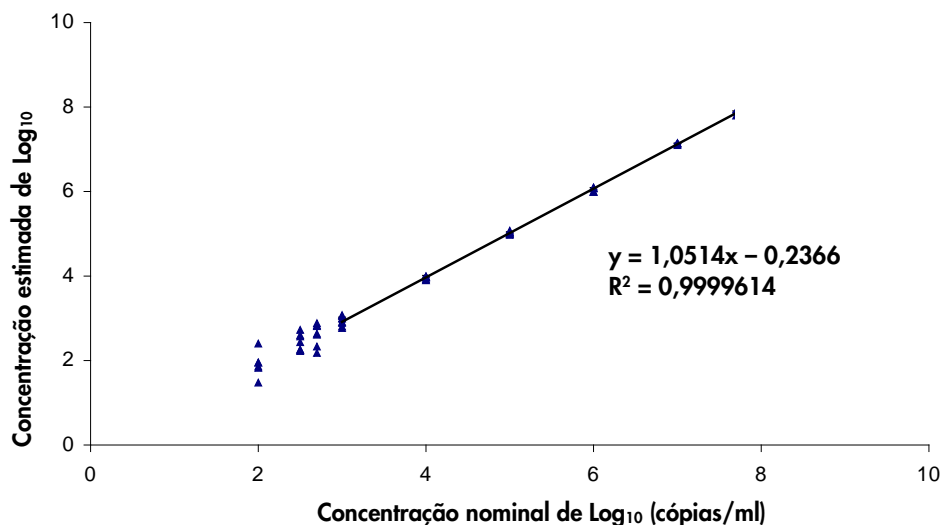


Figura 6. Intervalo linear do *artus* CMV QS-RGQ Kit (sangue total). Cálculo do intervalo linear. A linha reta foi determinada por uma regressão linear das concentrações calculadas de \log_{10} com as concentrações nominais de \log_{10} . A equação da linha de regressão está incluída na figura.

Robustez – sangue total

A verificação da robustez permite a determinação da taxa de insucesso total do *artus* CMV QS-RGQ Kit. Para verificação da robustez, 100 amostras de sangue total negativas para CMV foram contaminadas com 500 cópias/ml de CMV (uma concentração aproximadamente 3 vezes superior ao LOD). Após extração usando o QIASymphony DNA Mini Kit, em conjunto com o protocolo VirusBlood200_DSP para sangue total, estas amostras foram analisadas com o *artus* CMV QS-RGQ Kit. Adicionalmente, a robustez do controle interno foi avaliada por purificação e análise das 100 amostras de sangue total contaminadas. Não foram observadas inibições. A robustez do *artus* CMV QS-RGQ Kit é, assim, $\geq 99\%$.

Substâncias interferentes – sangue total

Foram identificadas três substâncias endógenas (bilirrubina, triglicerídeos e gADN) numa elevada concentração como potenciais substâncias interferentes presentes em amostras de sangue total tratado com EDTA. Os respetivos efeitos foram avaliados em sangue total contendo CMV numa concentração que era aproximadamente 10 vezes o valor do LOD (1650 cópias/ml). Como controlo, foram incluídas amostras de sangue total contaminadas com CMV sem a adição de qualquer substância interferente. Todas as amostras, com ou sem a adição de substâncias interferentes, foram analisadas em 4 modelos de replicação utilizando o QIASymphony DNA Mini Kit em combinação com o protocolo VirusBlood200_DSP (volume de extração: 0,2 ml, volume de eluição: 60 µl). Para as amostras contendo níveis elevados de inibidores endógenos (bilirrubina 30 mg/dl, triglicerídeos 1 g/dl e gADN até 3 µg/amostra), não foi observada qualquer interferência para a deteção de CMV.

Avaliação clínica – sangue total

O desempenho clínico do *artus* CMV QS-RGQ Kit foi avaliado testando amostras clínicas e analisando os resultados obtidos relativamente aos resultados de um método de comparação. Foi testado um total de 115 amostras clínicas de sangue total colhidas em doentes infetados por CMV, assim como de controlos negativos, com o *artus* CMV QS-RGQ Kit e o método de comparação num local externo. Foram realizadas análises de regressão de Deming e de Passing-Bablok com o resultado do teste do kit QIAGEN no eixo Y e o resultado do teste de comparação no eixo X (consultar a figura 7).

