

# **cobas<sup>®</sup> MTB**

---

## **Prueba de ácidos nucleicos para uso en los sistemas cobas<sup>®</sup> 5800/6800/8800**

Para diagnóstico *in vitro*

**cobas<sup>®</sup> MTB**

P/N: 09040579190

**Para uso en el sistema cobas<sup>®</sup> 5800**

**cobas<sup>®</sup> MTB Positive Control Kit**

P/N: 09040587190

**cobas<sup>®</sup> Buffer Negative Control Kit**

P/N: 09051953190

**Para uso en sistemas cobas<sup>®</sup> 6800/8800**

**cobas<sup>®</sup> MTB Positive Control Kit**

P/N: 07544812190 o

P/N: 09040587190

**cobas<sup>®</sup> Buffer Negative Control Kit**

P/N: 07002238190 o

P/N: 09051953190

## Tabla de contenido

<b>Uso previsto .....</b>	<b>4</b>
<b>Resumen y explicación de la prueba.....</b>	<b>4</b>
<b>Reactivos y materiales.....</b>	<b>7</b>
Reactivos y controles de cobas® MTB.....	7
Reactivos cobas® omni para la preparación de muestras.....	9
Requisitos de almacenamiento de los reactivos .....	10
Requisitos para la manipulación de reactivos en el sistema cobas® 5800 .....	10
Requisitos para la manipulación de reactivos en los sistemas cobas® 6800/8800 .....	11
Material adicional necesario para el sistema cobas® 5800.....	11
Material adicional necesario para los sistemas cobas® 6800/8800 .....	12
Instrumentos y software necesarios.....	13
<b>Precauciones y requisitos de manipulación.....</b>	<b>14</b>
Advertencias y precauciones.....	14
Manipulación de reactivos .....	15
Buenas prácticas de laboratorio.....	15
<b>Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras.....</b>	<b>16</b>
Muestras .....	16
Transporte y almacenamiento de las muestras .....	16
Almacenamiento de muestras inactivadas.....	16
<b>Instrucciones de uso .....</b>	<b>17</b>
Notas sobre el procedimiento.....	17
Procesamiento de muestras de esputo crudo .....	20
Procesamiento de sedimentos de esputo y de LBA.....	20
Sonicación de las muestras.....	21
Ejecución de la prueba cobas® MTB en el sistema cobas® 5800 .....	22
Ejecución de la prueba cobas® MTB en los sistemas cobas® 6800/8800.....	23

<b>Resultados</b> .....	<b>25</b>
Control de calidad y validez de los resultados en el sistema <b>cobas</b> ® 5800.....	25
Resultados del control en el sistema <b>cobas</b> ® 5800.....	25
Control de calidad y validez de los resultados en los sistemas <b>cobas</b> ® 6800/8800 .....	25
Interpretación de los resultados .....	26
Interpretación de los resultados en el sistema <b>cobas</b> ® 5800.....	26
Interpretación de los resultados en los sistemas <b>cobas</b> ® 6800/8800 .....	27
Limitaciones del procedimiento.....	28
<b>Evaluación del rendimiento</b> .....	<b>30</b>
Características clave de rendimiento de los sistemas <b>cobas</b> ® 6800/8800.....	30
Inactivación de la muestra.....	30
Límite de detección (LoD).....	30
Inclusividad .....	30
Precisión.....	31
Especificidad analítica/reactividad cruzada .....	32
Interferencia .....	34
Fallo de todo el sistema .....	36
Contaminación por arrastre .....	36
Rendimiento con muestras clínicas.....	36
Equivalencia entre sistemas/Comparación de sistemas .....	38
<b>Información adicional</b> .....	<b>39</b>
Características principales del ensayo .....	39
Símbolos .....	40
Asistencia técnica .....	41
Fabricante.....	41
Marcas registradas y patentes .....	41
Derechos de autor .....	41
Bibliografía .....	42
Revisión del documento.....	43

## Uso previsto

cobas® MTB para uso en los sistemas cobas® 5800/6800/8800 es una prueba cualitativa automatizada de diagnóstico *in vitro* que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real para la detección directa de ADN del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) en muestras respiratorias humanas, incluidas muestras de esputo crudo, así como muestras de esputo y muestras de lavado broncoalveolar (LBA) digeridas y descontaminadas (tratadas con N-acetil-L-cisteína/NaOH [NALC-NaOH]).

Esta prueba debe utilizarse con muestras procedentes de pacientes sospechosos de infección por *Mycobacterium tuberculosis* que no estén en tratamiento antituberculosis. Esta prueba está diseñada como complemento en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar junto con hallazgos obtenidos en el laboratorio, así como síntomas y signos clínicos.

## Resumen y explicación de la prueba

### Información de referencia

La tuberculosis es una infección bacteriana causada por el MTBC que constituye uno de los principales problemas de salud global y la principal causa de muerte por enfermedades infecciosas en todo el mundo.<sup>1</sup> La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de una cuarta parte de la población mundial está infectada por MTB, con una estimación de 10,6 millones de nuevas infecciones de TB y 1,3 millones de muertes en 2022.<sup>1</sup> Se estima que las personas con VIH/SIDA (PVVS) representan 167.000 de los 1,3 millones de muertes.<sup>1</sup>

El complejo *M. tuberculosis* comprende un grupo de especies estrechamente relacionadas con el género de *Mycobacterium* que causa enfermedad en humanos y animales y que incluye *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG (bacilo de Calmette-Guérin), *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. suricattae*, *M. orygis*, bacilo de Dassie y bacilo de chimpancé. Mientras que la infección con cualquier miembro del complejo MTB puede derivar en tuberculosis, la especie *M. tuberculosis* es la causa más frecuente. La enfermedad pulmonar es la patología más común causada por el complejo MTB. Puede presentarse una enfermedad extrapulmonar, si bien esta es relativamente más prevalente en niños. La especie *M. bovis* es la causa de tuberculosis en hasta un 2,8 % de pacientes en diferentes escenarios geográficos.<sup>2</sup> Los miembros del complejo MTB distintos de *M. bovis* y *M. tuberculosis* son causas menos frecuentes de enfermedad en humanos. La especie *M. tuberculosis* se ha asociado a elefantes, tanto en cautividad como en estado salvaje.<sup>3</sup> La especie *M. africanum* se ha relacionado con tuberculosis en países de África Occidental, la especie *M. canetti* con el Cuerno de África y la especie *M. orygis* causa tuberculosis en humanos y animales desde África hasta Asia del Sur. La especie *M. caprae* se considera una subespecie de *M. bovis*. La especie *M. microti* es causa de la enfermedad principalmente en roedores, la especie *M. pinnipedii* se relaciona con la enfermedad en focas y la especie *M. suricattae* provoca tuberculosis en suricatas de África del Sur. La especie *M. mungi* se ha identificado como causa de la tuberculosis en mangostas rayadas.<sup>4</sup>

La tuberculosis se contagia entre las personas a través de pequeñas gotas procedentes de las vías respiratorias. La mayoría de los afectados por la *M. tuberculosis* son asintomáticos y pueden contener la enfermedad después de la infección primaria. A esto se le denomina una infección de tuberculosis latente. Las infecciones latentes pueden durar décadas y, en la mayoría de los casos, no convertirse nunca en una enfermedad clínica. En algunas personas, el organismo vence las defensas inmunitarias, lo que provoca la progresión de una infección de tuberculosis latente a una tuberculosis activa. Esto suele ocurrir, o bien en los dos primeros años de infección, o bien después de periodos prolongados de latencia.

En general, existe un riesgo del 5-10 % de que los pacientes con infección latente desarrollen una enfermedad de TB activa; sin embargo, el riesgo varía como resultado de numerosos factores, pudiendo aumentar significativamente por la inmunosupresión derivada del tratamiento con “agentes biológicos”<sup>5</sup> (p. ej., inhibidores del FNT) y la infección por VIH.<sup>6,7</sup> Las personas que padecen una enfermedad de TB pulmonar activa pueden expulsar pequeñas gotitas al toser o al hablar o durante los procedimientos médicos. Las personas con una enfermedad pulmonar activa se consideran altamente infecciosas, por lo que resulta imprescindible su diagnóstico.

El diagnóstico de una TB activa se basa en los hallazgos o sospechas clínicas, así como en estudios de laboratorio y radiográficos. Se puede solicitar a los pacientes que suministren muestras respiratorias para frotis y cultivos micobacterianos de bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR), así como para pruebas de amplificación directa de ácidos nucleicos. Resulta imprescindible realizar el cultivo micobacteriano junto con las pruebas de ácidos nucleicos para ayudar a mitigar el riesgo de resultados negativos falsos y para permitir las pruebas de sensibilidad a fármacos en pacientes con resultados positivos.

El tratamiento de la tuberculosis implica una administración prolongada de varios fármacos y suele ser efectivo. Sin embargo, el tratamiento de cepas de MTB resistentes a uno o varios fármacos dificulta la curación. El tratamiento de la TB farmacorresistente y multirresistente (MDR-TB) es complejo y requiere la administración de múltiples medicamentos tóxicos para una mayor duración que los pacientes de TB farmacosensible, con una menor probabilidad de éxito del tratamiento.<sup>8</sup> El tratamiento de las formas más graves de TB polirresistente como la TB altamente resistente (XDR-TB) se asocia a resultados más deficientes que la MDR-TB.<sup>1</sup>

El diagnóstico de la TB puede establecerse gracias a la presentación clínica, los hallazgos de laboratorio y radiográficos, incluidos frotis de bacterias ácido-alcohol resistentes, cultivos micobacterianos, y las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos. Adicionalmente, también pueden utilizarse ensayos que miden la respuesta de anticuerpos o antígenos (p. ej., la prueba cutánea de la tuberculina o el ensayo de liberación de interferón gamma [INF $\gamma$ ] (IGRA)).<sup>2</sup> Sin embargo, la prueba cutánea de la tuberculina y los ensayos IGRA pueden resultar negativos en enfermedades activas al no ser capaces de diferenciar una infección latente de una enfermedad activa. El diagnóstico definitivo de la enfermedad se confirma mediante la recuperación del organismo responsable en el cultivo o mediante la detección directa del ácido nucleico del complejo MTB en una muestra clínica. Se requieren pruebas de farmacosenibilidad (DST) para confirmar el tratamiento empírico pero estas requieren mucho tiempo porque se necesitan varias semanas para obtener los resultados según el método. De forma alternativa, los marcadores genéticos asociados a la farmacorresistencia pueden detectarse directamente a partir de muestras clínicas o de aislados en cultivo mediante métodos moleculares para obtener resultados más rápidamente. Dada la naturaleza infecciosa de la MTB y la presencia de una resistencia emergente, un diagnóstico rápido y preciso es de vital importancia para el tratamiento y el control de la MTB.<sup>2</sup>

## Explicación de la prueba

La prueba cobas® MTB para uso en los sistemas cobas® 5800/6800/8800 es una prueba cualitativa automatizada de PCR a tiempo real diseñada para detectar ADN del complejo MTB en muestras respiratorias humanas, incluidas muestras de esputo crudo, y sedimentos de esputo y de lavado broncoalveolar (LBA) digeridos y descontaminados, tratados con NALC-NaOH. El control interno de ADN, utilizado para supervisar el proceso completo de preparación de la muestra y amplificación de la PCR en los sistemas cobas® 5800/6800/8800, se introduce en cada muestra durante el procesamiento. Además, la prueba utiliza un control positivo de título bajo y un control negativo.

## Principios del procedimiento

La prueba cobas® MTB se basa en la licuefacción de la muestra y la inactivación de micobacterias en la preanalítica seguidas de una sonicación y preparación de la muestra totalmente automatizada (extracción y purificación de los ácidos nucleicos) y la amplificación y detección mediante PCR. Los procesos de licuefacción de la muestra e inactivación de micobacterias tienen lugar de forma simultánea durante la incubación de la muestra con el reactivo cobas® Microbial Inactivation Solution (MIS). La sonicación de la muestra licuada e inactivada se realiza antes de cargarla en los sistemas cobas® 5800/6800/8800. El sistema cobas® 5800 se ha diseñado como un único instrumento integrado. Los sistemas cobas® 6800/8800 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 mediante el software del sistema cobas® 5800 o los sistemas cobas® 6800/8800, que asigna los resultados a las pruebas como positivos, negativos o no válidos. Los resultados pueden revisarse directamente en la pantalla del sistema, exportarse o imprimirse como informe.

