

cobas[®] MAI

Prueba de ácidos nucleicos para uso en los sistemas cobas[®] 5800/6800/8800

Para diagnóstico *in vitro*

cobas[®] MAI

P/N: 09040595190

Para uso en el sistema cobas[®] 5800

cobas[®] MAI Positive Control Kit

P/N: 09040609190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 09051953190

Para uso en sistemas cobas[®] 6800/8800

cobas[®] MAI Positive Control Kit

P/N: 07544863190 o
P/N: 09040609190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 07002238190 o
P/N: 09051953190

Tabla de contenido

Uso previsto	4
Resumen y explicación de la prueba.....	4
Reactivos y materiales.....	8
Reactivos y controles de cobas® MAI.....	8
Reactivos cobas® omni para la preparación de muestras.....	10
Requisitos de almacenamiento y manipulación.....	11
Requisitos para la manipulación de reactivos en el sistema cobas® 5800	11
Requisitos para la manipulación de reactivos en los sistemas cobas® 6800/8800	12
Material adicional necesario para el sistema cobas® 5800.....	12
Material adicional necesario para los sistemas cobas® 6800/8800	13
Instrumentos y software necesarios.....	14
Precauciones y requisitos de manipulación	15
Advertencias y precauciones.....	15
Manipulación de reactivos	16
Buenas prácticas de laboratorio.....	16
Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras.....	17
Muestras	17
Transporte y almacenamiento de las muestras	17
Almacenamiento de muestras inactivadas.....	17
Instrucciones de uso	18
Notas sobre el procedimiento.....	18
Procesamiento de muestras de esputo crudo	21
Procesamiento de sedimentos de esputo y de LBA.....	21
Sonicación de las muestras.....	22
Ejecución de la prueba cobas® MAI en el sistema cobas® 5800.....	23
Ejecución de la prueba cobas® MAI en los sistemas cobas® 6800/8800	25

Resultados	26
Control de calidad y validez de los resultados en el sistema cobas ® 5800.....	26
Resultados del control en el sistema cobas ® 5800.....	26
Control de calidad y validez de los resultados en los sistemas cobas ® 6800/8800	26
Interpretación de los resultados	27
Interpretación de los resultados en el sistema cobas ® 5800.....	28
Interpretación de los resultados en los sistemas cobas ® 6800/8800	28
Limitaciones del procedimiento.....	29
Evaluación del rendimiento	31
Características clave de rendimiento de los sistemas cobas ® 6800/8800.....	31
Inactivación de la muestra.....	31
Límite de detección (LoD).....	31
Inclusividad	31
Precisión.....	32
Especificidad analítica/reactividad cruzada	34
Interferencia	36
Fallo de todo el sistema	37
Contaminación por arrastre.....	38
Rendimiento con muestras clínicas.....	38
Equivalencia entre sistemas/Comparación de sistemas	40
Información adicional	41
Características principales del ensayo	41
Símbolos	42
Asistencia técnica	43
Fabricante.....	43
Marcas registradas y patentes	43
Derechos de autor	43
Bibliografía	44
Revisión del documento.....	45

Uso previsto

cobas® MAI 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 y la diferenciación de ADN de *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare* 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 se ha diseñado como complemento del cultivo micobacteriano en el diagnóstico de las infecciones pulmonares por *M. avium* y *M. intracellulare*.

Resumen y explicación de la prueba

Información de referencia

M. avium y *M. intracellulare* son dos especies distintas estrechamente relacionadas entre sí de micobacterias no tuberculosas (NTM) de crecimiento lento que forman parte del complejo *M. avium* (MAC) y el género *Mycobacterium*. Las NTM son especies micobacterianas distintas de *M. tuberculosis* y *M. leprae*. Por lo general, las NTM son organismos vivos libres ubicuos en el entorno.¹⁻⁴ Se encuentran en las aguas superficiales, el agua del grifo, la tierra, los animales domésticos y salvajes, la leche y los productos alimenticios. Si bien las NTM pueden colonizar superficies corporales y secreciones sin causar enfermedades, se han asociado con cuatro síndromes clínicos distintos: infecciones pulmonares (MAC, *M. kansasii* y *M. abscessus*), infecciones linfonodales, observadas comúnmente en poblaciones pediátricas, (MAC, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*), enfermedad diseminada en pacientes gravemente inmunodeprimidos (*M. avium*) e infección cutánea y de tejidos blandos o de huesos y articulaciones derivada por lo general de la inoculación directa.⁵

