

cobas[®] HIV-1/HIV-2 Qualitative

Prueba de ácidos nucleicos para uso en los cobas[®] 6800/8800 Systems

Para diagnóstico in vitro

cobas[®] HIV-1/HIV-2 Qualitative	P/N: 07862113190
cobas[®] HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit	P/N: 07862091190
cobas[®] NHP Negative Control Kit	P/N: 07002220190
cobas[®] Specimen Pre-Extraction Reagent	P/N: 08064695190

Tabla de contenido

Uso previsto	4
Resumen y explicación de la prueba.....	4
Reactivos y materiales.....	7
Reactivos y controles para la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	7
Reactivos cobas omni para la preparación de muestras	10
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent	11
Requisitos de almacenamiento y manipulación.....	12
Material adicional necesario	13
Instrumentos y software necesarios.....	14
Precauciones y requisitos de manipulación	14
Advertencias y precauciones.....	14
Manipulación de reactivos	15
Buenas prácticas de laboratorio.....	16
Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras.....	16
Muestras	16
Muestras de suero y plasma conservado en EDTA	16
Muestras de sangre seca	17
Instrucciones de uso	18
Notas sobre el procedimiento.....	18
Preparación de muestras de sangre seca	18
Ejecución de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	19
Resultados	20
Control de calidad y validez de los resultados.....	20
Interpretación de los resultados	20
Limitaciones del procedimiento.....	22

Evaluación no clínica del rendimiento 23

Características clave de rendimiento	23
Límite de detección (LoD).....	23
Precisión intralaboratorio.....	27
Verificación del grupo/subtipo e inclusividad.....	29
Especificidad.....	33
Paneles de seroconversión.....	33
Especificidad analítica.....	35
Especificidad analítica: sustancias interferentes	36
Correlación	37
Fallo de todo el sistema	38
Contaminación cruzada.....	39

Información adicional 39

Características principales de la prueba	39
Símbolos	40
Fabricante y distribuidores	41
Marcas registradas y patentes	41
Copyright.....	41
Bibliografía	42
Revisión del documento	43

Uso previsto

La prueba de ácidos nucleicos **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative para uso en los **cobas**® 6800/8800 Systems es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* para la detección cualitativa y diferenciación del virus de inmunodeficiencia humano (VIH) tipo 1 (VIH-1) y tipo 2 (VIH-2) en muestras de suero, plasma y sangre seca (DBS) humanas.

La prueba está concebida para su uso como ayuda en el diagnóstico del VIH-1/VIH-2. La detección de ácidos nucleicos del VIH-1 o el VIH-2 indica una infección por VIH-1 o VIH-2, respectivamente. La presencia de ácidos nucleicos del VIH-1 o el VIH-2 en plasma o suero de sujetos sin anticuerpos del VIH-1 o el VIH-2 revela una infección aguda o primaria. En bebés de madres infectadas por VIH y que presentan anticuerpos maternos frente al VIH-1 o el VIH-2, la presencia de ácidos nucleicos del VIH indica una infección activa. La prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative también puede utilizarse para confirmar una infección por VIH-1 o VIH-2 en un sujeto con muestras reactivas para anticuerpos o antígenos del VIH-1 o VIH-2.

Resumen y explicación de la prueba

Información de referencia

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).¹ El VIH-1 es la causa predominante del SIDA en todo el mundo, con más de 35 millones de personas infectadas.² Tras la infección, los sujetos infectados suelen atravesar una fase clínicamente estable y relativamente asintomática que puede durar años. Sin un tratamiento antirretroviral, las personas infectadas suelen desarrollar SIDA, que se caracteriza por la disminución de linfocitos CD4+ en el sistema inmune, la propensión a padecer infecciones oportunistas y, finalmente, la muerte.³ El VIH-2, presente fundamentalmente en África Occidental, también puede causar SIDA. Se estima que hay entre 1 y 2 millones de personas infectadas por VIH-2 en todo el mundo.

La distinción entre el VIH-1 y el VIH-2 es importante por diversos motivos: (1) el VIH-2 muestra una menor virulencia que el VIH-1, con cargas virales inferiores, un ritmo más lento de pérdida de linfocitos CD4+ y una progresión más pausada a infecciones oportunistas; (2) las cargas virales del VIH-2 pueden no cuantificarse correctamente mediante pruebas de cargas virales del VIH-1; y (3) algunos fármacos para el VIH-1, especialmente los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos, no resultan eficaces contra el VIH-2.⁴ Asimismo, es posible que se produzca una coinfección por VIH-1 y VIH-2. La coinfección no afecta a la tasa de progresión a SIDA de los sujetos de forma evidente, pero complica la monitorización de la carga viral y el tratamiento antirretroviral.⁴ Debido a la importancia de distinguir entre una infección por VIH-1 o por VIH-2, las directrices nacionales e internacionales han incluido el diagnóstico y la diferenciación del VIH-1 y el VIH-2 como requisito para el diagnóstico adecuado de una infección por VIH.^{5,6}

Motivos para el uso de la prueba de PCR

Tradicionalmente, la prueba del VIH se ha basado en la respuesta de los anticuerpos que los pacientes presentan ante el virus. Si bien estos anticuerpos no son eficaces a la hora de combatir el virus, se encuentran en casi todos los pacientes con infecciones crónicas. La principal limitación de la prueba de anticuerpos es el periodo de ventana de varias semanas que tiene lugar durante la fase aguda de la infección, antes del inicio de una respuesta de anticuerpos detectable. El periodo de ventana ha disminuido gracias a las pruebas de inmunoensayo del VIH de cuarta generación, que detectan tanto el antígeno p24 como los anticuerpos del VIH.⁷ No obstante, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos disponen del potencial necesario para reducir todavía más el periodo de ventana de las pruebas de inmunoensayo de cuarta generación gracias al aumento de la sensibilidad de los métodos de PCR con respecto a los métodos basados en la detección de proteínas.⁷

En función del riesgo de infección por VIH de la población analizada, la reducción del periodo de ventana de las pruebas de ácidos nucleicos puede ser sumamente importante tanto para el sujeto como para la comunidad.⁸ Para el paciente, el diagnóstico del VIH durante la fase aguda de la infección ofrece la posibilidad de recibir tratamiento de forma inmediata y, por lo tanto, puede retrasar la progresión de la enfermedad y así evitar daños en el sistema inmune y conservar la respuesta inmune celular anti-VIH. Un tratamiento temprano también puede limitar el tamaño y la diversidad genética del depósito viral establecido, lo que facilita la obtención de una cura funcional en pacientes tratados durante la fase aguda de la infección. Para la comunidad, los pacientes con infección aguda desempeñan un papel esencial en la transmisión del VIH, ya que suelen presentar cargas virales muy elevadas y no son conscientes de su estado de infección. La identificación y el tratamiento de estos pacientes pueden ser fundamentales a la hora de detener la propagación de la epidemia del VIH.^{9,10} La PCR ya se ha convertido en el estándar de atención para el diagnóstico del VIH en bebés; además, su elevada sensibilidad y especificidad permitiría no solo la detección de infecciones agudas en sujetos de todas las edades, sino también la confirmación del diagnóstico del VIH en sujetos seropositivos o de serología indeterminada.^{11,12}

Explicación de la prueba

La prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative se realiza en el cobas® 6800 System y el cobas® 8800 System. La prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative permite la detección y la discriminación simultánea de los ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2 en plasma conservado en EDTA, suero y DBS de pacientes infectados. Se utilizan dos sondas que detectan el VIH-1 sin discriminar entre los subtipos M del VIH-1 ni entre los grupos O y N del VIH-1. Se utiliza una tercera sonda que detecta el VIH-2 sin discriminar entre el grupo A y B del VIH-2.

Principios del procedimiento

La prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative se basa en la preparación de muestras totalmente automática (extracción y purificación de ácidos nucleicos) seguida de un proceso de amplificación y detección mediante PCR. Los cobas® 6800/8800 Systems constan del módulo de suministro de muestras, el módulo de transferencia, el módulo de procesamiento y el módulo analítico. La gestión automática de los datos se realiza a través del software cobas® 6800/8800, que asigna los resultados a las pruebas como no reactivos, reactivos o no válidos. Los resultados pueden revisarse directamente en la pantalla del sistema, exportarse o imprimirse como informe.

Los ácidos nucleicos de las muestras de pacientes y las moléculas de control interno (IC) de Armored RNA añadidas (utilizadas como control del proceso de preparación de muestras y amplificación/detección) se extraen simultáneamente. Además, la prueba utiliza tres controles externos: dos positivos y uno negativo. En resumen, los ácidos nucleicos víricos se liberan al añadir proteinasa y reactivo de lisis a la muestra. Los ácidos nucleicos liberados se unen a la superficie de sílice de las partículas de vidrio magnéticas añadidas. Las sustancias sin unir y las impurezas, como las proteínas desnaturalizadas, los restos celulares y potenciales inhibidores de la PCR se eliminan en los siguientes pasos con el reactivo de lavado y los ácidos nucleicos purificados se eluyen de las partículas de vidrio magnéticas mediante el buffer de elución a temperatura elevada.

La amplificación selectiva de los ácidos nucleicos del fragmento objetivo de la muestra se lleva a cabo mediante cebadores que van en un sentido y en sentido contrario específicos del virus del fragmento objetivo que se seleccionan de regiones altamente conservadas de los genomas del VIH-1 y el VIH-2. La prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 amplifica el gen gag del VIH-1, la región LTR del VIH-1 (fragmento objetivo doble del VIH-1) y la región LTR del VIH-2. La amplificación selectiva del IC se realiza mediante cebadores que van en un sentido y en sentido contrario específicos de la secuencia que se seleccionan de modo que no presenten homología alguna con los genomas del VIH-1 o el VIH-2. Para los procesos de transcripción inversa y amplificación mediante PCR se utiliza una enzima ADN polimerasa termoestable. La amplificación de las secuencias de fragmento objetivo y del IC se realiza simultáneamente mediante un perfil universal de amplificación mediante PCR que incluye unos pasos de temperatura y número de ciclos predefinidos. El reactivo de Master Mix incluye trifosfato de deoxiuridina (dUTP), en lugar de trifosfato desoxitimidina (dTTP), que se incorpora al ADN recién sintetizado (amplicón).¹³⁻¹⁵ La enzima AmpErase, que se incluye en la Master Mix para PCR, elimina los amplicones contaminados de las series de PCR anteriores cuando se calienta durante la primera ciclación térmica. Sin embargo, no se eliminan los amplicones nuevos porque la enzima AmpErase se inactiva cuando se expone a temperaturas superiores a los 55 °C.