La extracción de ácidos nucleicos de las muestras de paciente, los controles externos y las moléculas de ADN del control interno añadido (DNA-IC) se realiza simultáneamente. En resumen, los ácidos nucleicos bacterianos se liberan mediante la ruptura química (cobas® Microbial Inactivation Solution [MIS], cobas® **omni** Lysis Reagent), enzimática (proteínasa) y física (sonicación) de las bacterias. 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 los posibles inhibidores de la PCR se eliminan en los siguientes pasos de lavado, mientras que 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 de la diana de la muestra se lleva a cabo mediante cebadores que van en un sentido y en sentido contrario específicos para la diana del complejo MTB que se seleccionan de regiones altamente conservadas dentro del respectivo organismo diana. La MTB se detecta mediante dos conjuntos selectivos de cebadores y dos sondas dirigidos a regiones independientes (diana doble, gen ARNr 16S y genes *esx*: *esxJ*, *esxK*, *esxM*, *esxP* y *esxW*). La amplificación selectiva de control interno de ADN (DNA IC) se realiza mediante cebadores que van en un sentido y en sentido contrario específicos de la secuencia y que se seleccionan de modo que no presenten ninguna homología con las regiones de la diana del complejo MTB. Para el proceso de amplificación mediante PCR se utiliza una enzima ADN polimerasa termoestable. La amplificación de las secuencias diana y DNA-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). La enzima AmpErase, que se incluye en la Master Mix para PCR, elimina los amplicones contaminados de las series de PCR anteriores durante el primer termociclado.<sup>9</sup> Sin embargo, los amplicones nuevos no se eliminan porque la enzima AmpErase se inactiva cuando se expone a temperaturas superiores a los 55 °C.

El reactivo de Master Mix de cobas® MTB contiene dos sondas de detección específicas para las secuencias diana del complejo MTB y una para el DNA-IC. Las sondas específicas para la diana están marcadas con marcadores emisores fluorescentes para permitir la detección simultánea de fragmentos diana del complejo MTB y DNA-IC en dos canales diana distintos.<sup>10,11</sup> Cuando no se une a la secuencia de la diana, la señal fluorescente de las sondas intactas se elimina mediante el 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 causa 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 diferenciación en tiempo real de los productos de PCR se consigue mediante

cuantificación de la fluorescencia liberada por los marcadores emisores para las dianas del complejo MTB y del DNA-IC, respectivamente.

## Reactivos y materiales

### Reactivos y controles de cobas® MTB

Los materiales suministrados para el ensayo cobas® MTB se detallan en la Tabla 1. Todos los reactivos y controles sin abrir deben almacenarse como se recomienda de la Tabla 1 a la Tabla 4. Los materiales necesarios no proporcionados se indican de la Tabla 2 a la Tabla 4 y de la Tabla 8 a la Tabla 10.

Consulte los apartados **Reactivos y materiales** y **Precauciones y requisitos de manipulación** para obtener información sobre los peligros del producto.

**Tabla 1** cobas® MTB

#### cobas® MTB

Almacenar a 2-8 °C

Casete para 384 pruebas (P/N 09040579190)

Componentes del kit	Composición del reactivo	Cantidad por kit
<b>Solución de proteinasa (PASE)</b>	Buffer Tris, < 0,05 % de EDTA, cloruro de calcio, acetato de calcio, 8 % de proteinasa, glicerol  EUH210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad. EUH208: Contiene subtilisina de <i>Bacillus subtilis</i> . Puede provocar una reacción alérgica.	38 ml
<b>Control interno de ADN (DNA-IC)</b>	Buffer Tris, < 0,05 % de EDTA, < 0,001 % de constructo de ADN diferente de MTB, 0,002 % de ARN Poli rA (sintético), < 0,1 % de azida sódica	38 ml
<b>Buffer de elución (EB)</b>	Buffer Tris, 0,2 % de metil-4-hidroxibenzoato	38 ml
<b>Reactivo 1 de Master Mix (MMX-R1)</b>	Acetato de manganeso, hidróxido potásico, < 0,1 % de azida sódica	14,5 ml
<b>Reactivo 2 de Master Mix para MTB (MTB MMX-R2)</b>	Buffer Tricina, acetato de potasio, EDTA, glicerol, 18 % de sulfóxido de dimetilo, < 0,12 % de dATP, dCTP, dGTP y dUTP, < 0,1 % de Tween 20, < 0,1 % de azida sódica, < 0,1 % de ADN polimerasa Z05, < 0,1 % de enzima AmpErase (uracilo-N-glicosilasa) (microbiana), < 0,01 % de cebadores que van en un sentido y en otro para el control interno, < 0,01 % de cebadores ascendente y descendente para MTB, < 0,01 % de sondas oligonucleótidas marcadas con fluorescente específicas para el complejo MTB y el control interno de ADN, < 0,01 % de aptámero oligonucleótido	17,5 ml

**Tabla 2** cobas® MTB Positive Control Kit**cobas® MTB Positive Control Kit**

Almacenar a 2-8 °C

Para uso en el sistema cobas® 5800 (P/N 09040587190)

Para uso en sistemas cobas® 6800/8800 (P/N 07544812190 o P/N 09040587190)

Componentes del kit	Composición del reactivo	Cantidad por kit
<b>Control positivo para MTB (MTB (+) C)</b>	Buffer Tris, < 0,05 % de azida sódica, < 0,05 % de EDTA, 0,002 % de poli Ar, < 0,01 % de ADN plasmídico no infeccioso (microbiano) con secuencia genómica de <i>M. tuberculosis</i>	16 ml (16 × 1 ml)

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

Almacenar a 2-8 °C


Para uso en el sistema cobas® 5800 (P/N 09051953190)

Para uso en sistemas cobas® 6800/8800 (P/N 07002238190 o P/N 09051953190)

Componentes del kit	Composición del reactivo	Cantidad por kit
<b>Control negativo para el buffer de cobas® (BUF (-) C)</b>	Buffer Tris, < 0,1 % de azida sódica, EDTA, 0,002 % de ARN poli Ar (sintético)	16 ml (16 × 1 ml)

## Reactivos cobas® omni para la preparación de muestras

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

Reactivos	Composición del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia**
<b>cobas® omni MGP Reagent (MGP)</b> 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
<b>cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL)</b> Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997511190)	Buffer Tris, 0,1 % de metil-4 hidroxibenzoato, < 0,1 % de azida sódica	4 × 875 ml	No aplicable
<b>cobas® omni Lysis Reagent (LYS)</b> 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 × 875 ml	 <p><b>PELIGRO</b></p> <p>H302: Nocivo por ingestión. H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. H411: Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. EUH071: Corrosivo para las vías respiratorias. P273: Evítese su liberación al medio ambiente. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección/protección para los oídos. P303 + P361 + P353: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Enjuagar la piel con agua. P304 + P340 + P310: EN CASO DE INHALACIÓN: transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. 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. P391: Recoger los derrames. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol</p>
<b>cobas® omni Wash Reagent (WASH)</b> 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 cobas® MTB. Consulte el listado de material adicional necesario (Tabla 8 a Tabla 10).

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

\*\*\* Mezcla o sustancia peligrosa.

## Requisitos de almacenamiento de los reactivos

Los reactivos deben almacenarse y manipularse según las indicaciones de la Tabla 5, la Tabla 6 y la Tabla 7.

Cuando los reactivos no están cargados en el sistema cobas® 5800 o los sistemas cobas® 6800/8800, almacénelos a la temperatura correspondiente especificada en la Tabla 5.

**Tabla 5** Almacenamiento de reactivos (cuando el reactivo no está cargado en el sistema)

Reactivo	Temperatura de almacenamiento
cobas® MTB	2-8 °C
cobas® MTB Positive Control Kit	2-8 °C
cobas® Buffer 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

## Requisitos para la manipulación de reactivos en el sistema cobas® 5800

Los reactivos cargados en el sistema cobas® 5800 se almacenan a la temperatura correspondiente adecuada y el sistema controla su fecha de caducidad. El sistema solamente permite utilizar los reactivos cuando se cumplen todas las condiciones indicadas en la Tabla 6. El sistema evita automáticamente el uso de reactivos caducados. La Tabla 6 ayuda al usuario a entender las condiciones de manipulación de los reactivos del sistema cobas® 5800.

**Tabla 6** Condiciones de caducidad de los reactivos del sistema cobas® 5800

Reactivo	Fecha de caducidad del kit	Estabilidad del kit abierto	Series en las que se puede utilizar el kit	Periodo de estabilidad
cobas® MTB	No caducado	90 días desde el primer uso	Máx. 40 series	Máx. 36 días <sup>b</sup>
cobas® MTB Positive Control Kit	No caducado	No aplicable <sup>a</sup>	No aplicable	Máx. 36 días <sup>b</sup>
cobas® Buffer Negative Control Kit	No caducado	No aplicable <sup>a</sup>	No aplicable	Máx. 36 días <sup>b</sup>
cobas® omni Lysis Reagent	No caducado	30 días desde la carga <sup>b</sup>	No aplicable	No aplicable
cobas® omni MGP Reagent	No caducado	30 días desde la carga <sup>b</sup>	No aplicable	No aplicable
cobas® omni Specimen Diluent	No caducado	30 días desde la carga <sup>b</sup>	No aplicable	No aplicable
cobas® omni Wash Reagent	No caducado	30 días desde la carga <sup>b</sup>	No aplicable	No aplicable

<sup>a</sup> Reactivos de un solo uso.

<sup>b</sup> El tiempo se calcula desde la primera vez que se carga el reactivo en el sistema cobas® 5800.

## Requisitos para la manipulación de reactivos en los sistemas cobas® 6800/8800

Los reactivos cargados en los sistemas cobas® 6800/8800 se almacenan a la temperatura correspondiente adecuada y el sistema controla su fecha de caducidad. Los sistemas cobas® 6800/8800 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 sistemas cobas® 6800/8800.

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

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 del refrigerador)
cobas® MTB	No caducado	90 días desde el primer uso	Máx. 40 series	Máx. 40 horas
cobas® MTB Positive Control Kit	No caducado	No aplicable <sup>a</sup>	No aplicable	Máx. 10 horas
cobas® Buffer Negative Control Kit	No caducado	No aplicable <sup>a</sup>	No aplicable	Máx. 10 horas
cobas® omni Lysis Reagent	No caducado	30 días desde la carga <sup>b</sup>	No aplicable	No aplicable
cobas® omni MGP Reagent	No caducado	30 días desde la carga <sup>b</sup>	No aplicable	No aplicable
cobas® omni Specimen Diluent	No caducado	30 días desde la carga <sup>b</sup>	No aplicable	No aplicable
cobas® omni Wash Reagent	No caducado	30 días desde la carga <sup>b</sup>	No aplicable	No aplicable

<sup>a</sup> Reactivos de un solo uso.

<sup>b</sup> El tiempo se calcula desde la primera vez que se carga el reactivo en los sistemas cobas® 6800/8800.