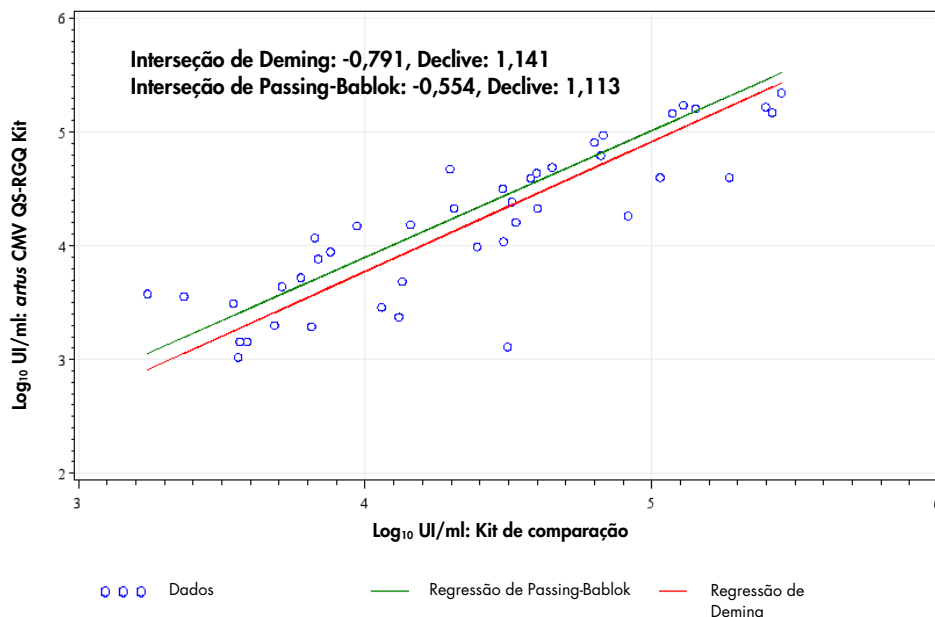


Figura 7. Gráfico de regressão com linhas de Passing-Bablok e de Deming (sangue total). Apenas amostras clínicas incluídas na análise. Foram incluídas na análise as amostras que se encontravam entre o limite inferior de quantificação (lower limit of quantification, LLOQ) e o limite superior de quantificação (upper limit of quantification, ULOQ) para ambos os kits.

Foi produzido um gráfico de Bland-Altman para avaliar a diferença no \log_{10} calculado (UI/ml). Além disso, foi calculada a diferença média do \log_{10} (UI/ml) e o intervalo de 95% correspondente, e colocados em sobreposição no gráfico (consultar a figura 8).

A diferença média no \log_{10} (UI/ml) entre o kit QIAGEN e o kit de comparação foi de 0,18 \log_{10} UI/ml. A concordância qualitativa de ambos os kits foi de 100%.

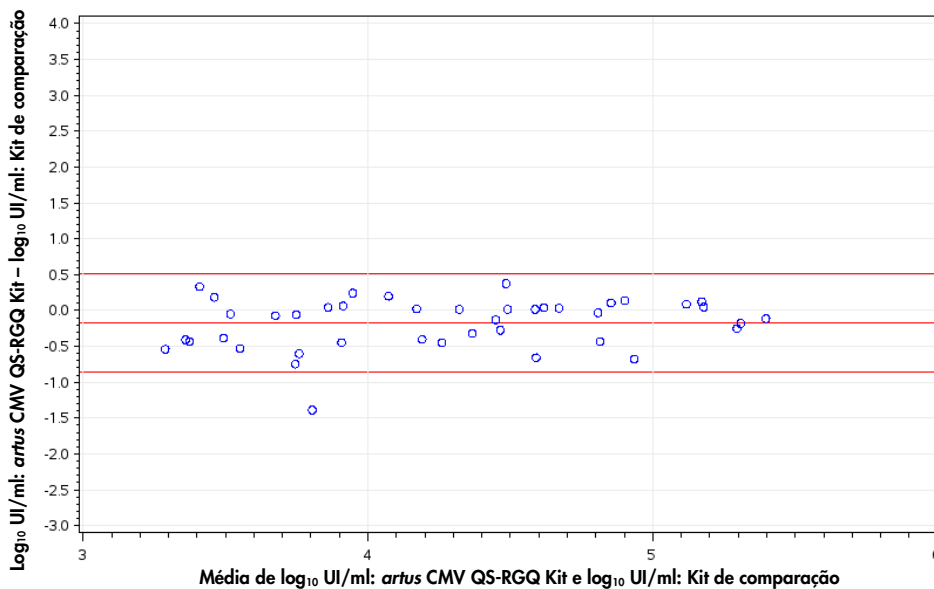


Figura 8. Gráfico de Bland-Altman (sangue total). As linhas de referência horizontais localizam-se em -0,18 -0,86 e 0,51 e indicam a diferença média (\log_{10} UI/ml: *artus* CMV QS-RGQ Kit – \log_{10} UI/ml: kit de comparação) e intervalo de previsão de 95% correspondente. Foram incluídas na análise apenas amostras clínicas. Foram incluídas na análise as amostras que se encontravam entre o limite inferior de quantificação e o limite superior de quantificação para ambos os kits.

