

Outubro de 2015

Kit *artus*[®] VZV QS-RGQ: Características de desempenho

Kit artus VZV QS-RGQ, versão 1

REF

4502363



Verificar a disponibilidade de novas revisões de rotulagem eletrónica em www.qiagen.com/products/artusvzvpcrkitce.aspx antes da realização do teste. O estado de revisão atual é indicado pela data de lançamento (formato: mês/ano).

Sensibilidade analítica – líquido cefalorraquidiano humano (LCR)

O limite de detecção analítica relativo à purificação (limite de sensibilidade) foi avaliado para o kit *artus* VZV QS-RGQ utilizando amostras clínicas positivas para VVZ em combinação com a extração no QIAAsymphony® SP.

A sensibilidade analítica relativa à purificação do kit *artus* VZV QS-RGQ foi determinada com recurso a amostras de líquido cefalorraquidiano humano (LCR) contaminadas com uma série de diluições de material da estirpe Ellen do VVZ de 1420 ao valor nominal de 4,5 cópias/ml do VVZ. Estas foram sujeitas a extração de ADN com o kit QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini em conjunto com o protocolo Cellfree200_DSP (volume de extração: 0,2 ml, volume de eluição: 60 µl). Cada uma das 8 diluições foi analisada com o kit *artus* VZV QS-RGQ em 3 dias diferentes, em 3 ensaios com 11 modelos de replicação cada. Os resultados foram determinados por análise de probit. A figura 1 representa uma ilustração gráfica da análise de probit. O limite de detecção analítica relativa à purificação do kit *artus* VZV QS-RGQ em combinação com o Rotor-Gene Q é de 80,67 cópias/ml ($p = 0,05$). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite de 80,67 cópias/ml ser detetado.

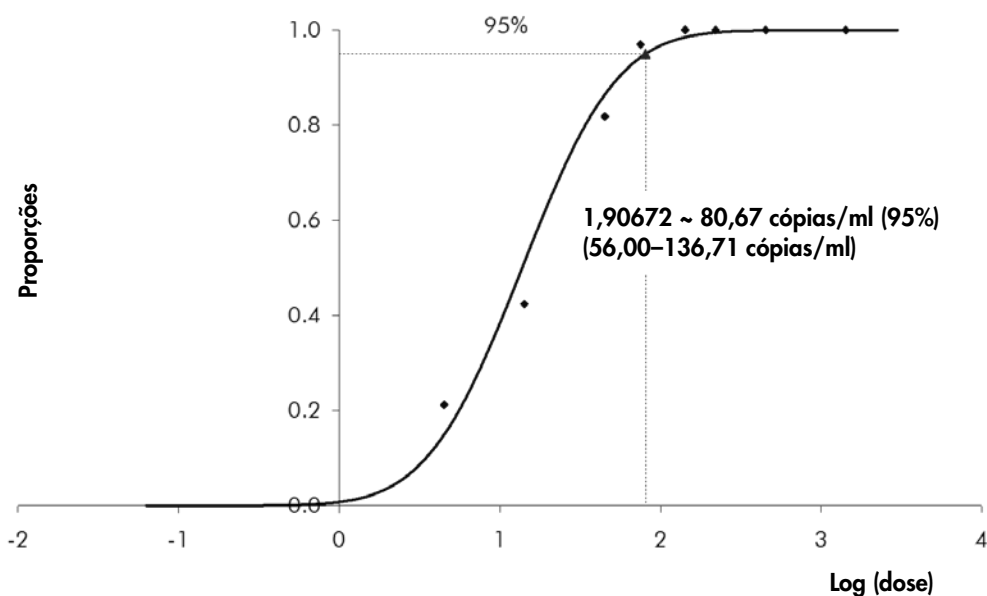


Figura 1: Análise de probit: LCR, VVZ (Rotor-Gene Q). Sensibilidade analítica relativa à purificação (kit QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini) do kit *artus* VZV QS-RGQ no Rotor-Gene Q.