## Material adicional necesario para el sistema cobas® 5800

**Tabla 8** Material y fungibles para el uso en el sistema cobas® 5800

Material	P/N
cobas® omni Processing Plate 24	08413975001
cobas® omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas® omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Punta CORE TIPS con filtro, 1 ml	04639642001
Punta CORE TIPS con filtro, 300 µl	07345607001
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
o	o
Bolsa para residuos sólidos con inserto	08030073001

## Material adicional necesario para los sistemas cobas® 6800/8800

**Tabla 9** Materiales y fungibles para el uso en los sistemas **cobas®** 6800/8800

Material	P/N
<b>cobas®</b> <b>omni</b> Processing Plate	05534917001
<b>cobas®</b> <b>omni</b> Amplification Plate	05534941001
<b>cobas®</b> <b>omni</b> Pipette Tips	05534925001
<b>cobas®</b> <b>omni</b> Liquid Waste Container	07094388001
<b>cobas®</b> <b>omni</b> Lysis Reagent	06997538190
<b>cobas®</b> <b>omni</b> MGP Reagent	06997546190
<b>cobas®</b> <b>omni</b> Specimen Diluent	06997511190
<b>cobas®</b> <b>omni</b> Wash Reagent	06997503190
Bolsa para residuos sólidos y recipiente de residuos sólidos	07435967001 y 07094361001
o	o
Bolsa para residuos sólidos con inserto y actualización del kit del cajón de residuos sólidos	08030073001 y 08387281001

**Tabla 10** Otros materiales y consumibles necesarios únicamente para el flujo de trabajo preanalítico

Materiales
<b>cobas®</b> Microbial Inactivation Solution (P/N 08185476001)
Sonicador de tubos TS 5 (Rinco Ultrasonics AG — P/N 46690)
Tubos de polipropileno de 5 ml con tapones con rosca de 75 × 13 mm, base redonda (Sarstedt — P/N de los tubos 60.504.010, P/N de los tapones de rosca 65.163)*
MPA RACK 13 MM LIGHT GREEN 7001-7050 (Roche — P/N 03118878001 o equivalente)**
Centrífuga (opción para limitar la FCR a un máximo de 3.000 × g, compatible con tubos con tapón de rosca de 75 × 13 mm)
Agitador en vórtex
Etiquetas de código de barras termoestables (OPAL Associates AG, P/N 20300824 TTR PE-Folie Pharma o equivalente)***

\* Para utilizar tubos distintos a los recomendados más arriba el usuario debe verificarlos antes de su implementación en el flujo de trabajo de la prueba **cobas®** MTB en el laboratorio.

\*\* Se requieren racks MPA de 13 mm para utilizar el sonicador de tubos TS 5. Póngase en contacto con su representante local de Roche para obtener una lista de pedido detallada para racks de muestras equivalentes en otros colores o rangos numéricos. Tenga en cuenta que los racks RD5 no son compatibles con el sonicador de tubos TS 5.

\*\*\* Para obtener más detalles sobre las especificaciones de los códigos de barras, consulte la Asistencia al usuario y/o la Guía del usuario de los sistemas **cobas®** 5800/6800/8800. Para utilizar etiquetas de código de barras distintas a las recomendadas más arriba, el usuario debe verificarlas antes de su implementación en el flujo de trabajo de la prueba **cobas®** MTB en el laboratorio. Póngase en contacto con su representante local de Roche para obtener más información sobre las etiquetas de códigos de barras compatibles así como sugerencias para la comprobación de la compatibilidad. El uso de etiquetas de códigos de barras no compatibles puede provocar daños en los tubos durante el proceso de sonicación y contaminación en el instrumento.

## Instrumentos y software necesarios

El software **cobas**® 5800 y el paquete de análisis **cobas**® MTB para el sistema **cobas**® 5800 deben instalarse en el instrumento **cobas**® 5800. El software Data Manager y el PC para el sistema **cobas**® 5800 se suministran con el sistema.

Es necesario instalar el software **cobas**® 6800/8800 y el paquete de análisis **cobas**® MTB para los sistemas **cobas**® 6800/8800 en los instrumentos **cobas**® 6800/8800. El servidor IG (Instrument Gateway) se suministra con el sistema.

**Tabla 11** Instrumentos

<b>Equipo</b>	<b>P/N</b>
Sistema <b>cobas</b> ® 5800	08707464001
Sistema <b>cobas</b> ® 6800 (opción móvil)	06379672001
Sistema <b>cobas</b> ® 6800 (fijo)	05524245001
Sistema <b>cobas</b> ® 8800	05412722001
Módulo de suministro de muestras	06301037001

Consulte la Asistencia al usuario y/o las Guías del usuario del sistema **cobas**® 5800 o los sistemas **cobas**® 6800/8800 para obtener información adicional.

# 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.
- Todas las muestras de pacientes deben considerarse como potencialmente infecciosas. Por lo tanto, todas las muestras biológicas deben tratarse como si fueran infecciosas, utilizando los procedimientos de laboratorio recomendados y la evaluación de riesgos adecuada que se describen en la publicación Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, en el documento M29-A4 del CLSI y en el Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis de la OMS.<sup>12-14</sup> Solamente el personal competente en la manipulación de material biopeligroso y en el uso de la prueba cobas® MTB y los sistemas cobas® 5800/6800/8800 deberían llevar a cabo este procedimiento.
- Todo el personal debe utilizar un equipo de protección individual que incluya bata de laboratorio, guantes desechables y protección ocular y respiratoria de acuerdo con los procedimientos y prácticas de seguridad del centro, así como seguir los procedimientos de seguridad del centro referentes al trabajo con sustancias químicas y muestras biológicas.
- Cada laboratorio debe determinar los pasos necesarios para la manipulación de muestras antes y después de la inactivación mediante MIS basados en una evaluación de riesgos adecuada y según las regulaciones de bioseguridad recomendadas y las directrices o reglamentos locales e institucionales.<sup>14</sup> El éxito de la inactivación de la TB depende del cumplimiento de los procedimientos descritos en este documento y en una mezcla total de la muestra con el reactivo MIS. La licuefacción de muestras y la inactivación micobacteriana mediante MIS debería realizarse conforme a las directrices o reglamentos locales e institucionales y según una evaluación de riesgos adecuada.
- Si se produce un derrame de las muestras en el MIS (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.
- Si se derraman muestras en el reactivo MIS, limpie PRIMERO con detergente apto para laboratorio y agua, y luego con etanol al 70 %.
- El reactivo MIS es sensible a la luz y se suministra en botellas con protección lumínica. El MIS debe almacenarse en posición vertical.
- Utilice solo el material fungible suministrado o que se requiera expresamente para garantizar el rendimiento establecido para la prueba.
- 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 el rendimiento establecido para la prueba.
- Podrían producirse resultados falsos positivos si no se evita la contaminación por arrastre de las muestras durante la manipulación y el procesamiento de las mismas.
- Puede solicitar ficha de datos de seguridad (Safety Data Sheets, SDS) al representante local de Roche.
- Informe a la autoridad competente local y al fabricante de cualquier incidente grave que pueda tener lugar durante la realización del ensayo.

## Manipulación de reactivos

- Manipule todos los reactivos, controles y muestras de acuerdo con las mejores prácticas de laboratorio para evitar la contaminación por arrastre de las muestras, los reactivos o los controles.
- Antes de utilizarlos, revise cada casete de reactivo, diluyente, reactivo de lisis y reactivo de lavado para asegurarse de que no hay signos de fugas. No utilice el material si hay alguna evidencia de fuga.
- El **cobas® omni** Lysis Reagent y el reactivo MIS 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.
- No permita que el **cobas® omni** Lysis Reagent o el MIS, que contienen tiocianato de guanidina, entren en contacto con la solución de hipoclorito de sodio (lejía). Tales mezclas pueden producir gases de alta toxicidad.
- Los kits de control usados contienen viales perforados con reactivo residual. Extrema la precaución durante su eliminación para evitar derrames y el contacto.
- La prueba **cobas® MTB**, el **cobas® MTB Positive Control Kit**, el **cobas® Buffer Negative Control Kit**, 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.
- 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.
- Trate todas las muestras biológicas, incluidas las muestras tratadas con MIS, como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos según las directrices o reglamentos locales e institucionales y/o de acuerdo con una evaluación de riesgos adecuada.<sup>14</sup> Utilice guantes, bata de laboratorio y protección ocular y respiratoria cuando manipule las muestras y los reactivos de acuerdo con las directrices del centro. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras y de los controles. Es necesario cambiarse los guantes entre la manipulación de las muestras y la prueba **cobas® MTB**, el **cobas® MTB Positive Control Kit**, el **cobas® Buffer Negative Control Kit** y los reactivos **cobas® omni** para evitar la contaminación.
- Desinfectese y lávese bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos, y al quitarse los guantes.
- Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo del laboratorio usando una solución recién preparada de hipoclorito de sodio o potasio al 0,6 % en agua destilada o desionizada. A continuación, límpielas con un trapo impregnado en etanol al 70 %.
- Si el derrame se produce sobre un sistema **cobas® 5800/6800/8800**, siga las instrucciones descritas en la Asistencia al usuario o la Guía del usuario de los sistemas **cobas® 5800** o **cobas® 6800/8800** 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.

## Muestras

Para la prueba cobas® MTB pueden utilizarse muestras de esputo crudo y sedimentos de esputo y LBA tratados con NALC-NaOH.

## Transporte y almacenamiento de las muestras

Las muestras de esputo crudo pueden almacenarse y/o transportarse un máximo de 3 días a una temperatura de 2 °C a 35 °C, seguido de un periodo de hasta 7 días a una temperatura de 2 °C a 8 °C antes de los procesos de licuefacción e inactivación de la muestra mediante el reactivo MIS. Para el almacenamiento a largo plazo de muestras de esputo crudo no tratadas con MIS se recomiendan temperaturas  $\leq -20$  °C.

Las muestras de sedimento de esputo y de sedimento de LBA tratadas con NALC-NaOH pueden almacenarse un máximo de 7 días a una temperatura de 2 °C a 8 °C antes de la inactivación de la muestra mediante el MIS. Para el almacenamiento a largo plazo de sedimentos de esputo y de LBA no tratados con MIS, las muestras pueden almacenarse congeladas a temperaturas  $\leq -20$  °C un máximo de 9 meses incluidos dos ciclos de congelación/descongelación.

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 infecciosas y agentes etiológicos.

## Almacenamiento de muestras inactivadas

Las muestras de esputo crudo y de sedimento de esputo y de sedimento de LBA tratados con NALC-NaOH que se hayan tratado con el reactivo MIS (inactivadas) pueden almacenarse un máximo de 12 horas a una temperatura de 15 °C a 35 °C, seguido de un periodo de hasta 7 días a una temperatura de 2 °C a 8 °C y 30 días a  $\leq -20$  °C incluidos dos ciclos de congelación/descongelación antes de procesarlas en los sistemas cobas® 5800/6800/8800.

**Nota:** es posible que las muestras tratadas con MIS no se congelen debido al elevado contenido de isopropanol.

**Nota:** la sonicación de las muestras puede realizarse en cualquier momento después de una incubación inicial con el reactivo MIS durante un mínimo de 60 minutos. Consulte el apartado “Sonicación de las muestras” para obtener información detallada.

# Instrucciones de uso

## Notas sobre el procedimiento











- No utilice la prueba cobas® MTB, el cobas® MTB Positive Control Kit, el cobas® Buffer Negative Control Kit, el MIS ni ningún reactivo cobas® omni después de su fecha de caducidad.
- No reutilice el material fungible. Son de un solo uso.
- Asegúrese de que las etiquetas de código de barras termoestables de los tubos de muestras están orientadas hacia las ranuras situadas en la parte superior del lateral de los racks de muestras MPA y puedan verse a través de ellas. Consulte la Ilustración 1 y la Asistencia al usuario y/o las Guías del usuario de los sistemas cobas® 5800/6800/8800 para conocer las especificaciones de códigos de barras adecuadas e información adicional sobre la carga de tubos de muestras.
- Cerciórese de destapar los tubos de muestras después de la sonicación y antes de cargarlos en los sistemas cobas® 5800/6800/8800.
- Consulte la Asistencia al usuario y/o la Guía del usuario de los sistemas cobas® 5800/6800/8800 para obtener información sobre el correcto mantenimiento de los instrumentos.

Antes de realizar la prueba cobas® MTB en los sistemas cobas® 5800/6800/8800, las muestras deben procesarse de acuerdo con los apartados siguientes: “Procesamiento de muestras de esputo crudo” o “Procesamiento de sedimentos de esputo y de LBA” y “Sonicación de las muestras”. Los flujos de trabajo representativos abreviados se resumen en la Tabla 12 para muestras de esputo crudo y en la Tabla 13 para muestras de sedimento. Para obtener más detalles, siga leyendo los apartados siguientes.