El reactivo de Master Mix para la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative contiene dos sondas de detección específicas para las secuencias del fragmento objetivo de VIH-1, una para las secuencias del fragmentos objetivo del VIH-2 y otra para el IC. Las sondas están marcadas con marcadores emisores fluorescentes específicos para el fragmento objetivo que permiten la detección simultánea del fragmento objetivo del VIH-1, el fragmento objetivo del VIH-2 y el IC en tres canales objetivo distintos.^{16,17} Cuando no se une a la secuencia de fragmento objetivo, la señal fluorescente de las sondas intactas se elimina mediante un marcador silenciador. Durante el paso de amplificación mediante PCR, la hibridación de las sondas con la plantilla específica de ADN monocatenario provoca la escisión de la sonda por la actividad de la exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa, lo que produce la separación de los marcadores emisor y silenciador y la emisión de una señal fluorescente. Con cada ciclo de PCR, se generan cantidades crecientes de sondas escindidas y la señal acumulada del marcador emisor aumenta concomitantemente. La detección y discriminación en tiempo real de los productos de la PCR se consigue mediante la cuantificación de la fluorescencia generada por los marcadores emisores liberados para los fragmentos objetivo víricos y el IC, respectivamente.

Reactivos y materiales

Reactivos y controles para la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

Todos los reactivos y controles sin abrir deben almacenarse como se recomienda en la Tabla 1 a Tabla 5.

Tabla 1 cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative		
Almacenar a 2-8 °C		
Casete para 96 pruebas (P/N 07862113190)		
Componentes del kit	Ingredientes del reactivo	Cantidad por kit 96 pruebas
Solución de proteinasa (PASE)	Buffer Tris, < 0,05% de EDTA, cloruro de calcio, acetato de calcio, 8% (p/v) de proteinasa EUH210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad. EUH208: Contiene subtilisina. Puede provocar una reacción alérgica.	13 ml
Control interno (IC)	Buffer Tris, < 0,05% de EDTA, < 0,001% de constructo de Armored RNA como control interno (ARN no infeccioso encapsulado en bacteriófago MS2), < 0,002% de ARN Poli rA (sintético), < 0,1% de azida sódica	13 ml
Buffer de elución (EB)	Tampón Tris, 0,2% de metil-4-hidroxibenzoato	13 ml
Reactivo 1 de Master Mix (MMX-R1)	Acetato de manganeso, hidróxido potásico, < 0,1% de azida sódica	5,5 ml
Reactivo 2 de Master Mix para VIH-1/VIH-2 (HIV-1/HIV-2 MMX-R2)	Buffer Tricina, acetato de potasio, 18% de sulfóxido de dimetilo, glicerol, Tween 20, EDTA, < 0,06% de dATP, dCTP, dGTP, < 0,14% de dUTP, < 0,01% de cebadores ascendente y descendente de VIH-1, VIH-2 y control interno, < 0,01% de sondas marcadas con fluorescente para VIH-1 y VIH-2, < 0,01% de sonda de control interno marcada con fluorescente, < 0,01% de aptámero oligonucleótido, < 0,01% de polimerasa de ADN Z05D, < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana), < 0,1% de azida sódica	6 ml

Tabla 2 cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit**cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit**

Almacenar a 2-8 °C

(P/N: 07862091190)

Componentes del kit	Ingredientes del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia*
Control positivo para VIH-1M/VIH-2 (HIV-1M/HIV-2 (+)C)	< 0,001% de Armored RNA sintético de VIH-1 grupo M encapsulado en proteína recubierta de bacteriófago MS2, < 0,001% de Armored RNA sintético de VIH-2 encapsulado en proteína recubierta de bacteriófago MS2, plasma humano normal, no reactivo según las pruebas autorizadas para anticuerpos del VIH-1/2; ARN de VIH-1 y ARN de VIH-2 no detectables mediante métodos de PCR. 0,1% de conservante ProClin® 300	5,2 ml (8 x 0,65 ml)	  ATENCIÓN H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/ el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo. P280: Utilice guantes protectores. P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.
Control positivo para VIH-1O (HIV-1O (+)C)	< 0,001% de Armored RNA sintético de VIH-1 grupo O encapsulado en proteína recubierta de bacteriófago MS2, plasma humano normal, no reactivo según las pruebas autorizadas para anticuerpos del VIH-1/2; ARN de VIH-1 y ARN de VIH-2 no detectables mediante métodos de PCR. 0,1% de conservante ProClin® 300	5,2 ml (8 x 0,65 ml)	  ATENCIÓN H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/ el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo. P280: Utilice guantes protectores. P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.

* Las etiquetas de seguridad del producto se basan fundamentalmente en la regulación GHS de la UE.

Tabla 3 cobas® NHP Negative Control Kit**cobas® NHP Negative Control Kit**

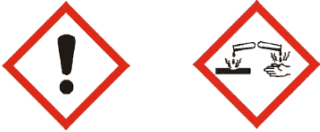
Almacenar a 2-8 °C
(P/N 07002220190)

Componentes del kit	Ingredientes del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia*
Control negativo para plasma humano normal (NHP-NC)	Plasma humano normal, no reactivo según pruebas autorizadas para anticuerpos del VIH-1/2; ARN de VIH-1 y ARN de VIH-2 no detectables mediante métodos de PCR. < 0,1% de conservante ProClin® 300	16 ml (16 x 1 ml)	  ATENCIÓN H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo. P280: Utilice guantes protectores. P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.

* Las etiquetas de seguridad del producto se basan fundamentalmente en la regulación GHS de la UE.

Reactivos cobas omni para la preparación de muestras

Tabla 4 Reactivos **cobas omni** para la preparación de muestras*

Reactivos	Ingredientes del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997546190)	Partículas de vidrio magnéticas, buffer Tris, 0,1% de metil-4 hidroxibenzoato, < 0,1% de azida sódica	480 pruebas	No aplicable
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997511190)	Buffer Tris, 0,1% de metil-4 hidroxibenzoato, < 0,1% de azida sódica	4 x 875 ml	No aplicable
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997538190)	43% (p/p) de tiocianato de guanidina***, 5% (p/v) de polidocanol***, 2% (p/v) de ditiotreitól, citrato de sodio dihidratado	4 x 875 ml	 PELIGRO H302 + H332: Nocivo en caso de ingestión o inhalación. H318: Provoca lesiones oculares graves. H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. P273: Evítese su liberación al medio ambiente. P280: Llevar gafas/máscara de protección. P304 + P340 + P312: EN CASO DE INHALACIÓN: transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico en caso de malestar. P305 + P351 + P338 + P310: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada. 593-84-0 tiocianato de guanidinio 9002-92-0 polidocanol
cobas omni Wash Reagent (WASH) Almacenar a 15-30 °C (P/N: 06997503190)	Citrato de sodio dihidratado, 0,1% de metil-4-hidroxibenzoato	4,2 l	No aplicable

* Estos reactivos no están incluidos en el kit de la prueba **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative. Consulte el listado de material adicional necesario (Tabla 10 y Tabla 11).

** Las etiquetas de seguridad del producto se basan fundamentalmente en la regulación GHS de la UE.

*** Sustancia peligrosa

cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent

Tabla 5 cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent*

cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent

Almacenar a 2-8 °C

(P/N 08064695190)

Reactivo	Ingredientes del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia**
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER)	28% (p/p) de tiocianato de guanidina, 6% (p/v) de polidocanol, 1% (p/v) de ditiotreitol, citrato de sodio dihidratado	600 ml (15 × 40 ml)	  PELIGRO H302: Nocivo por ingestión. H318: Provoca lesiones oculares graves. H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. P264: Lavarse la piel concienzudamente tras la manipulación. P270: No comer, beber ni fumar durante su utilización. P273: Evítese su liberación al medio ambiente. P280: Llevar gafas/máscara de protección. P305 + P351 + P338 + P310: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOG: A/médico. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.

* Este reactivo no está incluido en el kit de la prueba **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative. Consulte el listado de material adicional necesario (Tabla 10 y Tabla 11).

** Las etiquetas de seguridad del producto se basan fundamentalmente en la regulación GHS de la UE.

Requisitos de almacenamiento y manipulación

Los reactivos deben almacenarse y manipularse según las indicaciones de la Tabla 6 y la Tabla 7. El **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER), utilizado en el flujo de trabajo de DBS, debe almacenarse y manipularse tal como se especifica en la Tabla 8 y la Tabla 9.

Cuando los reactivos no están cargados en los **cobas**® 6800/8800 Systems, almacénelos a la temperatura correspondiente especificada en la Tabla 6.

Tabla 6 Almacenamiento de reactivos (cuando el reactivo no está cargado en el sistema)

Reactivo	Temperatura de almacenamiento
cobas ® HIV-1/HIV-2 Qualitative	2-8 °C
cobas ® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit	2-8 °C
cobas ® NHP Negative Control Kit	2-8 °C
cobas omni Lysis Reagent	2-8 °C
cobas omni MGP Reagent	2-8 °C
cobas omni Specimen Diluent	2-8 °C
cobas omni Wash Reagent	15-30 °C

Los reactivos cargados en los **cobas**® 6800/8800 Systems se almacenan a la temperatura correspondiente adecuada y el sistema controla su fecha de caducidad. Los **cobas**® 6800/8800 Systems solamente permiten utilizar los reactivos cuando se cumplen todas las condiciones indicadas en la Tabla 7. El sistema evita automáticamente el uso de reactivos caducados. La Tabla 7 ayuda al usuario a entender las condiciones de manipulación de los reactivos de los **cobas**® 6800/8800 Systems.