Actualmente el MAC incluye doce especies de micobacterias de crecimiento lento asociadas al entorno o de origen animal: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. arosiense*, *M. bouchedurhonense*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. indicus pranii*, *M. mantanii*, *M. vulneris*, *M. yongonense*.^{6,7} Existen 28 serotipos de *M. avium* y *M. intracellulare*⁸ y *M. avium* consta de 4 subespecies: *M. avium* subesp. *avium*, *M. avium* subesp. *paratuberculosis*, *M. avium* subesp. *hominissuis* y *M. avium* subesp. *silvaticum*.⁶ *M. avium* y *M. intracellulare* (MAI) son los dos miembros del MAC más comúnmente asociados a enfermedades humanas.⁵

MAI son fundamentalmente patógenos pulmonares que suelen afectar a personas inmunodeprimidas (p. ej., pacientes con SIDA, leucemia de células pilosas o que reciben quimioterapia inmunosupresora). MAI se transmiten al tracto respiratorio mediante la inhalación y al tracto gastrointestinal mediante la ingestión. No hay pruebas de que pueda transmitirse de animales a humanos o entre humanos, por lo que no se considera contagiosa. Las infecciones pulmonares causadas por MAI se asocian a enfermedades pulmonares crónicas como la EPOC, la bronquitis crónica, la bronquiectasia, la fibrosis quística y el cáncer de pulmón. MAI también puede provocar osteomielitis, tenosinovitis y sinovitis, y la infección por MAI diseminada puede afectar a los ganglios linfáticos, al SNC, al hígado, al bazo y a la médula ósea. Las infecciones cutáneas suelen producirse por inoculación directa. MAI es la causa más común de infección por NTM en pacientes con SIDA. Más del 95 % de los casos de pacientes con SIDA que han desarrollado infecciones por MAI están causados por la especie *M. avium*. La especie *M. intracellulare* es la responsable del 40 % de las infecciones en inmunocompetentes. La enfermedad pulmonar por MAI suele mostrar dos tipos de presentación clínica y radiológica, como una enfermedad pulmonar fibrocavitaria apical, como bronquiectasia con múltiples nódulos o como el síndrome de Lady Windermere asociado a infiltrados pulmonares nodulares o fibronodulares y tos en mujeres de edad avanzada, delgadas y que por lo demás están sanas.

Es difícil determinar la incidencia de la enfermedad por NTM, dado que las NTM se consideran no contagiosas y, por lo tanto, en muchos países los casos no se comunican a los organismos de salud pública. Las estimaciones de la tasa de incidencia se basan en el número de aislados de NTM comunicados y parecen similares en la mayoría de los países desarrollados, con oscilaciones de entre 1,0 y 1,8 casos por cada 100.000 personas.^{5,9} En un estudio realizado en Oregón en 2009, se calculó una tasa anualizada estimada de 5,6 casos de infección pulmonar por MAC por cada 100.000 habitantes, de los cuales la mayoría (60 %) afectaban a mujeres.¹⁰ El mayor número de casos de MAI comunicados en los Estados Unidos fue de 37.000 y se produjo en 1994, durante el momento más crítico de la epidemia de SIDA, si bien la incidencia ha disminuido desde la adopción de la terapia antirretroviral de gran actividad. Un estudio de vigilancia calculó la incidencia estimada de las infecciones pulmonares por NTM en pacientes sin infección por VIH en 0,72-0,74 por cada 100.000 habitantes en Francia en el periodo comprendido entre 2001 y 2003.¹¹ En 2004, un estudio similar realizado en Nueva Zelanda estimó la incidencia de la enfermedad por NTM en 1,92 en poblaciones de 100.000 habitantes.¹²