**Nota:** la manipulación de muestras antes y después de la inactivación mediante cobas® MIS debería realizarse según las directrices o reglamentos locales e institucionales y de acuerdo con una evaluación de riesgos adecuada.<sup>14</sup>

**Nota:** la sonicación de las muestras tratadas con MIS debería realizarse según las directrices o reglamentos locales e institucionales y de acuerdo con una evaluación de riesgos adecuada.<sup>14</sup>

**Tabla 12** Resumen de flujos de trabajo — Muestra de esputo crudo

1				Añadir 2 partes de MIS a 1 parte de esputo crudo
2		30-60 segundos		Agite fuertemente o agite en vórtex durante 30-60 segundos
3		≥ 60 minutos		Incubar la muestra como mínimo 60 minutos a 15-30 °C (temperatura ambiente)
4		30-60 segundos		Agite fuertemente o agite en vórtex durante 30-60 segundos
5		1,2 ml para 1 prueba 2,4 ml para 2 pruebas 3,6 ml para 3 pruebas		Transferir de 1,2 a 3,6 ml de muestra tratada con MIS a un tubo secundario con tapón con rosca
6		5 minutos		Sonicar la muestra tratada con MIS
7		Máx. 1 minuto		Centrifugar la muestra como máximo 1 minuto a una FCR máxima de 3.000 × g
8				Cargar la muestra sin tapar en el sistema <b>cobas</b> ® 5800 o los sistemas <b>cobas</b> ® 6800/8800 e iniciar la serie analítica con el tipo de muestra de esputo crudo

**Tabla 13** Resumen de flujos de trabajo — Muestra de sedimento

1		0,2 ml para 1 prueba 0,4 ml para 2 pruebas 0,6 ml para 3 pruebas	Agitar en vórtex y transferir de 0,2 a 0,6 ml de muestra de sedimento a un tubo secundario con tapón con rosca
2	  		<p>Añadir 5 partes de MIS a 1 parte de muestra de sedimento</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 ml de MIS para 1 prueba (0,2 ml de muestra de sedimento)</li> <li>• 2 ml de MIS para 2 pruebas (0,4 ml de muestra de sedimento)</li> <li>• 3 ml de MIS para 3 pruebas (0,6 ml de muestra de sedimento)</li> </ul>
3		30-60 segundos	Agite fuertemente o agite en vórtex durante 30-60 segundos
4		≥ 60 minutos	Incubar la muestra como mínimo 60 minutos a 15-30 °C (temperatura ambiente)
5		30-60 segundos	Agite fuertemente o agite en vórtex durante 30-60 segundos
6		5 minutos	Sonicar la muestra tratada con MIS
7		Máx. 1 minuto	Centrifugar la muestra como máximo 1 minuto a una FCR máxima de 3.000 × g
8			Cargar la muestra sin tapar en el sistema cobas® 5800 o los sistemas cobas® 6800/8800 e iniciar la serie analítica con el tipo de muestra de sedimento

## Procesamiento de muestras de esputo crudo

- Confirme que el recipiente de esputo crudo está correctamente etiquetado y contiene un mínimo de 0,4 ml de esputo. Si se ha almacenado congelada, descongele y equilibre la muestra a temperatura ambiente.
- Invierta las botellas de MIS de dos a cuatro veces antes de su uso.
- Abra el recipiente de esputo y añada aproximadamente dos partes de MIS a una parte de muestra de esputo (p. ej., 2 ml de MIS a 1 ml de muestra de esputo) mediante una estimación de volumen visual y con una pipeta desechable. Cierre bien el recipiente de esputo.
- Cierre las botellas de MIS inmediatamente después de usarlas.
- Agite fuertemente o agite en vórtex durante 30-60 segundos.

**Nota:** asegúrese de que la muestra de esputo se mezcla completamente con el reactivo MIS.

- Incube la muestra como mínimo 60 minutos a 15-30 °C (temperatura ambiente).

**Nota:** consulte el apartado “Almacenamiento de muestras inactivadas” para conocer las condiciones de almacenamiento máximas.

- Agite fuertemente o agite en vórtex durante 30-60 segundos o hasta que la muestra esté completamente homogeneizada.
- Transfiera un mínimo de 1,2 ml y un máximo de 3,6 ml de muestra de esputo tratada con MIS a un tubo de polipropileno de 5 ml con tapón de rosca y código de barras termoestable de 75 × 13 mm y base redonda (Sarstedt — P/N del tubo 60.504.010, P/N del tapón 65.163). Cierre bien el tubo.

**Nota:** antes de transferir la muestra, confirme que la información del código de barras del recipiente de esputo coincide con la del tubo secundario de 5 ml.

**Nota:** consulte la Tabla 14.

- Lleve a cabo la sonicación de la muestra inactivada de acuerdo con el apartado “Sonicación de las muestras” antes de realizar la prueba cobas® MTB.

## Procesamiento de sedimentos de esputo y de LBA

- Confirme que el recipiente de sedimento de esputo y de sedimento de LBA tratados con NALC-NaOH está correctamente etiquetado y contiene un mínimo de 0,2 ml de muestra. Si se ha almacenado congelada, descongele y equilibre la muestra a temperatura ambiente.
- Agite en vórtex la muestra de sedimento durante un mínimo de 10 segundos.
- Transfiera un mínimo de 0,2 ml y un máximo de 0,6 ml de muestra de sedimento a un tubo de polipropileno de 5 ml con tapón de rosca y código de barras de 75 × 13 mm y base redonda (Sarstedt — P/N del tubo 60.504.010, P/N del tapón 65.163).

**Nota:** antes de transferir la muestra confirme que la información del código de barras del recipiente de muestra coincide con la del tubo secundario de 5 ml.

- Invierta las botellas de MIS de dos a cuatro veces antes de su uso.

- Añada cinco partes de MIS a una parte de muestra (p. ej., 1 ml de MIS a 0,2 ml de muestra). Cierre bien el tubo.

**Nota:** consulte la Tabla 14.

- Cierre las botellas de MIS inmediatamente después de usarlas.
- Agite fuertemente o agite en vórtex durante 30-60 segundos.

**Nota:** asegúrese de que la muestra se mezcla completamente con el reactivo MIS.

- Incube la muestra como mínimo 60 minutos a 15-30 °C (temperatura ambiente).

**Nota:** consulte el apartado “Almacenamiento de muestras inactivadas” para conocer las condiciones de almacenamiento máximas.

- Agite fuertemente o agite en vórtex durante 30-60 segundos.
- Lleve a cabo la sonicación de la muestra inactivada de acuerdo con el apartado “Sonicación de las muestras” antes de realizar la prueba cobas® MTB.

**Tabla 14** Requisitos de volumen de muestra tratada con cobas® Microbial Inactivation Solution para realizar la prueba cobas® MTB

Pruebas que se realizarán desde tubo secundario	Volumen mínimo requerido de muestra tratada con MIS	Volumen máximo permitido de muestra tratada con MIS
1 petición de prueba	1,2 ml	3,6 ml
2 peticiones de pruebas*	2,4 ml	3,6 ml
3 peticiones de pruebas*	3,6 ml	3,6 ml

\* Se puede usar para el procesamiento en un lote mixto con otros ensayos cobas® 5800/6800/8800 utilizando el mismo tipo de muestra o para una prueba de repetición.

## Sonicación de las muestras

- El proceso de sonicación de las muestras para realizar la prueba cobas® MTB debe llevarse a cabo en un dispositivo sonicador de tubos TS 5 de Rinco Ultrasonics AG (P/N 46690). El uso de otros dispositivos de sonicación puede generar resultados falsos positivos, falsos negativos y/o inválidos. El funcionamiento del instrumento se describe con detalle en la Guía del usuario del fabricante.
- Coloque cinco tubos con tapón de rosca cerrados y etiquetados con código de barras que contengan de 1,2 ml a 3,6 ml de muestra tratada con MIS en un rack MPA.

**Nota:** asegúrese de que las etiquetas de código de barras termoestables de los tubos de muestras están orientadas hacia las ranuras situadas en la parte superior del lateral de los racks de muestras MPA y puedan verse a través de ellas (consulte la Ilustración 1).

**Nota:** compruebe que cada tubo contiene una etiqueta de código de barras.

**Nota:** asegúrese de que están ocupadas las cinco posiciones de tubo del rack MPA. Si hay disponibles menos de cinco tubos con muestra tratada con MIS, las posiciones restantes deben ocuparse con tubos “comodín” llenos de agua o MIS del mismo tipo de tubo y con una etiqueta de código de barras.

**Ilustración 1** Colocación correcta de los tubos de muestra en un rack MPA antes de la sonicación

- Inicie el sonicador de tubos.
- Seleccione el perfil de sonicación predefinido “Respiratory Samples” (Muestras respiratorias).
- Abra el dispositivo sonicador de tubos e inserte el rack MPA siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Cierre el sonicador de tubos.
- Inicie la serie de sonicación.
- Confirme que la serie de sonicación ha finalizado correctamente y retire el rack MPA.

**Nota:** los tubos de muestra se calientan durante la serie de sonicación. Preste atención cuando retire el rack MPA con los tubos de muestra.

**Nota:** si la sonicación no se realiza correctamente, consulte las instrucciones del fabricante, corrija la causa del fallo y repita la serie de sonicación después de permitir el enfriamiento de las muestras durante 15 minutos como mínimo.

- Ahora, las muestras tratadas con MIS y sonicadas pueden ejecutarse con la prueba **cobas® MTB** o bien almacenarse según las condiciones especificadas en el apartado “Almacenamiento de muestras inactivadas”.

## Ejecución de la prueba **cobas® MTB** en el sistema **cobas® 5800**

La prueba **cobas® MTB** puede realizarse con un volumen de muestra mínimo de 1,2 ml, de los cuales se procesan 850 µl. El procedimiento de la prueba se describe con detalle en la Asistencia al usuario o la Guía del usuario del sistema **cobas® 5800**. En la Ilustración 2 se resume el procedimiento.

- Antes de destapar los tubos y cargar las muestras en el sistema **cobas® 5800**, se recomienda sedimentar los restos celulares y de la matriz mediante centrifugación de la muestra durante 1 minuto como máximo a una FCR máxima de  $3.000 \times g$ .
- Una sola serie puede combinar varios tipos de muestras (esputo crudo, sedimento).

**Nota:** agite en vórtex las muestras un mínimo de 10 segundos si las muestras han estado almacenadas durante más de 1 hora después de la sonicación y antes de la centrifugación.

**Nota:** la omisión del paso de centrifugación puede resultar en un incremento de la tasa de coágulos en la muestra en el sistema **cobas® 5800**.

**Ilustración 2** Procedimiento de la prueba cobas® MTB en el sistema cobas® 5800

<b>1</b>	Inicie una sesión en el sistema.
<b>2</b>	<p>Cargue las muestras en el sistema.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Retire el tapón de los tubos.</li> <li>• Transfiera el tubo directamente al rack.</li> <li>• Cargue los racks de muestras en el sistema.</li> <li>• El sistema se prepara automáticamente.</li> <li>• Solicite las pruebas. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Seleccione "Raw sputum" (Esputo crudo) para solicitar muestras de esputo crudo tratadas con MIS.</li> <li>• Seleccione "Sediment" (Sedimento) para solicitar muestras de sedimento de esputo/sedimento de LBA tratadas con MIS.</li> </ul> </li> </ul>
<b>3</b>	<p>Cargue los reactivos y el material fungible según las indicaciones del sistema.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cargue el casete de reactivo específico de la prueba.</li> <li>• Cargue los miniracks de control.</li> <li>• Cargue las puntas de procesamiento.</li> <li>• Cargue las puntas de elución.</li> <li>• Cargue las placas de procesamiento.</li> <li>• Cargue las placas de residuos líquidos.</li> <li>• Cargue las placas de amplificación.</li> <li>• Cargue el casete con MGP.</li> <li>• Cargue el diluyente de muestras.</li> <li>• Cargue el reactivo de lisis.</li> <li>• Cargue el reactivo de lavado.</li> </ul>
<b>4</b>	<p>Seleccione el botón de inicio de procesamiento en la interfaz de usuario para iniciar la serie analítica. Las series siguientes se iniciarán de forma automática si no se posponen manualmente.</p>
<b>5</b>	Revise y exporte los resultados.
<b>6</b>	<p>Retire y tape todos los tubos de muestra que cumplan los requisitos de volumen mínimo para utilizarlos en el futuro, en caso necesario.</p> <p>Limpie el instrumento.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Descargue los miniracks de control vacíos.</li> <li>• Descargue el casete de reactivo específico de la prueba vacío.</li> <li>• Vacíe el cajón de placas de amplificación.</li> <li>• Vacíe los residuos líquidos.</li> <li>• Vacíe los residuos sólidos.</li> </ul>

**Ejecución de la prueba cobas® MTB en los sistemas cobas® 6800/8800**

La prueba cobas® MTB puede realizarse con un volumen de muestra mínimo obligatorio de 1,2 ml, de los cuales se procesan 850 µl. El funcionamiento del instrumento se describe con detalle en la Asistencia al usuario y/o la Guía del usuario de los sistemas cobas® 6800/8800. En la Ilustración 3 se resume el procedimiento.