Especificidade – líquido cefalorraquidiano (LCR)

A especificidade do kit *artus* VZV QS-RGQ é, antes de mais, assegurada pela seleção dos primers e sondas, bem como pela seleção de condições de reação rigorosas. Os primers 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 30 amostras diferentes de líquido cefalorraquidiano (LCR) negativo para o VVZ. Estas não geraram quaisquer sinais com os primers e sondas específicos do VVZ, os quais estão incluídos no VZV RG Master.

Foi também testada a possibilidade de reações cruzadas do kit *artus* VZV QS-RGQ usando o grupo de controlo listado na tabela 1. Nenhum dos agentes patogénicos testados demonstrou reatividade. Não ocorreram reações cruzadas com infeções mistas.

Tabela 1. Testes de especificidade do kit com agentes patogénicos com potencial de reação cruzada (líquido cefalorraquidiano - LCR)

Grupo de controlo	VVZ (Cycling Green)	Controlo interno (Cycling Orange)
Vírus herpes humano 1 (vírus herpes simplex 1)	-	+
Vírus herpes humano 2 (vírus herpes simplex 2)	-	+
Vírus herpes humano 4 (vírus Epstein-Barr)	-	+
Vírus do herpes humano tipo 5 (citomegalovírus)	-	+
Vírus do herpes humano 6A	-	+
Vírus do herpes humano 6B	-	+
Vírus do herpes humano 7	-	+
Vírus do 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	-	+
Enterovírus	-	+
Parvovírus B19	-	+
Vírus da Febre do Vale do Nilo	-	+

Intervalo linear – líquido cefalorraquidiano (LCR)

O intervalo linear relativo à purificação do kit *artus* VZV QS-RGQ foi determinado por análise de uma série de diluições do material de referência da estirpe Ellen do VZV ATCC® VR-1367 variando entre $1,00 \times 10^8$ cópias/ml e $5,00 \times 10^1$ cópias/ml. 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 Kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini em combinação com o protocolo Cellfree200_DSP (volume de extração: 0,2 ml, volume de eluição: 60 μ l). Cada uma das amostras foi analisada usando o kit *artus* VZV QS-RGQ. O intervalo linear relativo à purificação do kit *artus* VZV QS-RGQ foi determinado para abranger as concentrações de $5,00 \times 10^2$ cópias/ml a $1,00 \times 10^8$ cópias/ml (figura 2).

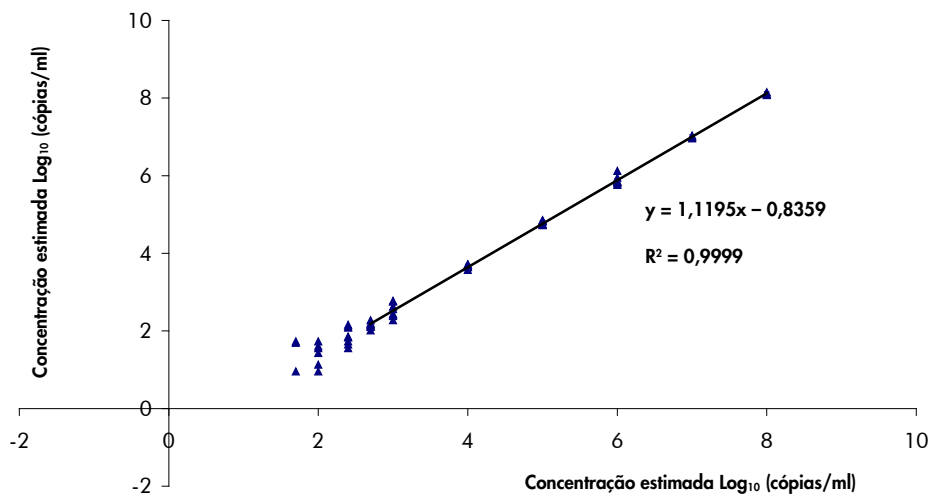


Figura 2. Intervalo linear para o kit *artus* VZV QS-RGQ (LCR). Cálculo do intervalo linear. A linha reta foi determinada por uma regressão linear das concentrações calculadas de log₁₀ com as concentrações nominais de log₁₀. A equação da linha de regressão está incluída na figura.