Se debe valorar la opción de diagnosticar una infección pulmonar por MAI en pacientes sintomáticos que presenten opacidades nodulares o cavitarias en radiografía de tórax o en una tomografía computarizada de alta resolución que muestre bronquiectasia con múltiples nódulos pequeños una vez excluida la infección por MTB y otros diagnósticos pertinentes.⁵ Se recomienda efectuar un cultivo y un frotis de BAAR para precisar el diagnóstico. Requisitos para el diagnóstico:

- (i) cultivos micobacterianos positivos de como mínimo dos muestras de esputo expectoradas individuales, o
- (ii) resultados de cultivos micobacterianos positivos de como mínimo un lavado o enjuagado bronquial, o
- (iii) biopsia transbronquial o pulmonar de cualquier otro tipo con características histopatológicas micobacterianas y un cultivo positivo de la biopsia, y uno o más esputos o lavados bronquiales con cultivo positivo para MAC confirman la infección.⁵

Deben identificarse las especies de NTM, incluido el MAC. El tratamiento incluye 2 o 3 antimicrobianos de primera línea durante 12 meses. La terapia de primera línea incluye macrólidos (claritromicina o azitromicina), etambutol y rifamicinas (rigampina), mientras que la terapia antimicrobiana de segunda línea se compone de aminoglucósidos (estreptomina o amikacina). Se recomienda realizar pruebas de susceptibilidad rutinarias de los aislados de MAC únicamente para la claritromicina debido a la baja correlación entre los resultados clínicos e *in vitro* para otros fármacos.⁵

El diagnóstico presuntivo de la infección por MAC puede establecerse a partir tanto de la presentación clínica como de los hallazgos radiográficos y puede confirmarse mediante la recuperación del organismo en un cultivo micobacteriano tal como se ha descrito anteriormente⁵, aunque cabe destacar que la realización del cultivo es lenta y puede prolongarse durante días o semanas. Otra opción consiste en realizar pruebas de amplificación de ácidos nucleicos para detectar y diferenciar las especies *M. avium* y *M. intracellulare* directamente a partir de muestras clínicas en cuestión de horas con el objetivo de obtener un diagnóstico e iniciar la terapia empírica con mayor rapidez. No obstante, para confirmar la eficacia del tratamiento empírico es necesario realizar pruebas fenotípicas de farmacosenibilidad, que pueden tardar entre días y semanas tras el aislamiento y la identificación de los patógenos según el método empleado.

Explicación de la prueba

La prueba cobas® MAI para uso en los sistemas cobas® 5800/6800/8800 es una prueba cualitativa automatizada de PCR a tiempo real diseñada para detectar y diferenciar ADN de *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare* 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, se introduce en cada muestra durante el procesamiento en los sistemas cobas® 5800/6800/8800. Además, la prueba utiliza un control positivo de título bajo y un control negativo.

Principios del procedimiento

La prueba cobas® MAI 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 (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 un cebador que va en un sentido y en sentido contrario específico para la diana del complejo *M. avium* que se selecciona de una región altamente conservada dentro del respectivo organismo diana. El MAC se detecta mediante un conjunto selectivo de cebadores y *M. avium* y *M. intracellulare* se diferencian mediante dos sondas distintas dentro de la región de amplificación (gen ARNr 16S). La amplificación selectiva del 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 la región diana del complejo *M. avium*. 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.¹³ 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® MAI contiene una sonda de detección para *M. avium* y otra para *M. intracellulare*, además de una tercera sonda para el DNA-IC. Las sondas específicas para la diana están marcadas con marcadores emisores fluorescentes para permitir la detección simultánea de fragmentos diana de *M. avium*, *M. intracellulare* y DNA-IC en tres canales diana distintos.^{14,15} 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 consiguen mediante la cuantificación de la fluorescencia liberada por los marcadores emisores para las dianas del complejo *M. avium* y del DNA-IC, respectivamente.

Reactivos y materiales

Reactivos y controles de cobas® MAI

Los materiales suministrados para el ensayo cobas® MAI 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.