- Antes de destapar los tubos y cargar las muestras en los sistemas cobas® 6800/8800, se recomienda sedimentar los restos celulares y de la matriz mediante centrifugación de la muestra durante 1 minuto como máximo a una FCR máxima de 3.000 × g.

- Una sola serie puede combinar varios tipos de muestras (esputo crudo, sedimento).

**Nota:** agite en vórtex las muestras un mínimo de 10 segundos si las muestras han estado almacenadas durante más de 1 hora después de la sonicación y antes de la centrifugación.

**Nota:** la omisión del paso de centrifugación puede resultar en un incremento de la tasa de coágulos en la muestra en los sistemas cobas® 6800/8800.

### Ilustración 3 Procedimiento de la prueba cobas® MTB en los sistemas cobas® 6800/8800

<b>1</b>	<p>Inicie una sesión en el sistema. Pulse el botón "Iniciar" para preparar el sistema. Solicite las pruebas.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Seleccione "Raw sputum" (Esputo crudo) para solicitar muestras de esputo crudo tratadas con MIS.</li> <li>• Seleccione "Sediment" (Sedimento) para solicitar muestras de sedimento de esputo/sedimento de LBA tratadas con MIS.</li> </ul>
<b>2</b>	<p>Cargue los reactivos y el material fungible según las indicaciones del sistema.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cargue el casete de reactivo específico de la prueba.</li> <li>• Cargue los casetes de control.</li> <li>• Cargue las puntas de pipeta.</li> <li>• Cargue las placas de procesamiento.</li> <li>• Cargue el reactivo MGP.</li> <li>• Cargue las placas de amplificación.</li> <li>• Cargue el diluyente de muestras.</li> <li>• Cargue el reactivo de lisis.</li> <li>• Cargue el reactivo de lavado.</li> </ul>
<b>3</b>	<p>Cargue las muestras en el sistema.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Para cada muestra: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Retire el tapón del tubo.</li> <li>○ Transfiera el tubo a un rack.</li> </ul> </li> <li>• Cargue el rack de muestras y los racks para puntas obstruidas en el módulo de suministro de muestras.</li> <li>• Confirme que las muestras han sido aceptadas en el módulo de transferencia.</li> </ul>
<b>4</b>	Inicie la serie.
<b>5</b>	Revise y exporte los resultados.
<b>6</b>	<p>Retire y tape todos los tubos de muestra que cumplan los requisitos de volumen mínimo para utilizarlos en el futuro, en caso necesario.</p> <p>Limpie el instrumento.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Descargue los casetes de control vacíos.</li> <li>• Vacíe el cajón de placas de amplificación.</li> <li>• Vacíe los residuos líquidos.</li> <li>• Vacíe los residuos sólidos.</li> </ul>

## Resultados

La prueba cobas® MTB detecta automáticamente el ADN del complejo MTB para muestras y controles, y permite visualizar la validez de la prueba y los resultados individuales de cada diana.

### Control de calidad y validez de los resultados en el sistema cobas® 5800

- Se procesan un control negativo [(-) Ctrl] y un control positivo [MTB (+) C] al menos cada 72 horas y con cada lote de kit nuevo. Los controles positivos y/o negativos pueden programarse con mayor frecuencia en función de los procedimientos de laboratorio y/o la reglamentación local.
- Compruebe los avisos y los resultados asociados tanto en el software del sistema cobas® 5800 como en el informe para garantizar la validez de los resultados.

El software cobas® 5800 invalida automáticamente los resultados cuando los controles positivos o negativos fallan.

**NOTA:** el sistema cobas® 5800 se suministra con la configuración estándar para el análisis de un conjunto de controles (positivo y negativo) con cada serie, pero se puede modificar por un programa menos frecuente de hasta cada 72 horas según los procedimientos de laboratorio y la reglamentación local. Póngase en contacto con su ingeniero técnico de Roche y/o con el representante del servicio técnico al cliente de Roche para obtener más información.

### Resultados del control en el sistema cobas® 5800

Los resultados de los controles se muestran en el software cobas® 5800, en la aplicación de controles.

- Los controles se marcan como “Valid” en la columna “Resultados de control” cuando todas las dianas del control se han notificado como válidas. Los controles se marcan como “Invalid” en la columna “Resultados de control” cuando todas o alguna de las dianas del control se han notificado como no válidas.
- Los controles marcados como “Invalid” muestran un aviso en la columna “Aviso”. En la vista de detalles podrá encontrar más información sobre el motivo por el que el control se ha notificado como no válido, además de información sobre el aviso.
- Si uno de los controles no es válido, repita el análisis de todos los controles y de todas las muestras asociadas.

### Control de calidad y validez de los resultados en los sistemas cobas® 6800/8800

- En cada serie para un tipo de resultado solicitado se procesa un control negativo [(-) Ctrl] y un control positivo [MTB (+) C].
- Compruebe los avisos y los resultados asociados tanto en el software cobas® 6800/8800 como en el informe para garantizar la validez del lote.
- Todos los avisos están descritos en la Asistencia al usuario y/o la Guía del usuario de los sistemas cobas® 6800/8800.
- El lote se considera válido cuando no hay avisos para ninguno de los controles. Si el lote no es válido, repita las pruebas para todo el lote.

La validación de los resultados del lote se realiza automáticamente mediante el software **cobas**® 6800/8800 en función del rendimiento del control negativo y del control positivo, mientras que la validación de los resultados individuales de las muestras se lleva a cabo mediante el software **cobas**® 6800/8800 en función de los resultados del control interno.

## Interpretación de los resultados

Los resultados y sus interpretaciones correspondientes para la detección de MTB se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15** Resultados e interpretación de la prueba **cobas**® MTB

Diana 1	Interpretación
<b>MTB Positive</b>	El resultado solicitado es válido. Se ha detectado una señal de diana para el ADN del complejo <i>M. tuberculosis</i> .
<b>MTB Negative</b>	El resultado solicitado es válido. No se ha detectado ninguna señal de diana para el ADN del complejo <i>M. tuberculosis</i> .
<b>Invalid</b>	El resultado para MTB no es válido. La muestra original debe volver a analizarse para obtener resultados para MTB válidos. Si el resultado sigue siendo no válido y no puede descartarse un error del instrumento, deberá obtenerse una nueva muestra.

## Interpretación de los resultados en el sistema **cobas**® 5800

Los resultados de las muestras se muestran en el software del **cobas**® 5800, en la app “Resultados”.

En los lotes de control válidos, compruebe cada muestra para detectar avisos en el software **cobas**® 5800 y/o en el informe. La interpretación de resultados se debe realizar del siguiente modo:

- Las muestras asociadas con los lotes de control válidos se muestran como “Válido” en la columna “Resultados de control” cuando todos los resultados de las dianas del control se han notificado como válidos. Las muestras asociadas con los lotes de control erróneos se muestran como “No válido” en la columna “Resultados de control” cuando todos los resultados de las dianas del control se han notificado como no válidos.
- Si los controles asociados al resultado de una muestra no son válidos, se añade un aviso específico al resultado de la muestra de la siguiente manera:
  - Q05D: fallo de validación del resultado por un control positivo no válido
  - Q06D: fallo de validación del resultado por un control negativo no válido
- Los valores en la columna “Resultados” para el resultado de la diana de la muestra individual deben interpretarse como se muestra en la Tabla 15 anterior.
- Si una o más dianas de la muestra están marcadas como “Invalid”, el software **cobas**® 5800 muestra un aviso en la columna de avisos. En la vista de detalles podrá encontrar más información sobre el motivo por el que la(s) diana(s) de la muestra se ha notificado como no válidas, además de información sobre el aviso.

**Ilustración 4** Ejemplo de resultados de cobas® MTB en el sistema cobas® 5800

ID muestra	Prueba	Resultado de control	Aviso	Estado	Resultado	Fecha/Hora creación
MTB_S_pos_02	MTB	Valid		Released	<b>MTB Positive (Ct 37.99)</b>	5/12/2022 3:44:55 PM
MTB_S_pos_01	MTB	Valid		Released	<b>MTB Positive (Ct 38.76)</b>	5/12/2022 3:44:55 PM
MTB_S_neg_02	MTB	Valid		Released	MTB Negative	5/12/2022 3:44:56 PM
MTB_S_neg_01	MTB	Valid		Released	MTB Negative	5/12/2022 3:44:56 PM
MTB_S_inv_01	MTB	Valid		Released	<b>MTB Invalid</b>	5/12/2022 1:41:06 PM
MTB_RS_pos_02	MTB	Valid		Released	<b>MTB Positive (Ct 39.32)</b>	5/12/2022 3:44:54 PM
MTB_RS_pos_01	MTB	Valid		Released	<b>MTB Positive (Ct 39.53)</b>	5/12/2022 3:44:54 PM

## Interpretación de los resultados en los sistemas cobas® 6800/8800

En los lotes válidos, 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:

- Un lote válido puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos.
- Las columnas “Válido” y “Resultado global” no son aplicables a los resultados de las muestras de la prueba cobas® MTB y aparecen marcadas como “NA”. Los valores indicados en estas columnas no son aplicables y **no** influyen en la validez de los resultados comunicados en las columnas de resultados de diana individuales.
- Los resultados comunicados de las dianas para muestras individuales son válidos a no ser que se indiquen como “Invalid” en la columna de resultado de diana individual.
- Los resultados de esta prueba solo deben interpretarse junto con la información disponible de la evaluación clínica del paciente y de su historial.