Robustez – líquido cefalorraquidiano (LCR)

A verificação da robustez permite a determinação da taxa de insucesso total do kit *artus* VZV QS-RGQ. Para verificação da robustez, 30 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) negativo para o VVZ foram contaminadas com 300 cópias/ml de material do vírus VVZ (uma concentração aproximadamente três vezes superior ao limite de sensibilidade analítica). Após extração usando o kit QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Mini, em conjunto com o protocolo Cellfree200_DSP (volume de extração: 0,2 ml, volume de eluição: 60 µl), estas amostras foram analisadas com o kit *artus* VZV QS-RGQ.

Adicionalmente, a robustez do controlo interno foi avaliada por purificação e análise das 30 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) contaminadas. Não foram observadas inibições. A robustez do kit *artus* VZV QS-RGQ é, assim, $\geq 99\%$.

Substâncias interferentes – líquido cefalorraquidiano (LCR)

Os eritrócitos e o ADN genómico são duas substâncias endógenas que podem provocar interferências nos ensaios quando presentes no LCR. Para investigar o seu potencial interferente, o efeito destas substâncias ao nível do desempenho do ensaio foi avaliado em amostras de LCR que continham o VVZ numa concentração de, aproximadamente, 10 vezes o valor do limite de deteção (LOD) (1000 cópias/ml). Estas substâncias demonstraram não provocar qualquer interferência com os reagentes do kit *artus* VZV QS-RGQ (consultar a tabela 2).

Tabela 2. Substâncias interferentes em amostras de LCR

Concentração de VVZ (cópias/ml)	Substância interferente		$C_{T(IC)}$			$C_{T(IC)IS} - C_{T(IC)Controlo}$
	Item	Concentração	C_T médio	DP	CV (%)	Absoluto
1000	Eritrócitos	–	23,45	0,06	0,24	0,13
	gADN	10 000	23,51	0,02	0,09	0,07
	gADN	100 000	23,78	0,11	0,45	0,20
	Controlo	–	23,58	0,06	0,26	–

CV: coeficiente de variação; IC: controlo interno; SI: substância interferente; DP: desvio padrão.

Avaliação clínica – líquido cefalorraquidiano (LCR)

O desempenho clínico do kit *artus* VZV QS-RGQ foi avaliado, testando um total de 163 amostras forçadas e analisando os resultados obtidos relativamente aos resultados de um método comparável num laboratório clínico externo. Os resultados foram analisados em duas partes: a parte um consistia numa análise de concordância categórica de Percentagem de Concordância Positiva, Percentagem de Concordância Negativa e Percentagem de Concordância Geral; a parte dois consistia numa análise dos resultados de um total de 75 amostras de LCR que recaíam no intervalo dinâmico de ensaio comum utilizando as análises de regressão Deming e Passing-Bablok, sendo os resultados reportados juntamente com a intersecção e o declive correspondentes (consultar a tabela 3 e a figura 3).

Tabela 3. Dados do estudo de desempenho clínico para amostras de plasma com EDTA

Medida de concordância	Frequências	Percentagem de concordância	Limite de confiança de 95% bilateral binomial (exato) inferior Clopper-Pearson	Limite de confiança de 95% bilateral binomial (exato) superior Clopper-Pearson
Percentagem de concordância geral	163/163	100,00	97,76	100,00
Percentagem de concordância positiva	100/100	100,00	96,38	100,00
Percentagem de concordância negativa	63/63	100,00	94,31	100,00