Tabla 7 Condiciones de caducidad de los reactivos de los **cobas**® 6800/8800 Systems

Reactivo	Fecha de caducidad del kit	Estabilidad del kit abierto	Serie en las que se puede utilizar el kit	Periodo de estabilidad (horas acumuladas de carga fuera de la nevera)
cobas ® HIV-1/HIV-2 Qualitative	No caducado	30 días desde el primer uso	Máx. 10 series	Máx. 8 horas
cobas ® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit	No caducado	No aplicable	No aplicable	Máx. 8 horas
cobas ® NHP Negative Control Kit	No caducado	No aplicable	No aplicable	Máx. 10 horas
cobas omni Lysis Reagent	No caducado	30 días desde la carga*	No aplicable	No aplicable
cobas omni MGP Reagent	No caducado	30 días desde la carga*	No aplicable	No aplicable
cobas omni Specimen Diluent	No caducado	30 días desde la carga*	No aplicable	No aplicable
cobas omni Wash Reagent	No caducado	30 días desde la carga*	No aplicable	No aplicable

* El tiempo se calcula desde la primera vez que se carga el reactivo en los **cobas**® 6800/8800 Systems.

Almacene el **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent (utilizado en el flujo de trabajo de DBS) a la temperatura correspondiente especificada en la Tabla 8.

Tabla 8 Almacenamiento del **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent storage

Reactivo	Temperatura de almacenamiento
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent	2-8 °C

El **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abierto, este reactivo se mantiene estable durante 30 días cuando se almacena a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C, incluidas las 13 horas acumuladas a 30 °C, o bien hasta la fecha de caducidad, lo que se produzca primero, según se especifica en la Tabla 9.

Tabla 9 Condiciones de caducidad del **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent

Reactivo	Fecha de caducidad del kit	Estabilidad del kit abierto	Serie en las que se puede utilizar el kit	Estabilidad a 30 °C fuera de la nevera (tiempo acumulado)
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent	No caducado	30 días desde el primer uso	No aplicable	Máx. 13 horas

Material adicional necesario

Tabla 10 Materiales y consumibles para uso con los **cobas®** 6800/8800 Systems

Material	P/N
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Bolsa para residuos sólidos	07435967001
Recipiente de residuos sólidos	07094361001

Tabla 11 Otros materiales y consumibles necesarios únicamente para el uso con DBS

Material
Whatman 903® filter card, Munktell Specimen Collection card TFN o equivalente (diámetro de mancha: 12-13 mm)
Tubos de polipropileno de 5 ml y 12,5 mm de diámetro con rosca interior (Cryo.s™) y con tapones
Eppendorf Thermomixer (p. ej., el modelo R 5355 o equivalente) con termobloque para 24 criotubos
Fórceps o pinzas estériles o desechables
Bolsas resellables y bolsitas de desecante (para el almacenamiento de las DBS)

Instrumentos y software necesarios

Es preciso instalar en los instrumentos el software **cobas**® 6800/8800 y los paquetes de análisis para la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative, **cobas**® HIV-1/2 Qual-Serum/Plasma ASAP y/o **cobas**® HIV-1/2 Qual-DBS ASAP. El IG (Instrument Gateway) se suministra con el sistema.

Tabla 12 Instrumentos

Equipo	P/N
cobas ® 6800 System (opción móvil)	05524245001 y 06379672001
cobas ® 6800 System (fijo)	05524245001 y 06379664001
cobas ® 8800 System	05412722001
Módulo de suministro de muestras	06301037001

Consulte el Manual de usuario de los **cobas**® 6800/8800 Systems para obtener información adicional sobre los tubos primarios y secundarios compatibles con cada instrumento.

Nota: póngase en contacto con su representante local de Roche para obtener una lista de pedido detallada para racks de muestras, racks para puntas obstruidas y bandejas de racks compatibles con cada instrumento.

Precauciones y requisitos de manipulación

Advertencias y precauciones

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, resulta esencial seguir las buenas prácticas de laboratorio recomendadas para obtener un rendimiento correcto del ensayo. Debido a la elevada sensibilidad de esta prueba, deben extremarse las precauciones para evitar cualquier tipo de contaminación de los reactivos y las mezclas de amplificación.

- Para diagnóstico *in vitro* exclusivamente.
- No se ha evaluado el uso de la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative como prueba de cribado de la presencia de VIH-1/VIH-2 en sangre o productos sanguíneos.
- Todas las muestras de pacientes deben tratarse como si fueran infecciosas, utilizando los procedimientos de laboratorio recomendados que se describen en la publicación Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories y en el documento M29-A4 del CLSI.^{18,19} Este procedimiento solamente debería llevarlo a cabo personal experto en la manipulación de material biopeligroso y en el uso de la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative y los **cobas**® 6800/8800 Systems.
- Todos los materiales de origen humano deben considerarse potencialmente infecciosos y manipularse teniendo en cuenta las precauciones generales. En caso de que se produzca algún derrame, lleve a cabo una desinfección inmediata siguiendo los procedimientos apropiados del laboratorio.
 - Si se produce un derrame de muestras DBS en el **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (que contiene tiocianato de guanidina), no permita que entre en contacto con soluciones de hipoclorito de sodio que contengan desinfectantes como la lejía. Tales mezclas pueden producir gases de alta toxicidad.
- El **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit y el **cobas**® NHP Negative Control Kit contienen plasma obtenido de sangre humana. Se ha analizado el material original mediante las pruebas para anticuerpos autorizadas y no se ha considerado reactivo para la presencia de anticuerpos del VIH-1/2. En el análisis del plasma humano normal con métodos de PCR no se ha detectado ARN de HIV-1 (grupos M y O) y ARN de HIV-2. Ningún método de prueba conocido puede garantizar totalmente que un producto derivado de la sangre humana no transmita agentes infecciosos.

- **No congele la sangre total ni las muestras almacenadas en tubos primarios.**
- El **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent es sensible a la luz y se suministra en botellas con protección lumínica.
- Utilice solo los consumibles suministrados o que se requieran expresamente para garantizar el rendimiento óptimo de la prueba.
- Puede solicitar Hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheets, SDS) al representante local de Roche.
- Siga al pie de la letra los procedimientos y las directrices que se suministran para garantizar la correcta realización de la prueba. Cualquier variación de dichos procedimientos y directrices podría afectar al rendimiento óptimo de la prueba.
- Podrían producirse falsos positivos si no se evita la contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación y el procesamiento de las mismas.

Manipulación de reactivos

- Manipule todos los reactivos, controles y muestras de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio para evitar la contaminación cruzada de las muestras o los controles.
- Antes de utilizarlos, revise cada casete de reactivo, diluyente, reactivo de lisis, reactivo de lavado y **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent (requerido únicamente para el uso con DBS) para comprobar que no existen signos de fugas. No utilice el material si hay alguna evidencia de fuga.
- El **cobas omni** Lysis Reagent y el **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent contienen tiocianato de guanidina, una sustancia química potencialmente peligrosa. Evite el contacto de reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua para evitar quemaduras.
- Los kits de la prueba **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative, el **cobas omni** MGP Reagent y el **cobas omni** Specimen Diluent contienen azida sódica como conservante. Evite el contacto de reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua para evitar quemaduras. Si se producen salpicaduras de reactivos, diluya las manchas con agua antes de secarlas con un paño.
- No permita que el **cobas omni** Lysis Reagent o el **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent, que contienen tiocianato de guanidina, entren en contacto con la solución de hipoclorito de sodio (lejía). Tales mezclas pueden producir gases de alta toxicidad.
- Elimine todos los materiales que hayan estado en contacto con las muestras y los reactivos de acuerdo con la reglamentación nacional, estatal y local.

Buenas prácticas de laboratorio

- No pipetee con la boca.
- No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo.
- Utilice guantes, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule las muestras y los reactivos. Es necesario cambiarse los guantes entre la manipulación de las muestras y de los kits cualitativos **cobas® HIV-1/HIV-2** y los reactivos **cobas omni** para evitar la contaminación. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras y de los controles.
- Lávese bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit, y cuando se saque los guantes.
- Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo del laboratorio usando una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5% en agua destilada o desionizada (lejía doméstica diluida a 1:10). A continuación, límpielas con un trapo impregnado en etanol al 70%.
- Si se produce algún derrame sobre los **cobas® 6800/8800 Systems**, siga las instrucciones descritas en el Manual de usuario de los **cobas® 6800/8800 Systems** para limpiar y descontaminar correctamente la superficie de los instrumentos.

Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras

Nota: manipule todas las muestras y los controles como si pudieran transmitir agentes infecciosos.

Almacene todas las muestras a las temperaturas especificadas.

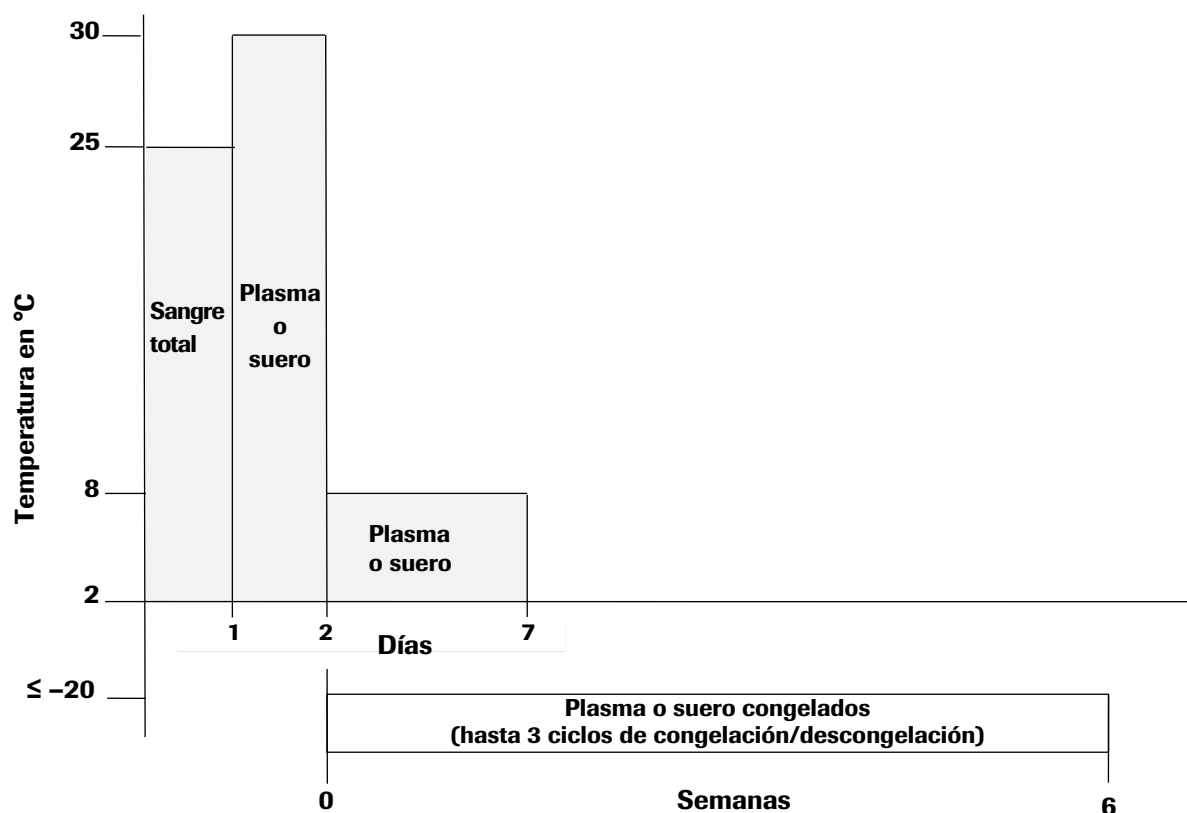
La estabilidad de las muestras se ve afectada por las temperaturas elevadas.