**Ilustración 5** Ejemplo de resultados de cobas® MTB en los sistemas cobas® 6800/8800

Prueba	ID muestra	Válido	Avisos	Tipo de muestra	Resultado general	Diana 1
MTB 850 µl	TB_R_0001	NA		Raw sputum	<b>NA</b>	MTB Negative
MTB 850 µl	TB_R_0002	NA		Raw sputum	<b>NA</b>	MTB Positive
MTB 850 µl	TB_R_0003	NA	P02T	Raw sputum	<b>NA</b>	Invalid
MTB 850 µl	TB_S_0001	NA		Sediment	<b>NA</b>	MTB Negative
MTB 850 µl	TB_S_0002	NA		Sediment	<b>NA</b>	MTB Positive
MTB 850 µl	TB_S_0003	NA	C02H1	Sediment	<b>NA</b>	Invalid
MTB 850 µl	C161420284090428828404	Yes		(-) Ctrl	<b>Valid</b>	Valid
MTB 850 µl	C161420284093009580264	Yes		MTB (+) C	<b>Valid</b>	Valid

## Limitaciones del procedimiento

- La prueba **cobas**® MTB siempre debe realizarse junto con un cultivo micobacteriano para minimizar los riesgos de resultados falsos negativos y para permitir además la realización de pruebas de farmacosenibilidad del aislado de MTBC como ayuda en la atención del paciente.
- El rendimiento de la prueba **cobas**® MTB ha sido validado para muestras de esputo crudo y para muestras de sedimento de esputo y de sedimento de LBA que han sido licuificadas, descontaminadas y concentradas con NALC-NaOH. El uso de otros tipos de muestras puede generar resultados falsos positivos, falsos negativos y/o inválidos.
- La digestión y la descontaminación deben realizarse mediante procedimientos con NALC-NaOH recomendados por el CDC.<sup>15</sup> El uso de procedimientos preanalíticos alternativos para la preparación de las muestras puede generar resultados falsos positivos, falsos negativos y/o inválidos.
- La prueba **cobas**® MTB se ha validado para su uso con muestras de esputo crudo y muestras de sedimento de esputo y de sedimento de LBA tratadas con NALC-NaOH inactivadas químicamente con el reactivo MIS. No se ha evaluado la aplicación de otros procedimientos de inactivación y su uso puede generar resultados falsos positivos, falsos negativos y/o inválidos.
- El éxito de la inactivación de la TB depende del cumplimiento de los procedimientos descritos en este documento y en una mezcla total de la muestra con el reactivo MIS. La licuefacción de muestras y la inactivación micobacteriana mediante MIS debería realizarse conforme a las directrices o reglamentos locales e institucionales y según una evaluación de riesgos adecuada.
- Superar las limitaciones de volumen y/o desviarse de los pasos de procedimiento descritos en los apartados “Procesamiento de muestras de esputo crudo”, “Procesamiento de sedimentos de esputo y de LBA” y “Sonicación de las muestras” puede conducir a resultados falsos positivos, falsos negativos y/o inválidos.
- Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos no pueden determinar la viabilidad de un organismo.
- El éxito o fracaso terapéutico no pueden determinarse con esta prueba.
- El uso de este producto debe limitarse al personal con experiencia en el empleo de técnicas de PCR y la utilización de los sistemas **cobas**® 5800/6800/8800.
- La prueba **cobas**® MTB se ha evaluado únicamente para su uso en combinación con el **cobas**® MTB Positive Control Kit, el **cobas**® Buffer Negative Control Kit, el **cobas**® **omni** MGP Reagent, el **cobas**® **omni** Lysis Reagent, el **cobas**® **omni** Specimen Diluent y el **cobas**® **omni** Wash Reagent en los sistemas **cobas**® 5800/6800/8800, el MIS y el sonicador de tubos TS 5 de Rinco Ultrasonics AG.
- La obtención de resultados fiables depende de que los procedimientos de extracción de muestras, almacenamiento y manipulación se realicen de manera adecuada.
- La prueba **cobas**® MTB no está indicada para su uso con muestras respiratorias para la supervisión de la respuesta al tratamiento o como prueba de sanación.
- La prueba **cobas**® MTB no distingue entre las distintas especies del complejo MTB ni entre microorganismos viables y no viables.
- La detección de *M. tuberculosis* depende del número de organismos presentes en la muestra y puede verse afectada por los métodos de obtención de las mismas y factores propios del paciente (como la edad, la gravedad de la enfermedad y el estado de VIH).
- Para los pacientes infectados tanto por MTB como por VIH existe una mayor probabilidad de que las muestras sean negativas en la microscopía de frotis y, por lo tanto, presenten ADN del complejo MTB a niveles inferiores al límite de detección del ensayo.

- Los profesionales sanitarios deben interpretar los resultados en el contexto del historial del paciente, la presentación clínica y otros resultados de las pruebas de laboratorio y radiográficas.
- Pueden obtenerse resultados falsos negativos o no válidos debido a la inhibición de la polimerasa. La prueba **cobas**® MTB incluye el control interno para permitir la identificación de muestras que contienen sustancias que podrían interferir con el aislamiento de ácidos nucleicos y la amplificación mediante PCR.
- La incorporación de la enzima AmpErase al reactivo de Master Mix de la prueba **cobas**® MTB permite realizar una amplificación selectiva del ADN diana; no obstante, es imprescindible emplear las mejores prácticas de laboratorio y cumplir estrictamente los procedimientos especificados en este documento de instrucciones de uso para evitar la contaminación de los reactivos.
- Aunque es poco probable, las mutaciones en las regiones muy conservadas del ADN genómico del complejo *M. tuberculosis* cubiertas por los cebadores y/o las sondas de la prueba **cobas**® MTB pueden causar errores en la detección de la presencia de la bacteria.
- Debido a las diferencias específicas entre tecnologías, se recomienda a los usuarios que, antes de cambiar de una a otra, realicen estudios de correlación en el laboratorio para determinar las diferencias tecnológicas. No cabe esperar una concordancia de porcentaje del 100 % entre los resultados debido a las diferencias entre tecnologías indicadas anteriormente.
- Para utilizar tubos distintos a los recomendados en la Tabla 10, el usuario debe verificarlos antes de su implementación en el flujo de trabajo de la prueba **cobas**® MTB en el laboratorio. El empleo de otros tipos de tubos puede dañar los tubos y contaminar las superficies del sonicador. También pueden obtenerse resultados falsos negativos debido a una transferencia de energía de sonicación insuficiente.
- Para utilizar códigos de barras distintos a los recomendados en la Tabla 10, el usuario debe verificarlos antes de su implementación en el flujo de trabajo de la prueba **cobas**® MTB en el laboratorio. El empleo de otros tipos de códigos de barras puede dañar el código de barras.

# Evaluación del rendimiento

## Características clave de rendimiento de los sistemas cobas® 6800/8800

### Inactivación de la muestra

La reducción del riesgo de infección por MTB gracias al tratamiento de las muestras con MIS ha sido evaluado mediante cultivos altamente positivos de dos cepas del complejo MTB (MTB CDC268 y MTB H37) en tres centros distintos y con tres lotes de reactivo MIS distintos. Para cada condición, se trataron cinco alícuotas de cultivo con niveles de concentración de hasta  $5 \times 10^7$  UFC/ml con el reactivo MIS en una proporción de 1:2 durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a  $3.000 \times g$ , se lavaron dos veces con PBS estéril y finalmente se resuspendieron en 0,5 ml de PBS estéril. En dos de los centros se inoculó toda la muestra inactivada y se sometió a pruebas de crecimiento con el sistema de detección micobacteriana BACTEC™ MGIT™ 320 (Becton Dickinson). En el tercer centro se analizó la viabilidad de la bacteria MTB en un medio de Löwenstein-Jensen (LJ) sólido. Ninguna de las muestras inactivadas mostró crecimiento de las bacterias del complejo *M. tuberculosis* al final del periodo de incubación de 56 días.

### Límite de detección (LoD)

El límite de detección de la prueba cobas® MTB se determinó mediante el análisis de diluciones en serie de dos cepas del complejo MTB (*M. tuberculosis* CDC268 y *M. bovis* BCG, primer reactivo de referencia de la OMS para la vacuna BCG de la subcepa danesa 1331) cada una en dos matrices de pools clínicos negativos (esputo crudo y sedimentos de esputo/LBA). Se analizaron paneles de siete a nueve niveles de concentración más un blanco con un total de 72 réplicas por nivel de concentración utilizando tres lotes de reactivo de la prueba cobas® MTB, con múltiples series analíticas, días, operadores e instrumentos.

El LoD para *M. tuberculosis* osciló entre 7,6 UFC/ml (sedimento de esputo/LBA) y 8,8 UFC/ml (esputo crudo).

El LoD para *M. bovis* BCG osciló entre 0,9 UFC/ml (sedimento de esputo/LBA) y 1,0 UFC/ml (esputo crudo).

### Inclusividad

La inclusividad de la prueba cobas® MTB se confirmó para diez miembros del complejo MTB mediante el análisis de las 22 cepas siguientes:

- *M. tuberculosis* (H37 ATCC®-25177™, TB-TDR-0032, TB-TDR-0039, TB-TDR-0105, TB-TDR-0114, TB-TDR-0115, TB-TDR-0116, TB-TDR-0131, TB-TDR-0144, TB-TDR-0185, TB-TDR-0198, 80552)
- *M. bovis* BCG (subcepa Tokio 172 NIBSC 07/270 OMS, subcepa Moscú NIBSC 07/274 OMS)
- *M. africanum* (ATCC® 25420™)
- *M. bovis* subesp. *bovis* (ATCC® 19210™)
- *M. canetti* (NLA 000016778)
- *M. caprae* (ATCC® BAA-824™)
- *M. microti* (ATCC® 19422™)
- *M. orygis* (NLA 001300863)
- *M. pinnipedii* (ATCC® BAA-688™)
- *M. suricattae* (492, Stellenbosch University, Tygerberg, Sudáfrica)

Todas las cepas se detectaron a 28,2 UFC/ml en el tipo de muestra de sedimento. Para la cepa *M. suricattae* se analizó ADN genómico equivalente a 28,2 UFC/ml.

## Precisión

La precisión interna se examinó utilizando un panel formado por cultivos de *M. tuberculosis* (CDC268) y *M. bovis* BCG (primer reactivo de referencia de la OMS para la vacuna BCG de la subcepa danesa 1331) diluidos en dos matrices de pools clínicos negativos (esputo crudo y sedimentos de esputo/LBA). Las fuentes de variación se examinaron con un panel compuesto de tres niveles de concentración, utilizando tres lotes de reactivos para la prueba cobas® MTB y dos instrumentos durante un periodo de 12 días y con un total de 24 series. En la Tabla 16 figura una descripción de los paneles de precisión y de las tasas de positividad observadas. Todos los niveles de panel negativos resultaron negativos en todo el estudio. En el análisis de la desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación de los valores de Ct de los ensayos realizados con los miembros del panel positivos (consulte la Tabla 17) se obtuvo un CV (%) global comprendido entre el 1,2 % y el 2,6 % para *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG.

**Tabla 16** Resumen de la precisión intralaboratorio

Concentración de diana	N pruebas	N positivos	Tasa de positividad	Intervalo de confianza del 95 %	
				Límite inferior	Límite superior
<i>M. tuberculosis</i> — esputo crudo					
Negativa	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
8,8 UFC/ml	48	46	95,8 %	85,7 %	99,5 %
26,4 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
<i>M. tuberculosis</i> — sedimento					
Negativa	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
7,6 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
22,8 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
<i>M. bovis</i> BCG — esputo crudo					
Negativa	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
1,0 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
3,0 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
<i>M. bovis</i> BCG — sedimento					
Negativa	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
0,9 UFC/ml	48	45	93,8 %	82,8 %	98,7 %
2,7 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %

**Tabla 17** Media global, desviaciones estándar y coeficientes de variación (%) para el ciclo umbral, paneles de MTBC positivos

Concentración de diana	Tasa de positividad	Ct medio	Intraserias		Entre series		Entre días		Entre instrumentos		Entre lotes		Total	
			SD	% de CV	SD	% de CV	SD	% de CV	SD	% de CV	SD	% de CV	SD	% de CV
<i>M. tuberculosis</i> — esputo crudo														
8,8 UFC/ml	95,8 %	33,8	0,63	1,9	0,28	0,8	0,43	1,3	0,00	0,0	0,29	0,9	0,86	2,6
26,4 UFC/ml	100,0 %	32,4	0,54	1,7	0,07	0,2	0,00	0,0	0,30	0,9	0,00	0,0	0,62	1,9
<i>M. tuberculosis</i> — sedimento														
7,6 UFC/ml	100,0 %	34,9	0,35	1,0	0,09	0,3	0,14	0,4	0,19	0,5	0,00	0,0	0,43	1,2
22,8 UFC/ml	100,0 %	33,9	0,36	1,1	0,22	0,6	0,00	0,0	0,17	0,5	0,06	0,2	0,46	1,4
<i>M. bovis</i> BCG — esputo crudo														
1,0 UFC/ml	100,0 %	33,5	0,67	2,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,22	0,7	0,71	2,1
3,0 UFC/ml	100,0 %	32,4	0,40	1,2	0,30	0,9	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,50	1,5
<i>M. bovis</i> BCG — sedimento														
0,9 UFC/ml	93,8 %	35,1	0,45	1,3	0,00	0,0	0,17	0,5	0,00	0,0	0,17	0,5	0,51	1,5
2,7 UFC/ml	100,0 %	34,1	0,39	1,1	0,00	0,0	0,18	0,5	0,00	0,0	0,09	0,3	0,44	1,3

## Especificidad analítica/reactividad cruzada

Se analizó un panel de 178 bacterias, hongos y virus (incluidos los de mayor presencia en el tracto respiratorio) con la prueba cobas® MTB a fin de valorar su especificidad analítica. Se analizaron los organismos indicados en la Tabla 18 con concentraciones de aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades/ml para las bacterias y de aproximadamente  $1 \times 10^5$  unidades/ml para los virus. Se analizaron todos los posibles organismos interferentes en ausencia y presencia de la diana del complejo MTB (concentración de 200 UFC/ml). Ninguno de los organismos interfirió con el rendimiento de la prueba generando resultados falsos positivos. La detección de la diana del complejo MTB no se vio afectada por los organismos analizados. La posible reactividad cruzada de *Histoplasma capsulatum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium manteni* y *Mycobacterium timonense* se evaluó *in silico*. Los resultados de los análisis *in silico* predicen una probabilidad muy reducida de amplificación y detección de estos organismos cuando se utiliza la prueba cobas® MTB.