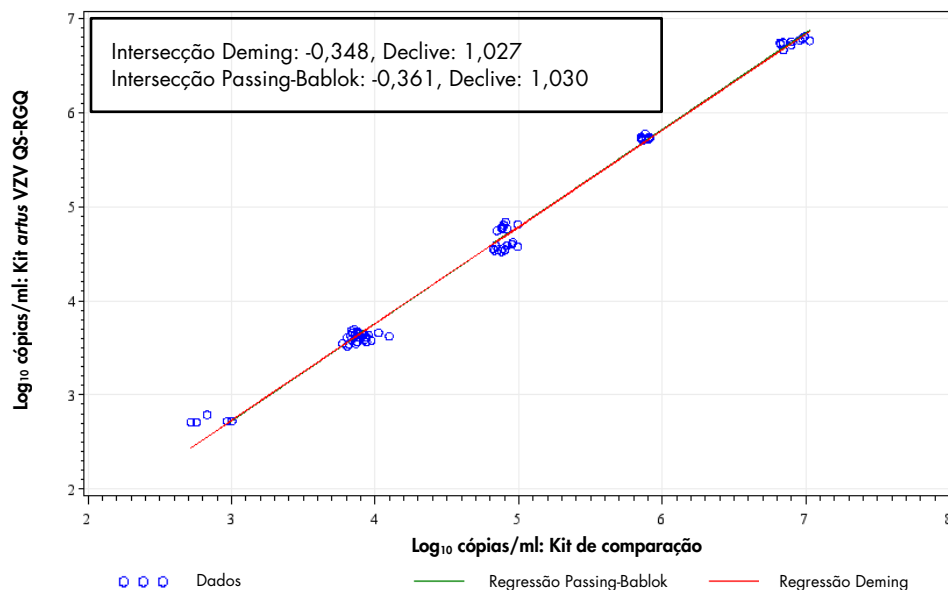


Figura 3. Gráfico de regressão com linhas Passing-Bablok e Deming para amostras de LCR. Foram incluídas na análise as amostras que se encontram entre o limite inferior de quantificação e o limite superior de quantificação para ambos os kits.

O gráfico Bland-Altman na figura 4 mostra que a diferença média aproximada do log entre os kits é de 0,22 e que esta diferença não é influenciada pela concentração de teste.

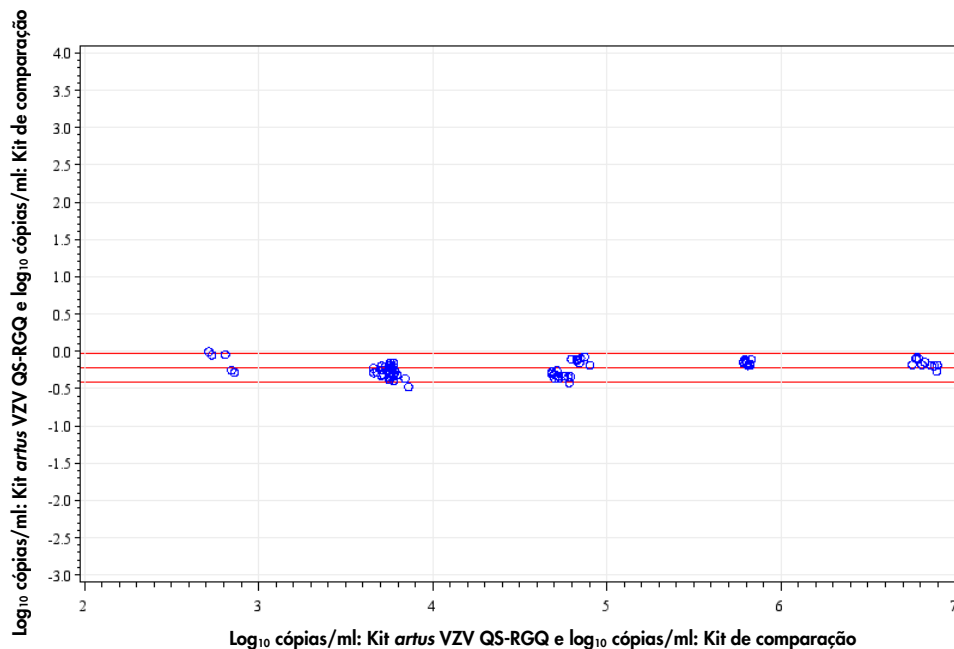


Figura 4: Gráfico Bland-Altman (plasma). As linhas de referência horizontais localizam-se em $-0,22$, $-0,42$, e $-0,03$ e indicam a diferença média (\log_{10} cópias/ml: kit *artus* VZV QS-RGQ – \log_{10} cópias/ml: kit de comparação) e o intervalo de previsão de 95% correspondente. Foram incluídas na análise as amostras que se encontravam entre o limite inferior de quantificação e o limite superior de quantificação para ambos os kits.

Sensibilidade analítica – plasma

Para o plasma, a sensibilidade analítica relativa à purificação do kit *artus* VZV QS-RGQ foi determinada utilizando plasma humano contaminado com uma série de diluições de material vírico de 100 a 0,316 cópias/ml.