Si se utilizan muestras congeladas en tubos secundarios, deje que se descongelen a temperatura ambiente (15-30 °C) por completo y, a continuación, agítelas unos instantes (entre 3 y 5 segundos) y centrifúguelas para que todo el volumen de la muestra se deposite en la parte inferior del tubo.

Muestras

Muestras de suero y plasma conservado en EDTA

- La sangre total debería recogerse en tubos de separación de suero SST™, en tubos para preparación de plasma BD Vacutainer® PPT™ para métodos de pruebas de diagnóstico molecular o en tubos estériles y utilizar EDTA como anticoagulante. Siga las instrucciones del fabricante de los tubos de recogida de muestras.
- La sangre total recogida en tubos de separación de suero SST™, tubos para preparación de plasma BD Vacutainer® PPT™ para métodos de pruebas de diagnóstico molecular o tubos estériles con EDTA como anticoagulante pueden almacenarse y/o transportarse durante un máximo de 24 horas a una temperatura comprendida entre 2 °C y 25 °C antes de la preparación del plasma o el suero. La centrifugación debe realizarse conforme a las instrucciones del fabricante.
- Después de la separación, las muestras de suero o plasma conservado en EDTA pueden almacenarse en tubos secundarios durante un máximo de 24 horas a 30 °C seguido de hasta 5 días de almacenamiento a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C o un máximo de 6 semanas a ≤ -20 °C. Para un almacenamiento a más largo plazo se recomiendan temperaturas ≤ -60 °C.
- Las muestras de plasma se mantienen estables hasta un máximo de tres ciclos de congelación/descongelación si se congelan a ≤ -20 °C.
- Consulte la Ilustración 1 para conocer las condiciones de almacenamiento.

Ilustración 1 Condiciones de almacenamiento de muestras de suero, plasma y sangre total

- Si las muestras se van a transportar, es recomendable empaquetarlas y etiquetarlas de acuerdo con la reglamentación estatal y/o internacional relativa al transporte de muestras y agentes etiológicos.

Muestras de sangre seca

- Obtenga las muestras DBS mediante los procedimientos clínicos correspondientes.
- Se recomienda aplicar un mínimo de 70 µl de sangre capilar dentro de cada círculo delineado en la tarjeta para muestras DBS.
- Asegúrese de que AMBAS caras del papel están saturadas y de que el círculo delineado está completamente cubierto.
- Deje secar la muestra de sangre seca a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 3 horas como mínimo, protegiendo la tarjeta DBS de la luz solar directa.
- Para conocer más información, consulte el boletín técnico de las tarjetas de papel de filtro que utilice.
- Se recomienda preparar un mínimo de 3 discos de papel por cada muestra de paciente.
- Almacene las DBS en bolsas resellables individuales con una bolsita desecante en cada bolsa.
- Las DBS se pueden transportar o almacenar a 15-30 °C hasta un máximo de tres meses.
- Si las muestras se van a transportar, es recomendable empaquetarlas y etiquetarlas de acuerdo con la reglamentación estatal y/o internacional relativa al transporte de muestras y agentes etiológicos.

Instrucciones de uso

Notas sobre el procedimiento

- No utilice los reactivos para la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative, el cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit, el cobas® NHP Negative Control Kit, los reactivos cobas® omni ni el cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent después de la fecha de caducidad.
- No reutilice los consumibles. Es de un solo uso.
- Consulte el Manual de usuario de los cobas® 6800/8800 Systems para obtener información sobre el correcto mantenimiento de los instrumentos.

Preparación de muestras de sangre seca

- Deje que el cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER) alcance la temperatura ambiente antes de utilizarlo.
- Extraiga una DBS de la tarjeta para muestras DBS.
- Transfiera la muestra a un tubo (5 ml, rosca interior, 12,5 mm de diámetro, polipropileno [Cryo.s™]) mediante fórceps o pinzas estériles o desechables.
- Asegúrese de que la muestra se deposita en la parte inferior del tubo tal como se muestra en la Ilustración 2.
- Pipetee 1.150 µl de SPER en el tubo que contiene la DBS y coloque el tapón.
- Asegúrese de que la DBS está totalmente cubierta con SPER.
- Coloque los tubos en las posiciones de la 1 a la 24 en un Eppendorf Thermomixer (p. ej., modelo R 5355 o equivalente) precalentado con termobloque para 24 criotubos e incube durante 10 minutos a 56 °C y 1.000 rpm para extraer el virus de la muestra de sangre seca.
- Quite el tapón de los tubos y asegúrese de que la DBS está adherida a la pared del tubo (Ilustración 3) para evitar coágulos en la muestra.
- Elimine cualquier película líquida que se haya podido crear por encima del nivel del líquido (Ilustración 4) mediante una punta de pipeta estéril para evitar la detección de nivel precoz.
- Transfiera los tubos a los cobas® 6800/8800 Systems.

Ilustración 2 DBS en el tubo



Válida

Ilustración 3 Ubicación de la DBS



Válida

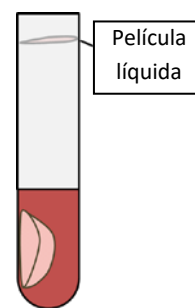


Válida



Posible
riesgo de
coágulo

Ilustración 4 Película líquida



Posible riesgo de
detección de líquido precoz

Ejecución de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

La prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative puede ejecutarse con un volumen de muestra mínimo obligatorio de 650 µl (para el flujo de trabajo de muestras de plasma o suero de 500 µl) o de 1.150 µl de cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (para el flujo de trabajo de muestras DBS de 850 µl). Tenga en cuenta que las muestras DBS no pueden ejecutarse en el modo de serie combinada con muestras de plasma o suero. El procedimiento de la prueba se describe con detalle en el Manual de usuario de los cobas® 6800/8800 Systems. En la Ilustración 5 se resume el procedimiento.

Ilustración 5 Procedimiento de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

1	Carga de reactivos y material fungible según las indicaciones del sistema: • Carga del reactivo de lavado, el reactivo de lisis y el diluyente • Carga de las placas de procesamiento y las placas de amplificación • Carga de las partículas de vidrio magnéticas • Carga de reactivos específicos de la prueba • Cargue los casetes de control. • Carga de las bandejas de puntas • Sustitución de los racks para puntas obstruidas
2	Carga de las bandejas con las muestras
3	Revise y exporte los resultados.
4	Descarga del material fungible: • Descarga de las placas de amplificación del módulo analítico • Descargue los casetes de control vacíos. • Vacíe los residuos sólidos. • Vacíe los residuos líquidos.

Resultados

Los cobas® 6800/8800 Systems detectan y diferencian de forma automática y simultánea el VIH-1 y el VIH-2 de muestras y controles, además de mostrar la validez de la prueba, los resultados globales y los resultados individuales de cada fragmento objetivo.

Control de calidad y validez de los resultados

- Con cada serie se procesan un control negativo para plasma humano normal [(-) C] y dos controles positivos [HIV-1M/HIV-2 (+)C y HIV-1O (+)C].
- Compruebe los avisos y los resultados asociados tanto en el software cobas® 6800/8800 como en el informe para garantizar la validez de la serie.
- La serie se considera válida cuando no hay avisos para ninguno de los tres controles.

El software cobas® 6800/8800 invalida automáticamente los resultados cuando fallan los controles positivos y negativos.

Avisos de controles

Tabla 13 Avisos de controles para los controles negativo y positivo

Control negativo	Aviso	Resultado	Interpretación
(-) C	Q02 (Serie de control errónea)	Invalid	Toda la serie se considera inválida si el resultado del (-) C no es válido.
Control positivo	Aviso	Resultado	Interpretación
HIV-1M/HIV-2 (+)C	Q02 (Serie de control errónea)	Invalid	Toda la serie se considera no válida si el resultado del HIV-1M/HIV-2 (+)C no es válido.
HIV-1O (+)C	Q02 (Serie de control errónea)	Invalid	Toda la serie se considera no válida si el resultado del HIV-1O (+)C no es válido.

Si la serie no es válida, repita las pruebas para toda la serie, incluyendo muestras y controles.

En el software cobas® 6800/8800, HIV-1M/HIV-2 (+) C hace referencia al control positivo cobas® HIV-1M/HIV-2 y HIV-1O (+) C, al control positivo cobas® HIV-1O.

Interpretación de los resultados

En las series válidas, compruebe cada muestra para detectar avisos en el software cobas® 6800/8800 y/o en el informe. La interpretación de resultados se debe realizar del siguiente modo:

- Una serie válida puede incluir resultados de muestras tanto válidos como inválidos.
- Las muestras presentan un “Yes” en la columna “Válida” si todos los resultados de fragmentos objetivos solicitados muestran resultados válidos. Las muestras que presentan un “No” en la columna “Válida” pueden requerir alguna interpretación o acción adicional.

- Los valores de la columna “Resultado global” para muestras individuales deberían interpretarse del modo siguiente:
 - Reactive: todos los resultados solicitados son reactivos, o bien uno de los resultados solicitados es reactivo y, el otro, no reactivo.
 - Non-Reactive: todos los resultados solicitados son no reactivos.
 - Invalid: al menos uno de los resultados solicitados no es válido.
- Los resultados de fragmento objetivo obtenidos para las muestras individuales son válidos, salvo que se especifique lo contrario.