**Tabla 18** Microorganismos analizados para la especificidad analítica/reactividad cruzada

Microorganismo	Concentración	Microorganismo	Concentración
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium gastri</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium gordonae</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Actinomyces israelii</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium haemophilum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium holsaticum</i>	1,0E+06 UFC/ml
Adenovirus	1,0E+05 U/ml	<i>Mycobacterium indicus pranii</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium intermedium</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Bacillus cereus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium kansasii</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Bacillus subtilis</i> subesp. <i>subtilis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium kumamontonense</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Bactericides fragilis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Mycobacterium malmoense</i>	1,0E+06 UFC/ml

Microorganismo	Concentración	Microorganismo	Concentración
<i>Bordetella parapertussis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium marinum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Bordetella pertussis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium marseillense</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Burkholderia cepacia</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Campylobacter jejuni</i> subesp. <i>jejuni</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Candida albicans</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium nonchromogeicum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Candida glabrata</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Candida krusei</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Candida parapsilosis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium simiae</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Candida tropicalis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,0E+06 UFI/ml	<i>Mycobacterium szulgai</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	1,0E+06 UFI/ml	<i>Mycobacterium terrae</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Citrobacter freundii</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium triviale</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium vaccae</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium vulneris</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium xenopi</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium yongonense</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,0E+06 UCC/ml
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Neisseria lactamica</i>	1,0E+06 UFC/ml
Citomegalovirus	1,0E+05 UFI/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Eikenella corrodens</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Neisseria mucosa</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Neisseria sicca</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Enterobacter cloacae</i> subesp. <i>cloacae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Nocardia asteroides</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Enterococcus avium</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Nocardia brasiliensis</i>	1,0E+06 geq/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Enterococcus faecium</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Nocardia farcinica</i>	1,0E+06 UFC/ml
Enterovirus tipo 68/2007	1,0E+05 U/ml	<i>Nocardia nova</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Escherichia coli</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Escherichia coli</i> productora de CTX-M-15 ESBL	1,0E+06 UFC/ml	<i>Nocardia transvalensis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subesp. <i>nucleatum</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Pasteurella multocida</i> subesp. <i>tigris</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Gordona rubropertinctus</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1,0E+06 geq/ml
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Penicillium chermesinum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus del herpes simple tipo 1	1,0E+05 cp/ml	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus del herpes simple tipo 2	1,0E+05 cp/ml	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus de inmunodeficiencia humana	1,0E+05 cp/ml	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus de la gripe humana A	1,0E+05 U/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus de la gripe humana B	1,0E+05 U/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1,0E+06 UFC/ml
Metapneumovirus humano	1,0E+05 U/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus de la parainfluenza humana tipo 1	1,0E+05 U/ml	<i>Providencia stuartii</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus de la parainfluenza humana tipo 2	1,0E+05 U/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus de la parainfluenza humana tipo 3	1,0E+05 U/ml	<i>Rhizopus</i> spp.	1,0E+06 UFC/ml

Microorganismo	Concentración	Microorganismo	Concentración
Virus de la parainfluenza humana tipo 4	1,0E+05 U/ml	<i>Rhodococcus equi</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus sincitial respiratorio humano A	1,0E+05 U/ml	Virus del sarampión	1,0E+05 U/ml
Virus sincitial respiratorio humano B	1,0E+05 U/ml	Virus de la rubeola	1,0E+05 U/ml
Rinovirus humano 16	1,0E+05 U/ml	Rubulavirus	1,0E+05 U/ml
<i>Kingella kingae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovar Dublín	1,0E+06 UFC/ml
<i>Kingella oralis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Scedosporium</i> spp.	1,0E+06 UFC/ml
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Serratia marcescens</i> subesp. <i>marcescens</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de KPC-3 carbapenemase	1,0E+06 UFC/ml	<i>Shigella flexneri</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subesp. <i>pneumoniae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Shigella sonnei</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Staphylococcus aureus</i> subesp. <i>aureus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Lactobacillus casei</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Staphylococcus capitis</i> subesp. <i>capitis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Legionella micdadei</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Legionella pneumophila</i> subesp. <i>pneumophila</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Staphylococcus hominis</i> subesp. <i>hominis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Morganella morganii</i> subesp. <i>morganii</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus constellatus</i> subesp. <i>constellatus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium arosiense</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus equi</i> subesp. <i>equi</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Streptococcus mitis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subesp. <i>avium</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus mutans</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subesp. <i>hominissuis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subesp. <i>silvaticum</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subesp. <i>paratuberculosis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium bouchedorhonense</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus salivarius</i> subesp. <i>salivarius</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium celatum</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus uberis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium chimaera</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptomyces anulatus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium chubuense</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptomyces griseus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium colombiense</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Tsukamurella</i> spp.	1,0E+06 geq/ml
<i>Mycobacterium confluens</i>	1,0E+06 UFC/ml	Virus de la varicela zóster	1,0E+05 cp/ml
<i>Mycobacterium flavescens</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Veillonella atypica</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Veillonella parvula</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium fuerth</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Weissella paramesenteroides</i>	1,0E+06 UFC/ml

## Interferencia

Se evaluó el efecto de sustancias exógenas potencialmente secretadas en las muestras respiratorias (Tabla 19). Cada sustancia potencialmente interferente se analizó a niveles iguales o superiores a los clínicamente relevantes en muestras de esputo artificiales en ausencia y en presencia de la diana del complejo MTB (añadido a 200 UFC/ml).

Ninguna de las sustancias interfirió con el rendimiento de la prueba generando resultados falsos negativos o falsos positivos.

09348468001-02ES

**Tabla 19** Lista de sustancias exógenas analizadas para determinar la interferencia

Sustancia	Concentración	Sustancia	Concentración
Sulfato de albuterol	0,5 µg/ml	Monosulfato de kanamicina	240 µg/ml
Amikacina	80,1 µg/ml	Levofloxacin	5 mg/ml
Amoxicilina	86,4 µg/ml	Lidocaína HCl	1,2 % (p/v)
Beclometasona	3.459 pg/ml	Mentol	0,50 % (p/v)
Benzocaína	1,2 % (p/v)	Salicilato de metilo	0,06 % (v/v)
Budesónida	3 mg/ml	Mometasona	100 µg/ml
Extracto de petasita	225 mg/ml	Moxifloxacin	15 µg/ml
Capreomicina	80 µg/ml	Mupirocina	5 % (p/v)
Cloruro de cetilpiridinio	0,5 % (p/v)	NaCl	5 % (p/v)
Gluconato de clorhexidina	1 % (v/v)	Nicotina	1 µg/ml
Cicloserina	105 µg/ml	Nistatina	1 % (v/v)
Claritromicina	20 µg/ml	Oximetazolina	12 ng/ml
Dexametasona	601 ng/ml	Pentamidina	1.366 ng/ml
Hidrocloruro de efedrina	1 mg/ml	Fenilefrina	5 mg/ml
Epinefrina	100 pg/ml	Prednisolona	3 µg/ml
Etambutol	50 µg/ml	Pirazinamida	240 µg/ml
Etionamida	15 µg/ml	Rifampicina	25 µg/ml
Eucalipto	0,002 % (v/v)	Extracto de ortiga (500 mg)	5 mg/ml
Fluticasona	400 µg/ml	Estreptomina	240 µg/ml
Propionato de fluticasona	5 µg/ml	Azufre	0,01 % (p/v)
Formoterol fumarato	66 µg/ml	Aceite de árbol de té	0,50 % (v/v)
Raíz de sello de oro (cápsulas de 570 mg)	5,7 mg/ml	Teofilina	20 µg/ml
Guaifenesina	5 mg/ml	Tobramicina	24,1 µg/ml
Isoniazida	50 µg/ml	Zanamivir	10 mg/ml

Se analizaron sustancias endógenas que podrían estar presentes en muestras respiratorias a fin de determinar su interferencia (Tabla 20). Cada sustancia potencialmente interferente se analizó a niveles iguales o superiores a los clínicamente relevantes en muestras de esputo artificiales en ausencia y en presencia de la diana del complejo MTB (añadido a 200 UFC/ml).

Ninguna de las sustancias interfirió con el rendimiento de la prueba generando resultados falsos negativos o falsos positivos.

**Tabla 20** Lista de sustancias endógenas analizadas para determinar su interferencia

Sustancia	Concentración	Sustancia	Concentración
Jugo gástrico	10 % (v/v)	Mucina	5 %
Hemoglobina	2 g/l	Pus	5 %
Sangre total humana	5 % (v/v)	Saliva	10 % (v/v)
ADN humano	4 mg/l	-	-

## Fallo de todo el sistema

Las muestras analizadas en el estudio de fallo de todo el sistema fueron muestras de esputo y de sedimento de esputo artificiales a las que se añadió diana del complejo MTB a una concentración de aproximadamente  $3 \times \text{LoD}$  de la prueba cobas® MTB en la matriz respectiva. Los resultados demostraron que todas las réplicas fueron válidas y positivas para el complejo MTB, lo que representa una tasa de fallo de todo el sistema del 0 % con un intervalo de confianza unilateral superior del 95 % de 3,0 %.

## Contaminación por arrastre

Se realizaron diversos estudios para evaluar la posible contaminación por arrastre en los sistemas cobas® 6800/8800 que utilizan la prueba cobas® MTB. La contaminación por arrastre puede causar resultados falsos positivos. El estudio de rendimiento ha determinado que la contaminación por arrastre entre muestras de la prueba cobas® MTB es del 0,0 % (0/240) para el complejo MTB tras realizar varias series para analizar tanto muestras positivas muy altas como muestras negativas. Las pruebas se realizaron utilizando muestras de sedimento de esputo artificial a las que se añadió diana del complejo MTB a una concentración de  $2 \times 10^6$  UFC/ml, una concentración de muestra que genera valores de Ct antes que en el 95 % de las muestras de pacientes infectados en la población objetivo.

## Rendimiento con muestras clínicas

El rendimiento de la prueba cobas® MTB utilizando muestras clínicas se evaluó mediante el análisis de muestras retrospectivas y archivadas (esputo crudo, sedimentos de esputo/LBA) procedentes de sujetos de 18 años de edad como mínimo con presunta TB obtenidas en Alemania, Sudáfrica, Suiza, Uganda y Ucrania. Se realizaron unas pruebas de comparación en paralelo con el ensayo Abbott RealTime MTB. La sensibilidad y especificidad se establecieron en comparación con el estado del cultivo micobacteriano y del frotis de BAAR.

Los resultados se muestran en la Tabla 21. Todos los resultados positivos según la prueba cobas® MTB para muestras negativas del cultivo se confirmaron que eran eventos de amplificación/detección específicos mediante el análisis del amplicón posterior a la PCR.