Estas foram sujeitas a extração de ADN com o kit QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi em conjunto com o protocolo Cellfree200_DSP (volume de extração: 1 ml, volume de eluição: 60 μ l). Cada uma das 8 diluições foi analisada com o kit *artus* VSV QS-RGQ em 4 dias diferentes, em 4 ensaios com 11 modelos de replicação cada. Os resultados foram determinados por análise de probit.

É apresentada uma ilustração gráfica da análise de probit na figura 5. O limite de detecção analítica para o VVZ relativa à purificação do kit *artus* VZV QS-RGQ em combinação com o Rotor-Gene Q é de 12,725 cópias/ml ($p = 0,05$). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite de 12,725 cópias/ml ser detetado.

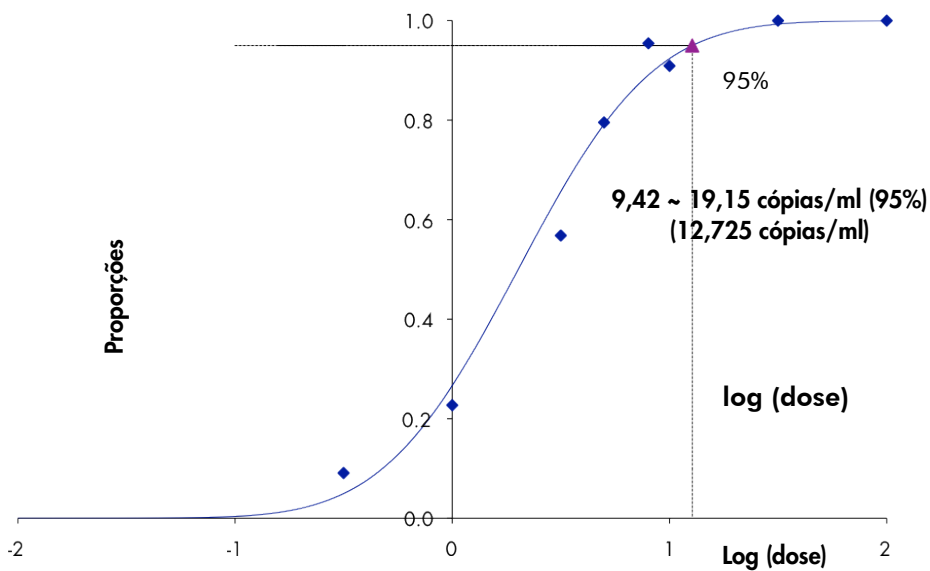


Figura 5. Análise de probit: plasma, VVZ (Rotor-Gene Q). Sensibilidade analítica relativa à purificação (utilizando o kit QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi) e o kit *artus* VZV QS-RGQ no Rotor-Gene Q.

Intervalo linear – plasma

O intervalo linear relativo à purificação do kit *artus* VZV QS-RGQ foi determinado por análise de uma série de diluições do material vírico em plasma, variando entre $6,92 \times 10^6$ cópias/ml e $1,0 \times 10^1$ cópias/ml. A purificação foi efetuada em modelos de replicação ($n = 4$ para concentrações $\geq 1,00 \times 10^6$ cópias/ml; $n = 8$ cada para concentrações $< 1,00 \times 10^6$ cópias/ml) usando o Kit QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi em combinação com o protocolo Cellfree200_DSP (volume de extração: 1 ml, volume de eluição: 60 μ l). Cada uma das amostras foi analisada usando o kit *artus* VZV QS-RGQ.

No plasma, o intervalo linear relativo à purificação do kit *artus* VZV QS-RGQ para material do VVZ foi determinado para abranger as concentrações de 127 cópias/ml a $6,92 \times 10^6$ cópias/ml (figura 6).