Precisão

Os dados de precisão do *artus* CMV QS-RGQ Kit permitem a determinação da variância total do ensaio. A variância total consiste na variabilidade intra-ensaio (variabilidade de múltiplos resultados de amostras da mesma concentração num ensaio), na variabilidade entre ensaios (variabilidade de múltiplos resultados do ensaio gerados nos diversos instrumentos do mesmo tipo, por diferentes operadores num laboratório) e na variabilidade entre lotes (variabilidade de múltiplos resultados do ensaio utilizando diversos lotes). Os dados obtidos foram utilizados para determinar o desvio padrão, a variância e o coeficiente de variação para o agente patogénico específico e a PCR de controlo interno.

Os dados de precisão analítica do *artus* CMV QS-RGQ Kit (sem considerar a purificação) foram recolhidos usando o padrão de quantificação da concentração mais baixa (QS 4; 10 cópias/ μ l).

O teste foi realizado com 8 modelos de replicações. Os dados de precisão foram calculados com base nos valores de C_T das curvas de amplificação (C_T : limiar do ciclo, consultar a Tabela 2, página 12). Além disso, foram determinados dados de precisão para resultados quantitativos em cópias/ μ l, utilizando os valores de C_T correspondentes (Tabela 3, página 12). Tendo por base estes resultados, a dispersão estatística global de uma dada amostra com a concentração referida é de 1,21% (C_T) ou 14,38% (concentração), e 1,93% (C_T) para a deteção do controlo interno. Estes valores baseiam-se na totalidade de todos os valores individuais das variabilidades determinadas.

Tabela 2. Dados de precisão em função dos valores de C_T

	Desvio padrão	Variância	Coefficiente de variação (%)
Variabilidade intra-ensaio: CMV QS 4	0,17	0,03	0,57
Variabilidade intra-ensaio: Controlo interno	0,31	0,10	1,16
Variabilidade entre ensaios: CMV QS 4	0,38	0,14	1,27
Variabilidade entre ensaios: Controlo interno	0,47	0,22	1,77
Variabilidade entre lotes: CMV QS 4	0,33	0,11	1,10
Variabilidade entre lotes: Controlo interno	0,53	0,28	2,02
Variância total: CMV QS 4	0,36	0,13	1,21
Variância total: Controlo interno	0,51	0,26	1,93

Tabela 3. Dados de precisão com base nos resultados quantitativos (em cópias/ μ l)

	Desvio padrão	Variância	Coefficiente de variação (%)
Variabilidade intra-ensaio: CMV QS 4	1,34	1,80	13,30
Variabilidade entre ensaios: CMV QS 4	1,54	2,38	15,25
Variabilidade entre lotes: CMV QS 4	1,46	2,12	14,41
Variância total: CMV QS 4	1,45	2,11	14,38

Reprodutibilidade

Os dados de reprodutibilidade permitem uma avaliação regular do desempenho do *artus* CMV QS-RGQ Kit, bem como uma comparação de eficiência com outros produtos. Estes dados foram obtidos pela participação em programas de proficiência estabelecidos.

Contaminação cruzada

A ausência de contaminação cruzada entre amostras para a totalidade do processo foi comprovada pela detecção correta de todas as amostras positivas e negativas conhecidas, em posições alternadas (padrão xadrez) para um sistema *artus* QS-RGQ representativo.

Os produtos relacionados e as informações de encomenda estão listados no manual do *artus* CMV QS-RGQ Kit.

Histórico de revisões do documento

R4, fevereiro 2018	"Sensibilidade analítica" alterado para "limite de detecção" ou "LOD"; foram adicionadas informações sobre "substâncias interferentes"; foram adicionados valores em UI/ml (além dos dados existentes em cópias/ml), com base nas informações do fator de conversão nas respectivas Folhas de Aplicação.
--------------------	--

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncias de responsabilidade específicas do produto, consultar os manuais do kit QIAGEN ou do utilizador. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, artus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).
Os nomes registados, as marcas comerciais, etc., utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados especificamente como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei. 02/2018 HB-0356-D01-004.
© 2012-2018 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Encomendas www.qiagen.com/shop | Assistência técnica support.qiagen.com | Website
www.qiagen.com