Los resultados y sus interpretaciones correspondientes para la detección del VIH-1 y el VIH-2 se muestran a continuación en la Tabla 14.

Tabla 14 Resultados de fragmento objetivo para la interpretación de los resultados de fragmento objetivo individuales

Válido	Resultado global	Fragmento objetivo 1	Fragmento objetivo 2	Interpretación
Yes	Reactive	HIV-1 Reactive	HIV-2 Reactive	Todos los resultados solicitados son válidos. Se ha detectado una señal de fragmento objetivo para VIH-1 y VIH-2.
Yes	Reactive	HIV-1 Reactive	HIV-2 Non-Reactive	Todos los resultados solicitados son válidos. Se ha detectado una señal de fragmento objetivo para VIH-1. No se ha detectado ninguna señal de fragmento objetivo para VIH-2.
Yes	Reactive	HIV-1 Non-Reactive	HIV-2 Reactive	Todos los resultados solicitados son válidos. No se ha detectado ninguna señal de fragmento objetivo para VIH-1. Se ha detectado una señal de fragmento objetivo para VIH-2.
Yes	Non-Reactive	HIV-1 Non-Reactive	HIV-2 Non-Reactive	Todos los resultados solicitados son válidos. No se ha detectado ninguna señal de fragmento objetivo para VIH-1 o VIH-2.
No	Invalid	Invalid	Invalid	Ambos resultados (VIH-1 y VIH-2) son no válidos. La muestra original debe volverse a analizar para obtener resultados válidos para VIH-1 y VIH-2. Si los resultados siguen siendo no válidos, deberá obtenerse una nueva muestra.

Limitaciones del procedimiento

- La prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative se ha evaluado para ser utilizada únicamente con el **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit, el **cobas**® NHP Negative Control Kit, el **cobas omni** MGP Reagent, el **cobas omni** Lysis Reagent, el **cobas omni** Specimen Diluent, el **cobas omni** Wash Reagent y el **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (utilizado en el flujo de trabajo con muestras de sangre seca) exclusivamente en los **cobas**® 6800/8800 Systems.
- La obtención de resultados fiables depende de que los procedimientos de recogida, almacenamiento y manipulación de muestras sean adecuados.
- La detección de ácidos nucleicos del VIH-1 y el VIH-2 depende del número de partículas víricas presentes en la muestra y se puede ver afectada por los métodos de obtención de las mismas, el almacenamiento y la manipulación, factores propios del paciente (como la edad o la presencia de síntomas) y/o la fase de infección.
- Aunque es poco probable, las mutaciones en las regiones muy conservadas del genoma vírico cubiertas por la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative pueden afectar a la unión de cebadores y/o sondas e impedir la detección del virus.
- Debido a las diferencias específicas entre tecnologías, se recomienda a los usuarios que realicen estudios de correlación en el laboratorio para determinar las diferencias tecnológicas antes de cambiar de una a otra. Los usuarios deberán adherirse a las políticas y los procedimientos específicos.
- La prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative no se ha concebido como prueba de cribado para la presencia de VIH-1/VIH-2 en sangre o productos sanguíneos.

Evaluación no clínica del rendimiento

Características clave de rendimiento

Límite de detección (LoD)

Estándares internacionales de la OMS/Estándares primarios de Roche

El límite de detección de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative se ha determinado a partir de los siguientes estándares:

- Tercer estándar internacional de la OMS para el ARN de VIH-1 grupo M (código NIBSC 10/152) para muestras de plasma conservado en EDTA, suero y DBS
- Estándar internacional de la OMS para el ARN de VIH-2 (código NIBSC 08/150) para muestras de plasma y suero
- Estándares primarios de Roche para el ARN de VIH-2 para muestras DBS
- Estándares primarios de Roche para el ARN de VIH-1 grupo O para muestras de plasma conservado en EDTA y suero

Actualmente no hay ningún estándar internacional disponible para el ARN de VIH-1 grupo O. El estándar de Roche para el ARN de VIH-1 grupo O puede encontrarse en el Lote 01 del panel de referencia 1 del ARN para el subtipo VIH-1 de CBER. Los estándares primarios de Roche para el ARN del VIH-1 grupo O son cultivos de virus conocidos comercializados, P/N 2420 (n.º de catálogo 500493, SeraCare Life Sciences). El estándar del ARN de VIH-2 de Roche puede encontrarse en el estándar internacional de la OMS para el ARN de VIH-2 (código NIBSC 08/150). Los estándares primarios de Roche para el ARN de VIH-2 son cultivos de virus conocidos comercializados, P/N HIV-2 NIH-Z (n.º de catálogo 10-27-000, Applied Biotechnologies, Inc.). Una copia del ARN de VIH-1 equivale a 1,7 unidades internacionales (UI) y una copia del ARN del VIH-2, a 0,2 UI.

Se prepararon diluciones en serie de los estándares en plasma humano conservado en EDTA, suero o sangre total de muestras DBS negativas para el VIH. Se analizaron paneles con 5 o 6 niveles de concentración más una muestra negativa con 3 lotes de reactivo para la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative, con múltiples series analíticas, días, operadores e instrumentos.

Para estimar el LoD de cada virus se utilizó el análisis PROBIT del 95% con los datos combinados de series de dilución y de lotes de reactivos, junto con el límite inferior y superior del intervalo de confianza del 95% (Tabla 15). En la Tabla 16 a la Tabla 18 se resumen las tasas de reactividad observadas en los estudios de LoD para cada virus.

Tabla 15 Resultados del análisis PROBIT del 95% con datos del LoD obtenidos para los estándares víricos de plasma conservado en EDTA, suero y DBS

Matrices	Analito	Unidades de medición	LoD	Límite inferior del intervalo de confianza del 95%	Límite superior del intervalo de confianza del 95%
Plasma conservado en EDTA	VIH-1 grupo M	copias/ml	12,6	10,9	15,2
	VIH-1 grupo O	copias/ml	14,8	12,8	17,7
	VIH-2	copias/ml	27,9	22,9	36,6
Suero	VIH-1 grupo M	copias/ml	12,1	10,5	14,5
	VIH-1 grupo O	copias/ml	12,6	10,9	15,2
	VIH-2	copias/ml	23,4	19,6	29,7
DBS	VIH-1 grupo M	copias/ml	255	224	299
	VIH-2	copias/ml	984	856	1169

Tabla 16 Resumen de las tasas de reactividad para VIH-1 grupo M en plasma conservado en EDTA, suero y DBS

Matrices	Concentración de ARN de VIH-1 grupo M (cp/ml)	Número de reactivos	Número de réplicas válidas	% de reactividad
Plasma conservado en EDTA	40	189	189	100%
	30	189	189	100%
	20	187	189	99%
	10	174	189	92%
	5	124	189	66%
	2,5	91	189	48%
	0	0	189	0%
Suero	40	189	189	100%
	30	189	189	100%
	20	187	189	99%
	10	176	189	93%
	5	126	189	67%
	2,5	86	189	46%
	0	0	189	0%
DBS	750	252	252	100%
	600	252	252	100%
	360	246	250	98%
	180	220	249	88%
	90	163	252	65%
	45	109	250	44%
	0	0	107	0%

Tabla 17 Resumen de las tasas de reactividad para VIH-1 grupo O en plasma conservado en EDTA y suero

Matrices	Concentración de ARN de VIH-1 grupo O (cp/ml)	Número de reactivos	Número de réplicas válidas	% de reactividad
Plasma conservado en EDTA	40	189	189	100%
	30	189	189	100%
	20	185	188	98%
	10	163	189	86%
	5	117	189	62%
	2,5	78	189	41%
	0	0	189	0%
Suero	40	189	189	100%
	30	189	189	100%
	20	186	189	98%
	10	173	189	92%
	5	132	189	70%
	2,5	91	189	48%
	0	0	189	0%

Tabla 18 Resumen de las tasas de reactividad para VIH-2 en plasma conservado en EDTA, suero y DBS

Matrices	Concentración de ARN de VIH-2 (cp/ml)	Número de reactivos	Número de réplicas válidas	% de reactividad
Plasma conservado en EDTA	80	126	126	100%
	40	124	126	98%
	20	115	126	91%
	10	81	126	64%
	5	61	126	48%
	0	0	189	0%
Suero	80	126	126	100%
	40	125	126	99%
	20	114	126	90%
	10	96	126	76%
	5	49	126	39%
	0	0	189	0%
DBS	3000	252	252	100%
	1450	241	247	98%
	725	226	246	92%
	362	167	248	67%
	181	103	250	41%
	0	0	108	0%

Precisión intralaboratorio

La precisión de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative se ha determinado a partir de los siguientes estándares:

- Estándar Secundario de Roche para VIH-1 grupo M
- Estándar Primario de Roche para VIH-2

En el estudio se analizaron 2 paneles de fragmentos objetivo formulados individualmente de VIH-1 grupo M y VIH-2, cada uno de ellos formado por 3 miembros de panel con concentraciones de aproximadamente 0,6 x, 1 x y 3 x el LoD de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Las pruebas se han realizado para determinar los siguientes componentes de variabilidad:

- Variabilidad entre días durante 4 días
- Variabilidad entre lotes con 3 lotes de reactivos diferentes de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative
- Variabilidad entre instrumentos con 3 cobas® 6800/8800 Systems diferentes

Se analizaron aproximadamente 84 réplicas con cada uno de los 3 miembros de panel para cada lote de reactivos para un total de 252 réplicas en todos los lotes de reactivos por fragmento objetivo. Los resultados de precisión se evaluaron calculando el porcentaje de resultados de las pruebas reactivas en cada nivel de concentración para cada uno de los componentes de variabilidad analizados.

Se calcularon los límites de los intervalos de confianza del 95% bilaterales de cada tasa de reactividad para cada uno de los tres niveles de VIH-1 grupo M y VIH-2 analizados durante 4 días, con 3 lotes de reactivos y 3 cobas® 6800/8800 Systems distintos. La prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative garantiza la reproducibilidad durante varios días, en varios lotes de reactivos y en diferentes instrumentos. En la Tabla 19 y la Tabla 20 se resumen los resultados de la variabilidad entre lotes.