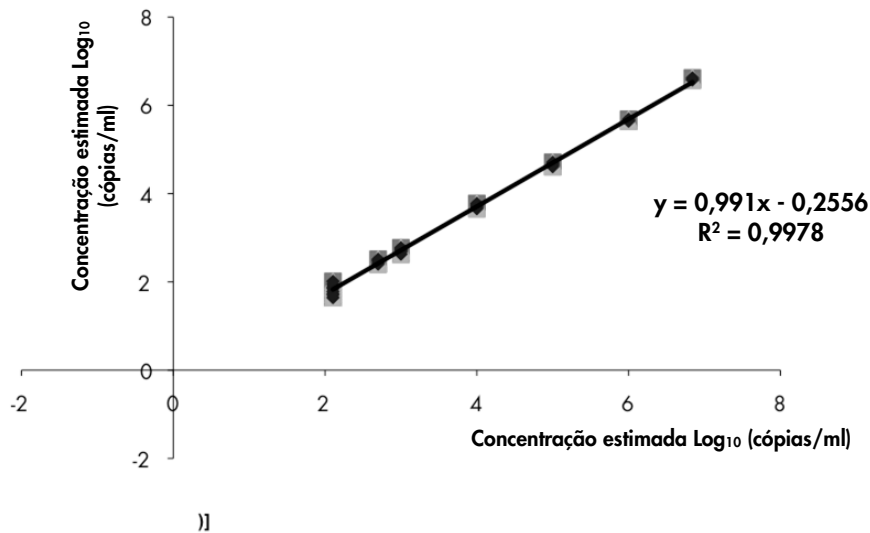


Figura 6. Intervalo linear do kit *artus* VZV QS-RGQ (plasma). Cálculo do intervalo linear. A linha reta foi determinada por uma regressão linear das concentrações calculadas de log₁₀ com as concentrações nominais de log₁₀. A equação da linha de regressão está incluída na figura.

Robustez – plasma

A verificação da robustez no plasma permite a determinação da taxa de insucesso total do kit *artus* VZV QS-RGQ. Para verificação da robustez, 30 amostras de plasma negativo para o VVZ foram contaminadas com 38,175 cópias/ml de material do VVZ (uma concentração aproximadamente três vezes superior ao limite de sensibilidade analítica). Após extração usando o kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi, em conjunto com o protocolo Cellfree1000_DSP (volume de extração: 1 ml, volume de eluição: 60 µl), estas amostras foram analisadas com o kit *artus* VZV QS-RGQ. Para robustez nos testes alvo do VVZ, foram detetadas amostras 100% (30/30) positivas para o VVZ.

Adicionalmente, a robustez do controlo interno foi avaliada após purificação e análise das 116 amostras de plasma contaminadas. Estas amostras eram 100% negativas para o VVZ e 100% positivas para o alvo

de controlo interno. Não foram observadas inibições. A robustez do kit *artus* VZV QS-RGQ 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. Os seus efeitos foram avaliados em plasma contendo VVZ numa concentração aproximadamente 10 vezes o valor do limite de deteção (LOD) (127,25 cópias/ml). Como controlo, foram incluídas amostras contaminadas com VVZ 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 kit QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi em conjunto com o protocolo Cellfree1000_DSP (volume de extração: 1 ml, volume de eluição: 60 μ l). Para as amostras contendo níveis elevados de inibidores endógenos (bilirrubina, hemoglobina, triglicédeos e proteína albumina), não foi observada qualquer interferência para a deteção do VVZ.

Avaliação clínica – plasma

O desempenho clínico do kit *artus* VZV QS-RGQ foi avaliado, testando um total de 161 amostras de plasma com EDTA forçadas e analisando os resultados obtidos relativamente aos resultados de um método comparável num local externo. Os resultados foram analisados em duas partes: a parte um consistia numa análise de concordância categórica de Percentagem de Concordância Positiva, Percentagem de Concordância Negativa e Percentagem de Concordância Geral; a parte dois consistia numa análise dos resultados de um total de 97 amostras de plasma com EDTA que recaíam no intervalo dinâmico de ensaio comum utilizando as análises de regressão Deming e Passing-Bablok, sendo os resultados reportados juntamente com a intersecção e o declive correspondentes (consultar a tabela 4 e a figura 7).