**Tabla 21** Sensibilidad y especificidad de la prueba **cobas®** MTB utilizando muestras clínicas

			Roche <b>cobas®</b> MTB	Abbott <b>RealTime</b> MTB
<b>Sensibilidad</b>	<b>Esputo crudo</b>	<b>C+/F-</b>	116/134 <b>86,6 %</b> [79,6-91,8 %]	111/134 <b>82,8 %</b> [75,4-88,8 %]
		<b>C+/F+</b>	275/278 <b>98,9 %</b> [96,9-99,7 %]	274/278 <b>98,5 %</b> [96,3-99,6 %]
		<b>C+/F±</b>	391/412 <b>94,9 %</b> [92,3-96,8 %]	385/412 <b>93,4 %</b> [90,6-95,6 %]
<b>Sensibilidad</b>	<b>Sedimento</b>	<b>C+/F-</b>	116/148 <b>78,4 %</b> [70,9-84,7 %]	121/148 <b>81,8 %</b> [74,6-87,6 %]
		<b>C+/F+</b>	287/289 <b>99,3 %</b> [97,5-99,9 %]	284/289 <b>98,2 %</b> [96,0-99,4 %]
		<b>C+/F±</b>	403/437 <b>92,2 %</b> [89,3-94,5 %]	405/437 <b>92,6 %</b> [89,8-94,9 %]
<b>Especificidad</b>	<b>Esputo crudo</b>	<b>C-/F-</b>	326/332 <b>98,2 %</b> [96,1-99,3 %]	N/A
<b>Especificidad</b>	<b>Sedimento</b>	<b>C-/F-</b>	381/393 <b>96,9 %</b> [94,7-98,4 %]	N/A
<b>Valor predictivo positivo</b>	<b>Esputo crudo</b>	<b>P+</b>	391/397 <b>98,5 %</b> [96,7-99,4 %]	N/A
<b>Valor predictivo positivo</b>	<b>Sedimento</b>	<b>P+</b>	403/415 <b>97,1 %</b> [95,0-98,5 %]	N/A
<b>Valor predictivo negativo</b>	<b>Esputo crudo</b>	<b>P-</b>	326/347 <b>93,9 %</b> [90,9-96,2 %]	N/A
<b>Valor predictivo negativo</b>	<b>Sedimento</b>	<b>P-</b>	381/415 <b>91,8 %</b> [88,7-94,3 %]	N/A

C = cultivo, F = frotis de BAAR, P = prueba PCR

Se analizó un subconjunto de muestras en una evaluación externa realizada en Clinical Laboratory Services (CLS), en Sudáfrica. Para cada sujeto se obtuvieron muestras de esputo crudo en dos visitas. Una muestra de esputo crudo se analizó con las pruebas **cobas®** MTB, Abbott RealTime MTB y GeneXpert® MTB/RIF. La otra muestra de esputo crudo se transformó en un sedimento mediante el método de NALC-NaOH y se analizó con las pruebas **cobas®** MTB, Abbott RealTime MTB, GeneXpert® MTB/RIF y COBAS® TaqMan® MTB. La sensibilidad y especificidad se establecieron en comparación con el estado del cultivo y del frotis de BAAR.

Los resultados se muestran en la Tabla 22.

**Tabla 22** Sensibilidad y especificidad de la prueba **cobas®** MTB utilizando muestras clínicas obtenidas en Sudáfrica

			Roche <b>cobas®</b> MTB	Abbott <b>RealTime</b> MTB	Cepheid <b>Xpert</b> MTB/RIF	Roche <b>COBAS®</b> TaqMan® MTB
<b>Sensibilidad</b>	<b>Espuito crudo</b>	<b>C+/F-</b>	18/22 <b>81,8 %</b> [59,7-94,8 %]	16/22 <b>72,7 %</b> [49,8-89,3 %]	16/22 <b>72,7 %</b> [49,8-89,3 %]	N/A
		<b>C+/F+</b>	72/73 <b>98,6 %</b> [92,6-100 %]	72/73 <b>98,6 %</b> [92,6-100 %]	71/73 <b>97,3 %</b> [90,5-99,7 %]	N/A
		<b>C+/F±</b>	90/95 <b>94,7 %</b> [88,1-98,3 %]	88/95 <b>92,6 %</b> [85,4-97,0 %]	87/95 <b>91,6 %</b> [84,1-96,3 %]	N/A
<b>Sensibilidad</b>	<b>Sedimento</b>	<b>C+/F-</b>	17/22 <b>77,3 %</b> [54,6-92,2 %]	17/22 <b>77,3 %</b> [54,6-92,2 %]	17/22 <b>77,3 %</b> [54,6-92,2 %]	13/22 <b>59,1 %</b> [36,4-79,3 %]
		<b>C+/F+</b>	73/73 <b>100 %</b> [95,1-100 %]	71/73 <b>97,3 %</b> [90,5-99,7 %]	73/73 <b>100 %</b> [95,1-100 %]	73/73 <b>100 %</b> [95,1-100 %]
		<b>C+/F±</b>	90/95 <b>94,7 %</b> [88,1-98,3 %]	88/95 <b>92,6 %</b> [85,4-97,0 %]	90/95 <b>94,7 %</b> [88,1-98,3 %]	86/95 <b>90,5 %</b> [82,8-95,6 %]
<b>Especificidad</b>	<b>Espuito crudo</b>	<b>C-/F-</b>	193/199 <b>97,0 %</b> [93,6-98,9 %]	192/199 <b>96,5 %</b> [92,9-98,6 %]	194/199 <b>97,5 %</b> [94,2-99,2 %]	N/A
<b>Especificidad</b>	<b>Sedimento</b>	<b>C-/F-</b>	190/199 <b>95,5 %</b> [91,6-97,9 %]	189/199 <b>95,0 %</b> [91,0-97,6 %]	196/199 <b>98,5 %</b> [95,7-99,7 %]	193/196 <b>98,5 %</b> [95,6-99,7 %]
<b>Valor predictivo positivo</b>	<b>Espuito crudo</b>	<b>C+/F±</b>	90/96 <b>93,8 %</b> [86,9-97,7 %]	88/95 <b>92,6 %</b> [85,4-97,0 %]	87/92 <b>94,6 %</b> [87,8-98,2 %]	N/A
<b>Valor predictivo positivo</b>	<b>Sedimento</b>	<b>C+/F±</b>	90/99 <b>90,9 %</b> [83,4-95,8 %]	88/98 <b>89,8 %</b> [85,4-97,0 %]	90/93 <b>96,8 %</b> [90,9-99,3 %]	86/89 <b>96,6 %</b> [90,5-99,3 %]
<b>Valor predictivo negativo</b>	<b>Espuito crudo</b>	<b>C-/F±</b>	193/198 <b>97,5 %</b> [94,2-99,2 %]	192/199 <b>96,5 %</b> [92,9-98,6 %]	194/202 <b>96,0 %</b> [92,3-98,3 %]	N/A
<b>Valor predictivo negativo</b>	<b>Sedimento</b>	<b>C-/F±</b>	190/195 <b>97,4 %</b> [94,1-99,2 %]	189/196 <b>96,4 %</b> [92,8-98,6 %]	196/201 <b>97,5 %</b> [94,3-99,2 %]	193/202 <b>95,5 %</b> [91,7-97,9 %]

## Equivalencia entre sistemas/Comparación de sistemas

La equivalencia entre los sistemas **cobas®** 5800, **cobas®** 6800 y los **cobas®** 8800 se demostró a partir de estudios de rendimiento. Los resultados incluidos en las Instrucciones de uso hacen patente la equivalencia de rendimiento entre todos los sistemas.

---

## Información adicional

### Características principales del ensayo

**Tipos de muestras**

- Esputo crudo
- Sedimentos de esputo y LBA tratados con NALC-NaOH





















































**Cantidad de muestra procesada**

- $\geq 0,4$  ml de muestra de paciente tratada con MIS en una concentración de 1:2 (volumen total  $\geq 1,2$  ml) requerida en un tubo de muestra para esputo crudo; el instrumento procesa 0,85 ml
- $\geq 0,2$  ml de muestra de paciente tratada con MIS en una concentración de 1:5 (volumen total  $\geq 1,2$  ml) requerida en un tubo de muestra para esputo/sedimento de LBA; el instrumento procesa 0,85 ml

## Símbolos

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

**Tabla 23** Símbolos utilizados en las etiquetas de los productos de PCR para diagnóstico de Roche

 Edad o fecha de nacimiento	 Dispositivo no apto para análisis en el lugar de asistencia al paciente	 UI de QS por reacción de PCR, utilice las unidades internacionales (UI) de QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.
 Software auxiliar	 Dispositivo no apto para autoexamen	 Número de serie
 Intervalo asignado (copias/ml)	 Distribuidor (Nota: el país o la región se indicará debajo de este símbolo.)	 Centro
 Intervalo asignado (UI/ml)	 No deben reutilizarse	 Procedimiento estándar
 Representante autorizado en la Comunidad Europea	 Mujeres	 Esterilizado con óxido de etileno
 Hoja de datos del código de barras	 Para evaluación del rendimiento IVD únicamente	 Almacenar en la oscuridad
 Código de lote	 Número mundial de artículo comercial	 Límite de temperatura
 Riesgo biológico	 Importador	 Archivo de definición de pruebas
 Número de catálogo	 Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Este lado hacia arriba
 Marcado CE de conformidad; este dispositivo cumple con los requisitos aplicables para el marcado CE de un dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> .	 Límite inferior del intervalo asignado	 Procedimiento ultrasensible
 Fecha de recogida	 Hombres	 Identificación exclusiva del dispositivo
 Consulte las instrucciones de uso	 Fabricante	 Límite superior del intervalo asignado
 Suficiente para <n> pruebas	 Control negativo	 Línea de llenado de orina
 Contenido del kit	 Sin esterilizar	 Solamente para EE. UU.: la ley federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo autorizado o bajo prescripción médica.
 Control	 Nombre del paciente	 Fecha de caducidad
 Fecha de fabricación	 Número del paciente	
 Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente	 Abrir aquí	
 Dispositivo para autoexamen	 Control positivo	
	 Copias QS por reacción de PCR, utilice copias QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.	

## Asistencia técnica

Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con su afiliada local:  
[https://www.roche.com/about/business/roche\\_worldwide.htm](https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm)

## Fabricante

**Tabla 24** Fabricante



Fabricado en los Estados Unidos

Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, Germany  
[www.roche.com](http://www.roche.com)

Fabricado en los EE. UU.

## Marcas registradas y patentes

Consulte <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

## Derechos de autor

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



## Bibliografía

1. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Sitthidet Tharinjaroen C, Intorasoot S, Anukool U, et al. Novel targeting of the lepB gene using PCR with confronting two-pair primers for simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium bovis*. *J Med Microbiol*. 2016;65:36-43.
3. Rajbhandari, R.M., de la Fuente, J., Karmacharya, D. et al. Understanding *Mycobacterium tuberculosis* complex in elephants through a One Health approach: a systematic review. *BMC Vet Res* 18, 262 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03356-8>.
4. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1296-9.
5. Novosad SA, Winthrop KL. Beyond tumor necrosis factor inhibition: the expanding pipeline of biologic therapies for inflammatory diseases and their associated infectious sequelae. *Clin Infect Dis*. 2014;58:1587-98.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *MMWR Recomm Rep*. 2000;49:1-51.
7. Centers for Disease Control Prevention. Recommendations for use of an isoniazid-rifapentine regimen with direct observation to treat latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011;60:1650-3.
8. Orenstein EW, Basu S, Shah NS, et al. Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:153-61.
9. 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.
10. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7.
11. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94.
12. Chosewood LC, Wilson DE, eds. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. US Department of Health and Human Services; 2009.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections*. 4th ed. M29-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA; 2014.
14. World Health Organization. *Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual*. WHO: Geneva, Switzerland; 2012.
15. Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*. Centers for Disease Control: Atlanta, GA; 1985.

## Revisión del documento

Información de revisión del documento	
Doc Rev. 2.0 05/2024	<p>Se han actualizado las guías de bioseguridad para adaptarlas a las regulaciones locales, correcciones gramaticales y referencias/datos de la OMS.</p> <p>Se ha movido el texto “de 18 años de edad como mínimo” del apartado <b>Limitaciones del procedimiento</b> al apartado <b>Rendimiento con muestras clínicas</b>.</p> <p>Se ha actualizado la marca <b>cobas®</b>.</p> <p>Se ha actualizado la frase sobre la autoridad competente.</p> <p>Se ha eliminado el símbolo “Rx Only” en la primera página.</p> <p>Se ha actualizado la página de símbolos armonizados.</p> <p>Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.</p>

Puede consultar el resumen del informe de seguridad y rendimiento en el siguiente enlace:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>