Tabla 19 Resumen de la precisión entre lotes de los reactivos de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative (plasma conservado en EDTA)

Analito	Concentración	Lote de reactivos	% de reactividad (réplicas reactivas/válidas)	Límite inferior del intervalo de confianza del 95%	Límite superior del intervalo de confianza del 95%
VIH-1 grupo M	~3 x LoD	1	100% (84/84)	95,7%	100%
		2	100% (84/84)	95,7%	100%
		3	100% (84/84)	95,7%	100%
	~1 x LoD	1	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		2	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		3	100% (84/84)	95,7%	100%
	~0,6 x LoD	1	77,4% (65/84)	67,0%	85,8%
		2	76,2% (64/84)	65,7%	84,8%
		3	82,1% (69/84)	72,3%	89,6%
VIH-2	~3 x LoD	1	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		2	96,4% (81/84)	89,9%	99,3%
		3	100% (84/84)	95,7%	100%
	~1 x LoD	1	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		2	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		3	97,6% (82/84)	91,7%	99,7%
	~0,6 x LoD	1	66,7% (56/84)	55,5%	76,6%
		2	69,0% (58/84)	58,0%	78,7%
		3	69,0% (58/84)	58,0%	78,7%

Tabla 20 Resumen de la precisión entre lotes de los reactivos de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative (DBS)

Analito	Concentración	Lote de reactivos	% de reactividad (réplicas reactivas/válidas)	Límite inferior del intervalo de confianza del 95%	Límite superior del intervalo de confianza del 95%
VIH-1 grupo M	~3 x LoD	1	100% (84/84)	95,7%	100%
		2	100% (83/83)	95,7%	100%
		3	97,6% (82/84)	91,7%	99,7%
	~1 x LoD	1	96,4% (81/84)	89,9%	99,3%
		2	96,4% (81/84)	89,9%	99,3%
		3	95,2% (80/84)	88,3%	98,7%
	~0,6 x LoD	1	88,0% (73/83)	79,0%	94,1%
		2	83,3% (70/84)	73,6%	90,6%
		3	88,1% (74/84)	79,2%	94,1%
VIH-2	~3 x LoD	1	100% (83/83)	95,7%	100%
		2	100% (84/84)	95,7%	100%
		3	100% (83/83)	95,7%	100%
	~1 x LoD	1	97,6% (82/84)	91,7%	99,7%
		2	97,6% (82/84)	91,7%	99,7%
		3	98,8% (83/84)	93,5%	100%
	~0,6 x LoD	1	88,1% (74/84)	79,2%	94,1%
		2	91,7% (77/84)	83,6%	96,6%
		3	85,7% (72/84)	76,4%	92,4%

Verificación del grupo/subtipo e inclusividad

El rendimiento de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative para los subtipos de VIH-1 grupo M, grupo O y grupo N y del VIH-2 grupo B se evaluó mediante:

- La verificación del límite de detección para los subtipos de VIH-1 grupo M, grupo O (verificado mediante dilución en sangre total de DBS) y grupo N y de VIH-2 grupo B
- La verificación de la inclusividad para los subtipos de VIH-1 grupo M, grupo O y grupo N y de VIH-2 grupos A y B

Verificación del límite de detección para los subtipos de VIH-1 grupo M , grupo O y grupo N y de VIH-2 grupo B

Se diluyeron muestras clínicas o cultivos de muestras del VIH para el VIH-1 grupo M (A, C, D, F, G, H) y formas recombinantes circulantes (CRF01_AE, CRF02_AG), el VIH-1 grupo N y el VIH-2 grupo B en plasma conservado en EDTA, suero o sangre total de DBS y, de forma adicional, el VIH-1 grupo O en sangre total de DBS, en la concentración LoD del grupo/subtipo predominante (VIH-1 grupo M subtipo B o VIH-2 grupo A) basado en el LoD determinado con el análisis PROBIT del 95% en todos los lotes combinados. La determinación de la tasa de reactividad se llevó a cabo con 42 réplicas. El análisis se realizó con 1 lote de reactivos para la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Los resultados

para VIH-1 se muestran en la Tabla 21 y los resultados para VIH-2, en la Tabla 22. Estos resultados verifican que la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative es capaz de detectar el VIH del grupo M de VIH-1 (A, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG), el VIH-1 grupo O, el VIH-1 grupo N y el VIH-2 grupo B en la concentración esperada para cada matriz o en una concentración inferior con un intervalo de confianza superior del 95% igual o mayor que la tasa de reactividad esperada del 95%.

Tabla 21 Verificación del LoD para los subtipos de VIH-1 grupo M, grupo O y grupo N en plasma conservado en EDTA, suero o sangre total de DBS

Grupo	Subtipo	Plasma: 12,6 cp/ml			Suero: 12,1 cp/ml			DBS: 255 cp/ml		
		Número de réplicas válidas	Número de reactivos	% de reactivos (IC* del 95%)	Número de réplicas válidas	Número de reactivos	% de reactivos (IC* del 95%)	Número de réplicas válidas	Número de reactivos	% de reactivos (IC* del 95%)
M	A	42	40	95% (99%)	42	40	95% (99%)	41	37	90% (97%)
	C	42	41	98% (100%)	42	42	100% (99,4%)	42	42	100% (100%)
	D	42	37	88% (96%)	42	37	88% (96%)	42	39	93% (99%)
	F	42	38	90% (97%)	42	38	90% (97%)	42	40	95% (99%)
	G	42	40	95% (99%)	42	39	93% (99%)	42	42	100% (100%)
	H	42	38	90% (97%)	42	41	98% (100%)	42	41	98% (100%)
	CRF01_AE	42	38	90% (97%)	42	38	90% (97%)	42	41	98% (100%)
	CRF02_AG	42	36	86% (95%)	42	39	93% (99%)	42	42	100% (100%)
O		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	41	39	95% (99%)
N		42	39	93% (99%)	42	37	88% (96%)	41	40	98% (100%)

* Intervalo de confianza superior del 95%

Tabla 22 Verificación del LoD para VIH-2 grupo B en plasma conservado en EDTA, suero o sangre total de DBS

Grupo	Plasma: 27,9 cp/ml			Suero: 23,4 cp/ml			DBS: 984 cp/ml		
	Número de réplicas válidas	Número de positivos	% de reactivos (IC* del 95%)	Número de réplicas válidas	Número de positivos	% de reactivos (IC* del 95%)	Número de réplicas válidas	Número de positivos	% de reactivos (IC* del 95%)
B	42	42	100% (100%)	42	42	100% (100%)	42	42	100% (100%)

* Intervalo de confianza superior del 95%

Verificación de la inclusividad para los subtipos de VIH-1 grupo M, grupo O y grupo N y del VIH-2 grupo B

El rendimiento de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative para la detección de los subtipos de VIH-1 grupo M (A, C, D, F, G, H, J, K) y formas recombinantes circulantes (CRF01_AE, CRF02_AG, CRF12_BF, CRF14_BG), VIH-1 grupo O, VIH-1 grupo N, VIH-2 grupo A y VIH-2 grupo B se determinó analizando muestras clínicas únicas y/o cultivos de muestras aislados para cada grupo o subtipo en suero o plasma conservado en EDTA.

VIH-1 grupo M

Se analizó un total de 105 muestras clínicas únicas de VIH-1 grupo M con subtipo de VIH-1 conocido tanto sin diluir como diluidas con una concentración $\sim 5 \times \text{LoD}$ de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Las 105 muestras clínicas con subtipos conocidos se detectaron sin diluir y con una concentración de $\sim 5 \times \text{LoD}$ (Tabla 23).

También se analizaron 4 muestras de VIH-1 grupo M subtipo CRF12_BF y 1 muestra clínica de VIH-1 grupo M subtipo CRF14_BG tras la preparación de las series de dilución. Se analizó 1 réplica de cada una de las muestras sin diluir y 1 de cada dilución de 1:1,0E+01 a 1:5,0E+02 (de 2 a 4 diluciones por muestra) para VIH-1 grupo M subtipo CRF12_BF y de 1:2,0E+01 a 1:1,2E+02 (4 diluciones) para VIH-1 grupo M subtipo CRF14_BG. Todos los resultados obtenidos fueron reactivos. Todas las muestras clínicas analizadas se detectaron con una concentración $\leq 5 \times \text{LoD}$.

Tabla 23 Muestras clínicas de VIH-1 grupo M

Subtipo/Formas recombinantes circulantes	% de reactividad (muestras reactivas/analizadas) sin diluir	% de reactividad (muestras reactivas/analizadas) diluidas a $\sim 5 \times \text{LoD}$
A	100% (10/10)	100% (10/10)
C	100% (10/10)	100% (10/10)
D	100% (10/10)	100% (10/10)
F	100% (10/10)	100% (10/10)
G	100% (10/10)	100% (10/10)
H	100% (10/10)	100% (10/10)
J	100% (5/5)	100% (5/5)
K	100% (9/9)	100% (9/9)
CRF01_AE	100% (10/10)	100% (10/10)
CRF02_AG	100% (10/10)	100% (10/10)
CRF12_BF	100% (2/2)	100% (2/2)
CRF14_BG	100% (9/9)	100% (9/9)

VIH-1 grupo O y VIH-1 grupo N

Se analizó un total de 10 muestras clínicas o cultivos de muestras de VIH-1 grupo O y 1 muestra clínica o cultivo de muestra de VIH-1 grupo N tras la preparación de la serie de dilución. Se analizaron 2 réplicas de cada una de las muestras sin diluir y 4 de cada dilución de 1:1,0E+01 a 1:4,8E+05 (de 3 a 5 diluciones por muestra) para VIH-1 grupo O. Todos los resultados obtenidos fueron reactivos. Se analizaron 2 réplicas de muestra sin diluir y 4 de cada dilución de 1:1,0E+04 a 1:1,4E+05 (5 diluciones) para VIH-1 grupo N. La muestra sin diluir y las diluciones de 1:1,0E+04 a 1:4,5E+04 obtuvieron resultados 100% reactivos, mientras que la dilución 1:1,4E+05 obtuvo un resultado reactivo al 50%. Todas las muestras analizadas se detectaron con una concentración $\leq 3 \times \text{LoD}$.