Tabela 4. Dados do estudo de desempenho clínico para amostras de plasma com EDTA

Medida de concordância	Frequências	Porcentagem de concordância	Limite de confiança de 95% bilateral binomial (exato) inferior Clopper-Pearson	Limite de confiança de 95% bilateral binomial (exato) superior Clopper-Pearson
Porcentagem de concordância geral	161/161	100,00	97,73	100,00
Porcentagem de concordância positiva	101/101	100,00	96,41	100,00
Porcentagem de concordância negativa	60/60	100,00	94,04	100,00

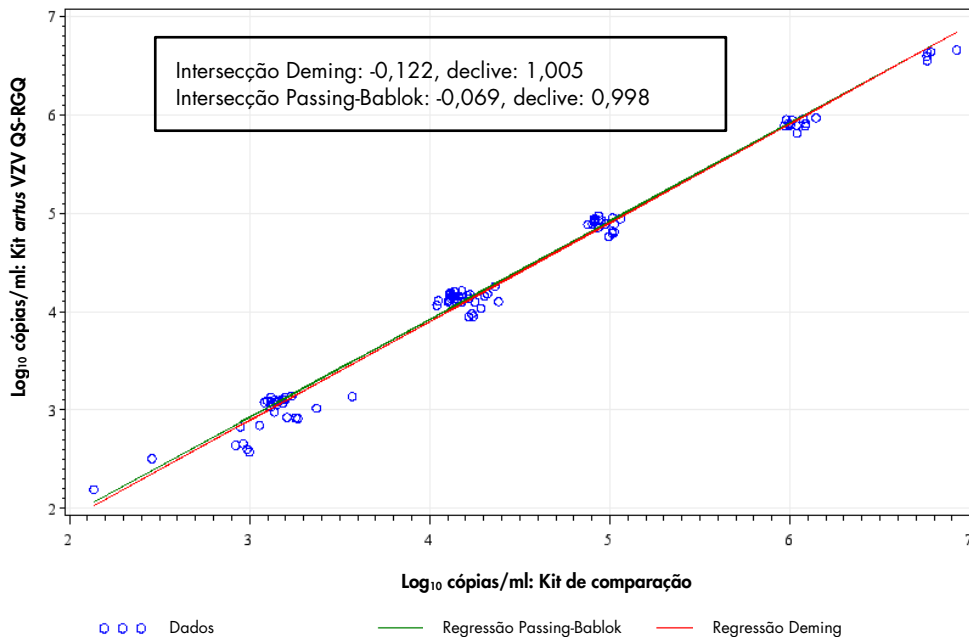


Figura 7: Gráfico de regressão com linhas Passing-Bablok e Deming para amostras de plasma. Foram incluídas na análise as amostras que se encontram entre o limite inferior de quantificação e o limite superior de quantificação para ambos os kits.

O gráfico Bland-Altman na figura 8 mostra que a diferença média aproximada do log entre os kits é de -0,10 e que esta diferença não é influenciada pela concentração de teste.

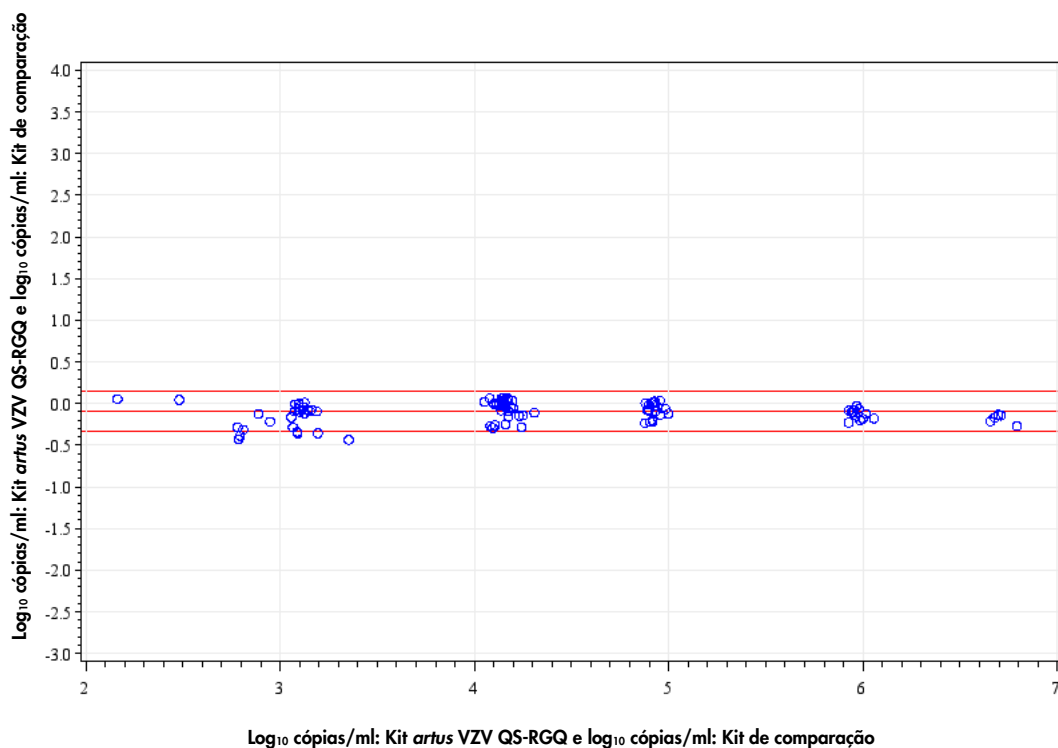


Figura 8: Gráfico Bland-Altman (plasma). As linhas de referência horizontais localizam-se em -0,10, -0,34, e 0,14 e indicam a diferença média (\log_{10} cópias/ml: kit *artus* VZV QS-RGQ – \log_{10} cópias/ml: kit de comparação) e o intervalo de previsão de 95% correspondente. Foram incluídas na análise as amostras que se encontravam entre o limite inferior de quantificação e o limite superior de quantificação para ambos os kits.

Precisão

Os dados de precisão do kit *artus* VZV QS-RGQ 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 kit *artus* VZV QS-RGQ (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 : ciclo limite, ver tabela 2). Além disso, foram determinados dados de precisão para resultados quantitativos em cópias/ μ l utilizando os valores de C_T correspondentes (tabela 3). Tendo por base estes resultados, a dispersão estatística global de uma dada amostra com a

concentração referida é de 0,45% (C_T) ou 8,32% (concentração) e 2,81% (C_T) para a deteção do controlo interno. Estes valores baseiam-se na totalidade de todos os valores individuais das variabilidades determinadas.

Tabela 5. Dados de precisão para o VVZ com base nos valores de C_T

	Desvio padrão	Variância	Coefficiente de variação (%)
Variabilidade intra-ensaio: VZV QS 4	0,08	0,01	0,26
Variabilidade intra-ensaio: Controlo interno	0,04	0,002	0,17
Variabilidade entre ensaios: VZV QS 4	0,15	0,02	0,50
Variabilidade entre ensaios: Controlo interno	0,39	0,15	1,63
Variabilidade entre lotes: VZV QS 4	0,10	0,01	0,34
Variabilidade entre lotes: Controlo interno	0,66	0,43	2,65
Variância total: VZV QS 4	0,13	0,02	0,45
Variância total: Controlo interno	0,68	0,47	2,81

Tabela 6. Dados de precisão para o VVZ com base nos resultados quantitativos (em cópias/ml)

	Desvio padrão	Variância	Coefficiente de variação (%)
Variabilidade intra-ensaio: VZV QS 4	0,50	0,25	5,46
Variabilidade entre ensaios: VZV QS 4	0,85	0,72	8,72
Variabilidade entre lotes: VZV QS 4	0,75	0,56	7,67
Variância total: VZV QS 4	0,81	0,66	8,32

Reprodutibilidade

Os dados de reprodutibilidade permitem uma avaliação regular do desempenho do kit *artus* VZV QS-RGQ, bem como uma comparação de eficiência com outros produtos. Estes dados foram obtidos pela participação nos programas de competência 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 o sistema *artus* QS-RGQ representativo.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

Os produtos relacionados e as informações de encomenda estão listados no manual para o kit *artus* VZV QS-RGQ PCR

Para informações atualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consultar o respetivo manual do kit QIAGEN® ou do utilizador. Os manuais do kit e do utilizador QIAGEN encontram-se disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC®, VR-1367™ (American Type Culture Collection).
Os nomes registados, as marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, quando não assinalados como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei 10/2015 HB-0401-D01-002
© 2012–2015 QIAGEN, todos os direitos reservados

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