VIH-2

Se analizó un total de 16 muestras clínicas únicas o cultivos de muestras de VIH-2 grupo A y grupo B tanto sin diluir como diluidas con una concentración $\sim 5 \times \text{LoD}$ de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Las 16 muestras de VIH-2 se detectaron sin diluir y con una concentración de $\sim 5 \times \text{LoD}$ (Tabla 24).

También se analizaron 6 muestras clínicas de VIH-2 grupo A y 4 de VIH-2 grupo B tras la preparación de las series de dilución. Se analizó 1 réplica de cada una de las muestras sin diluir y 1 de cada dilución de 1:1,0E+01 a 1:9,0E+02 (de 2 a 5 diluciones por muestra) para VIH-2 grupo A y de 1:2,0E+01 a 1:6,0E+01 (de 2 a 4 diluciones) para VIH-2 grupo B. Todos los resultados obtenidos fueron reactivos. Todas las muestras clínicas analizadas se detectaron con una concentración $\leq 3 \times \text{LoD}$.

Tabla 24 Muestras clínicas o cultivos de muestras del VIH-2

Subtipo	% de reactividad (muestras reactivas/analizadas) sin diluir	% de reactividad (muestras reactivas/analizadas) diluidas a $\sim 5 \times \text{LoD}$
A	100% (4/4)	100% (4/4)
B	100% (6/6)	100% (6/6)

Especificidad

La especificidad de la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative se determinó mediante el análisis de muestras de plasma conservado en EDTA negativas para VIH, suero negativo para VIH o DBS negativas para VIH obtenidas de donantes de sangre individuales. Se analizó un total de 613 muestras individuales de plasma conservado en EDTA y 607 muestras individuales de suero con 2 lotes de reactivos para la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative. También se analizaron 604 muestras DBS individuales con 3 lotes de reactivos para la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Todas las muestras analizadas obtuvieron resultados no reactivos para VIH-1 y VIH-2. En todas las muestras de plasma conservado en EDTA, suero o DBS, la especificidad de la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative fue del 100% (límite de confianza del 95%: $\geq 99,5\%$).

Paneles de seroconversión

El rendimiento de la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative se evaluó mediante paneles de seroconversión para VIH-1 grupo M disponibles en el mercado.

Paneles de seroconversión para VIH-1 grupo M

Se utilizaron 25 paneles de seroconversión comercializados. Se analizó cada miembro del panel sin diluir con la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative y se compararon los resultados con los resultados obtenidos mediante una prueba serológica de VIH Ag/Ab de 4ª generación autorizada por la FDA y una prueba de ácidos nucleicos de comparación autorizada por la FDA realizadas con miembros del panel sin diluir. En la Tabla 25 se muestran los resultados de rendimiento generales.

Tabla 25 Rendimiento de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative en los paneles de seroconversión de VIH

Panel de seroconversión de VIH	Número de miembros del panel analizados	Número de miembros del panel con resultado reactivo			Días hasta el primer resultado reactivo			Días de antelación en la detección con la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	
		cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	NAT comparativa	Ensayo de VIH Ag/Ab	cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	NAT comparativa	Ensayo de VIH Ag/Ab	NAT comparativa	Ensayo de VIH Ag/Ab
HIV6243	10	6	6	4	18	18	25	0	7
HIV9011	11	3	3	2	30	30	38	0	8
HIV9012	8	5	5	3	9	7	16	-2	7
HIV9013	7	3	2	2	18	23	23	5	5
HIV9018	10	5	5	3	21	21	28	0	7
HIV9020	21	5	5	3	83	83	90	0	7
HIV9022	9	3	4	2	23	17	25	-6	2
HIV9030	16	6	5	3	40	40	47	0	7
HIV9031	19	8	6	4	120	131	146	11	26
HIV9034	13	4	4	3	41	41	46	0	5
HIV9076	9	3	3	3	66	66	66	0	0
HIV9089	6	5	5	3	7	7	16	0	9
HIV12008	13	7	7	5	21	21	28	0	7
PRB954	7	5	5	2	7	7	17	0	10
PRB956	5	4	4	2	40	40	47	0	7
PRB958	6	6	6	4	0	0	7	0	7
PRB961	9	4	4	2	19	19	27	0	8
PRB962	6	4	4	2	7	7	14	0	7
PRB963	7	4	5	2	9	7	17	-2	8
PRB967	6	5	5	3	3	3	17	0	14
PRB968	10	6	6	4	15	15	26	0	11
PRB969	10	7	6	3	53	53	70	0	17
PRB973	4	4	4	2	0	0	7	0	7
PRB976	4	4	4	2	0	0	7	0	7
PRB977	4	4	2	2	0	-*	13	-*	13
Total	230	120	115	70					

* Resultado no válido para la prueba NAT de comparación del primer miembro del panel PRB977, para el que se esperaba un resultado NAT reactivo. Por este motivo, el panel (PRB977) no se incluyó en la evaluación de los resultados de la prueba NAT de comparación.

Especificidad analítica

Se evaluó la especificidad analítica de la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative para la reactividad cruzada con un panel de microorganismos con una concentración de 10^5 o 10^6 partículas, copias o UFP/ml de aislados víricos y cepas bacterianas/aislados de levadura, respectivamente (Tabla 26). Los microorganismos se añadieron a plasma humano conservado en EDTA negativo para el VIH y se analizaron con y sin virus del VIH-1 y el VIH-2 añadido a una concentración de aproximadamente 3 x LoD de la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative para cada virus. La prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative generó resultados no reactivos para todas las muestras de microorganismos sin fragmento objetivo de VIH-1 y VIH-2 y resultados reactivos para todas las muestras de microorganismos con fragmentos objetivos del VIH-1 y el VIH-2. Los microorganismos analizados no presentan reactividad cruzada ni interfieren con la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative.

Tabla 26 Microorganismos analizados para reactividad cruzada

Virus		Bacterias	Levadura
Adenovirus tipo 5	Virus de la varicela zóster	Propionibacterium acnes	Candida albicans
Citomegalovirus	Virus del Nilo Occidental	Staphylococcus aureus	
Virus de Epstein-Barr	Virus de la encefalitis de St. Louis		
Virus de la hepatitis A	Virus de la encefalitis del Valle Murray		
Virus de la hepatitis B	Virus del dengue tipos 1, 2, 3 y 4		
Virus de la hepatitis C	Virus TBE (cepa HYPR)		
Virus de la hepatitis D	Virus de la gripe A		
Virus linfotrópico de células T humanas tipos 1 y 2	Virus Zika		
Virus del herpes humano tipo 6	Virus del papiloma humano		
Virus del herpes simple tipos 1 y 2	Virus de la fiebre amarilla		

Se analizaron muestras de plasma conservado en EDTA pertenecientes a cada uno de los estadios de la enfermedad (una del adenovirus tipo 5 y diez del resto de los estadios de la enfermedad) indicados en la Tabla 27 con y sin virus del VIH-1 y el VIH-2 añadido a una concentración de aproximadamente 3 x LoD de la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative para cada virus. Estas fases de la enfermedad no presentan reactividad cruzada ni interfieren con la prueba **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative.

Tabla 27 Muestras de cada estadio de la enfermedad analizadas para la especificidad analítica

Estadio de la enfermedad		
Adenovirus tipo 5	Virus de la hepatitis B	Virus del herpes simple tipo 2
Citomegalovirus	Virus de la hepatitis C	Virus linfotrópico de células T humanas tipo I
Virus del dengue	Virus de la hepatitis E	Virus linfotrópico de células T humanas tipo II
Virus de Epstein-Barr	Virus del herpes simple tipo 1	Virus del Nilo Occidental

Especificidad analítica: sustancias interferentes

Se analizaron niveles elevados de triglicéridos (33 g/l), bilirrubina conjugada (0,2 g/l), bilirrubina no conjugada (0,2 g/l), albúmina (60 g/l), hemoglobina (2 g/l) y ADN humano (2 mg/l) en muestras, así como la presencia de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR) y anticuerpos antinucleares (ANA), en presencia y ausencia de ARN de VIH-1 y VIH-2.

También se analizaron los compuestos farmacológicos de la Tabla 28 con una concentración tres veces superior a la $C_{\max}$ tanto en presencia como en ausencia de ARN de VIH-1 y VIH-2.

Ninguna de las posibles sustancias interferentes afecta al rendimiento de la prueba a excepción de los triglicéridos y el ADN humano. Con concentraciones mayores de 25 g/l de triglicéridos y de 1,5 mg/l de ADN humano, pueden obtenerse resultados inválidos a causa de la interferencia. La prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative generó resultados no reactivos para todas las muestras sin fragmento objetivo de VIH y resultados reactivos para todas las muestras con fragmentos objetivos de VIH-1 y VIH-2.

Tabla 28 Compuestos farmacológicos analizados para la interferencia mediante la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

Clase de fármaco	Nombre genérico del fármaco	
Moduladores del sistema inmunológico	Peginterferón $\pm$ 2a	Ribavirina
	Peginterferón $\pm$ 2b	
Inhibidores VHC	Simeprevir	Sofosbuvir
Inhibidores de la transcriptasa inversa o de la polimerasa de ADN	Emtricitabina	Tenofovir
	Entecavir	Adefovir dipivoxil
	Foscarnet	Telbivudina
	Cidofovir	Aciclovir
	Lamivudina	Valganciclovir
	Ganciclovir	
Compuestos para el tratamiento de infecciones oportunistas	Azitromicina	Pirazinamida
	Claritromicina	Rifabutina
	Etambutol	Rifampicina
	Fluconazol	Sulfametoxazol
	Isoniazida	Trimetoprima
Estatina	Atorvastatina	
Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina	Fluoxetina	Paroxetina
	Sertralina	
Antihistamínico	Loratadina	
Beta bloqueador	Nadolol	
Descongestivo	Fenilefrina HCl	
Fármaco antiinflamatorio no esteroideo	Naproxeno	Ibuprofeno
Analgésico	Acetaminofeno	Ácido acetilsalicílico
Vitaminas	Ácido ascórbico	

Correlación

Suero y plasma conservado en EDTA

Se comparó el rendimiento de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative con el de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative v2.0 (muestras de plasma conservado en EDTA del VIH-1) y con el de una prueba de diferenciación de anticuerpos de VIH-1/VIH-2 con marcado CE (muestras de suero y plasma de VIH-1 y VIH-2 conservado en EDTA).

Para la correlación con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative v2.0, se analizaron muestras clínicas de plasma conservado en EDTA en un centro externo. Para las muestras clínicas de plasma conservado en EDTA positivas para el VIH-1 y negativas para el VIH-1, ambas pruebas mostraron un porcentaje de concordancia del 100%, lo que demuestra que el rendimiento de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative y el de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative v2.0 son equivalentes (Tabla 29).

Tabla 29 Resumen de resultados de la correlación de métodos para las muestras de plasma de VIH-1 conservado en EDTA

Correlación de métodos muestras de plasma de VIH-1 conservado en EDTA		Prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative v2.0	
		Reactivo	No reactivo
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Reactivo	68	0
	No reactivo	0	80

Para la comparación con una prueba de diferenciación de anticuerpos de VIH-1/VIH-2 con marcado CE, se analizaron muestras clínicas de suero o plasma conservado en EDTA en un centro externo. Las muestras de plasma conservado en EDTA positivas para VIH-1 y negativas para VIH-1 mostraron un porcentaje de concordancia total del 100% entre ambas pruebas. Las muestras de plasma conservado en EDTA positivas para VIH-2 y negativas para VIH-2 mostraron un porcentaje de concordancia total del 99,7% entre ambas pruebas. Esto demuestra que el rendimiento de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative y el de la prueba de diferenciación de anticuerpos de VIH-1 y VIH-2 es equivalente (Tabla 30 y Tabla 31).

Tabla 30 Resumen de resultados de la correlación de métodos para las muestras de suero y plasma de VIH-1 conservado en EDTA

Correlación de métodos muestras de suero y plasma de VIH-1 conservado en EDTA		Prueba de diferenciación de anticuerpos de VIH-1 y VIH-2 con marcado CE		
		Reactivo	No reactivo	Indeterminado
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Reactivo	138	0	0
	No reactivo	0	164	1*

* Se confirmó que la muestra con un resultado no reactivo con la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative y un resultado indeterminado con la prueba de diferenciación de anticuerpos de VIH-1/VIH-2 con marcado CE era negativa mediante una prueba serológica del VIH Ag/Ab de 4ª generación con marcado CE.

Tabla 31 Resumen de resultados de la correlación de métodos para las muestras de suero y plasma conservado en EDTA del VIH-2

Correlación de métodos muestras de suero y plasma de VIH-2 conservado en EDTA		Prueba de diferenciación de anticuerpos de VIH-1 y VIH-2 con marcado CE		
		Reactivo	No reactivo	Indeterminado
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Reactivo	14	0	0
	No reactivo	1	287	1*

* Se confirmó que la muestra con un resultado no reactivo con la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative y un resultado indeterminado con la prueba de diferenciación de anticuerpos de VIH-1/VIH-2 con marcado CE era negativa mediante una prueba serológica del VIH Ag/Ab de 4ª generación con marcado CE.

DBS

Se comparó el rendimiento de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative con el de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative v2.0 mediante el análisis de muestras clínicas DBS procedentes de bebés en un centro externo. Para las muestras DBS positivas para VIH-1 y negativas para VIH-1, ambas pruebas mostraron un porcentaje de concordancia del 99,6%, lo que demuestra que el rendimiento de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative y el de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative v2.0 es equivalente (Tabla 32).

Tabla 32 Resumen de resultados de la correlación de métodos para las muestras DBS de VIH-1

Correlación de métodos muestras DBS de VIH-1		Prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative v2.0	
		Reactivo	No reactivo
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Reactivo	127	1*
	No reactivo	0	151

* Se confirmó que la muestra con un resultado reactivo para la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative y un resultado no reactivo para la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative v2.0 era positiva para VIH-1 mediante PCR anidada.

Fallo de todo el sistema

La tasa de fallo de todo el sistema para la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative se determinó mediante el análisis de 100 réplicas de plasma conservado en EDTA y 100 réplicas de sangre total de DBS a las que se añadió VIH-1 grupo M subtipo B y VIH-2. Estas muestras se analizaron con una concentración de fragmento objetivo de aproximadamente 3 x LoD.

Los resultados del estudio indican que todas las réplicas fueron válidas y positivas para los fragmentos objetivo de VIH-1 y VIH-2, lo que representa una tasa de fallo de todo el sistema del 0% para las muestras de plasma conservado en EDTA y DBS. El intervalo de confianza bilateral exacto del 95% fue del 0% para el límite inferior y del 3,6% para el límite superior para cada fragmento objetivo y matriz.

Contaminación cruzada

La tasa de contaminación cruzada de la prueba cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative se determinó mediante el análisis de 240 réplicas de una muestra DBS negativa para VIH y 225 réplicas de una muestra DBS con un título alto de VIH-1 de 2,0E+07 cp/ml. El estudio se realizó siguiendo el flujo de trabajo de preparación de muestras DBS. En total, se realizaron cinco series con muestras positivas y negativas utilizando un método de ensayo con configuración de tablero de ajedrez.

Las 240 réplicas de la muestra negativa resultaron no reactivas, por lo que la tasa de contaminación cruzada es del 0%. El intervalo de confianza del 95% fue del 0% para el límite inferior y del 1,5% para el límite superior.

Información adicional

Características principales de la prueba

Tipo de muestra	Plasma conservado en EDTA, suero y muestra de sangre seca (DBS)		
Cantidad mínima de muestra necesaria	650 µl para las muestras de plasma conservado en EDTA y suero o 1 muestra DBS (70 µl de sangre seca por muestra) en 1.150 µl de cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER)		
Volumen de procesamiento de muestras	500 µl para las muestras de plasma conservado en EDTA y suero o 850 µl para las muestras DBS		
Sensibilidad analítica		<u>VIH-1M</u>	<u>VIH-2</u>
	Plasma conservado en EDTA	12,6 cp/ml	27,9 cp/ml
	Suero	12,1 cp/ml	23,4 cp/ml
	DBS	255 cp/ml	984 cp/ml
Especificidad	100% (intervalo de confianza unilateral del 95%: 99,5%) (plasma conservado en EDTA/suero) 100% (intervalo de confianza unilateral del 95%: 99,5%) (DBS)		
Grupos/Subtipos – inclusividad	VIH-1M (A-D, F-H, J, K, CRF01_AE, CRF02_AG, CRF12_BF, CRF14_BG), VIH-1O, VIH-1N, VIH-2 (A y B)		

Símbolos

Los símbolos siguientes se emplean en el rotulado de todos los productos de diagnóstico por PCR de Roche.

Tabla 33 Símbolos utilizados en las etiquetas de los productos de PCR para diagnóstico de Roche



Software auxiliar



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Límite inferior del intervalo asignado



Hoja de datos del código de barras



Fabricante



Código de lote



Almacenar en la oscuridad



Riesgo biológico



Suficiente para $\langle n \rangle$ pruebas



Número de catálogo



Límite de temperatura



Consulte las instrucciones de uso



Archivo de definición de pruebas



Contenido del kit



Límite superior del intervalo asignado



Distribuido por



Fecha de caducidad



Para evaluación del rendimiento IVD únicamente



Global Trade Item Number (número mundial de un artículo comercial)

Rx Only

Solamente para EE. UU.: la ley federal de los Estados Unidos sólo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo autorizado o bajo prescripción médica.



Fecha de fabricación



El presente producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79/CE de productos sanitarios para el diagnóstico *in vitro*.

Servicio técnico para clientes de EE. UU.: 1-800-526-1247

Fabricante y distribuidores

Tabla 34 Fabricante y distribuidores



Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 USA
www.roche.com



Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marcas registradas y patentes

Consulte la página <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

Copyright

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Bibliografia

1. AAHVM. Fundamentals of HIV Medicine. Washington, DC;2007.
2. UNAIDS. Global AIDS Update. Geneva;2016.
3. Hoover DR, Saah AJ, Bacellar H, et al. Clinical manifestations of AIDS in the era of pneumocystis prophylaxis. *N Engl J Med*. 1993;329(69):1922-6.
4. Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clin Infect Dis*. 2011;52(6):780-7.
5. CDC. Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection. Atlanta, GA;2014.
6. Gökengin D, Geretti AM, Begovac J, et al. 2014 European Guideline on HIV testing. *Int J STD AIDS*. 2014;25(10):695-704.
7. Masciotra S, McDougal JS, Feldman J, Sprinkle P, Wesolowski L, Owen SM. Evaluation of an alternative HIV diagnostic algorithm using specimens from seroconversion panels and persons with established HIV infections. *J Clin Virol*. 2011;52 Suppl 1:S17-22.
8. O'Brien M, Markowitz M. Should we treat acute HIV infection? *Current HIV/AIDS Reports*. 2012;9(2):101-10.
9. Branson BM, Mermin J. Establishing the diagnosis of HIV infection: new tests and a new algorithm for the United States. *J Clin Virol*. 2011;52 Suppl 1:S3-4.
10. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 2011;364(20):1943-54.
11. World Health Organization. Diagnosis of HIV infection in infants and children. Geneva, 2010.
12. Wittek M, Stürmer M, Doerr HW, Berger A. Molecular assays for monitoring HIV infection and antiretroviral therapy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2007;7(3):237-46.
13. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8.
14. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93.
15. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-78.
16. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 1992;10:413-7.
17. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94.
18. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

Revisión del documento

Información de revisión del documento	
Doc Rev. 3.0 01/2019	Descripción actualizada de las pruebas de cribado utilizadas para la detección del NHP en la tabla 2 , la tabla 3 y en el apartado Advertencias y precauciones . Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.
Doc Rev. 4.0 02/2019	Se ha actualizado el número del organismo notificado en la marca CE. Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.
Doc Rev. 5.0 01/2020	Se han actualizado las afirmaciones del apartado Especificidad analítica: sustancias interferentes . Se ha actualizado la tabla 14 para eliminar algunos de los resultados de la prueba no válidos así como interpretaciones irrelevantes. Se ha modificado el título del apartado Reproducibilidad a Precisión intralaboratorio y el término “reproducibilidad” se ha sustituido por “precisión” en el texto correspondiente. Se ha actualizado la página de símbolos armonizados. Se han actualizado las direcciones de las filiales de distribución. Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.