Tabla 1 cobas® MAI

cobas® MAI

Almacenar a 2-8 °C

Casete para 384 pruebas (P/N 09040595190)

Componentes del kit	Composición del reactivo	Cantidad por kit
Solución de proteinasa (PASE)	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
Control interno de ADN (DNA-IC)	Buffer Tris, < 0,05 % de EDTA, < 0,001 % de constructo de ADN diferente de MAI, 0,002 % de ARN Poli rA (sintético), < 0,1 % de azida sódica	38 ml
Buffer de elución (EB)	Buffer Tris, 0,2 % de metil-4-hidroxibenzoato	38 ml
Reactivo 1 de Master Mix (MMX-R1)	Acetato de manganeso, hidróxido potásico, < 0,1 % de azida sódica	14,5 ml
Reactivo 2 de Master Mix para MAI (MAI MMX-R2)	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 MAI, < 0,01 % de sondas oligonucleótidas marcadas con fluorescente específicas para MAI y el control interno de ADN, < 0,01 % de aptámero oligonucleótido	17,5 ml

Tabla 2 cobas® MAI Positive Control Kit

cobas® MAI Positive Control Kit

Almacenar a 2-8 °C

Para uso en el sistema cobas® 5800 (P/N 09040609190)

Para uso en sistemas cobas® 6800/8800 (P/N: 07544863190 o P/N 09040609190)

Componentes del kit	Composición del reactivo	Cantidad por kit
Control positivo para MAI (MAI (+) C)	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 secuencias genómicas de <i>M. avium</i> y <i>M. intracellulare</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
Control negativo para el buffer de cobas® (BUF (-) C)	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**
cobas® omni MGP Reagent (MGP) Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997546190)	Partículas de vidrio magnéticas, buffer Tris, 0,1 % de metil-4 hidroxibenzoato, < 0,1 % de azida sódica	480 pruebas	No aplicable
cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997511190)	Buffer Tris, 0,1 % de metil-4 hidroxibenzoato, < 0,1 % de azida sódica	4 × 875 ml	No aplicable
cobas® omni Lysis Reagent (LYS) Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997538190)	43 % (p/p) de tiocianato de guanidina***, 5 % (p/v) de polidocanol***, 2 % (p/v) de ditiotreititol***, citrato de sodio dihidratado	4 × 875 ml	 <p>PELIGRO</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>
cobas® omni Wash Reagent (WASH) Almacenar a 15-30 °C (P/N: 06997503190)	Citrato de sodio dihidratado, 0,1 % de metil-4 hidroxibenzoato	4,2 l	No aplicable

* Estos reactivos no están incluidos en el kit cobas® MAI. 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 y manipulación

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® MAI	2-8 °C
cobas® MAI 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® MAI	No caducado	90 días desde el primer uso	Máx. 40 series	Máx. 36 días ^b
cobas® MAI Positive Control Kit	No caducado	No aplicable ^a	No aplicable	Máx. 36 días ^b
cobas® Buffer Negative Control Kit	No caducado	No aplicable ^a	No aplicable	Máx. 36 días ^b
cobas® omni Lysis Reagent	No caducado	30 días desde la carga ^b	No aplicable	No aplicable
cobas® omni MGP Reagent	No caducado	30 días desde la carga ^b	No aplicable	No aplicable
cobas® omni Specimen Diluent	No caducado	30 días desde la carga ^b	No aplicable	No aplicable
cobas® omni Wash Reagent	No caducado	30 días desde la carga ^b	No aplicable	No aplicable

^a Reactivos de un solo uso.

^b 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® MAI	No caducado	90 días desde el primer uso	Máx. 40 series	Máx. 40 horas
cobas® MAI Positive Control Kit	No caducado	No aplicable ^a	No aplicable	Máx. 10 horas
cobas® Buffer Negative Control Kit	No caducado	No aplicable ^a	No aplicable	Máx. 10 horas
cobas® omni Lysis Reagent	No caducado	30 días desde la carga ^b	No aplicable	No aplicable
cobas® omni MGP Reagent	No caducado	30 días desde la carga ^b	No aplicable	No aplicable
cobas® omni Specimen Diluent	No caducado	30 días desde la carga ^b	No aplicable	No aplicable
cobas® omni Wash Reagent	No caducado	30 días desde la carga ^b	No aplicable	No aplicable

^a Reactivos de un solo uso.

^b 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
cobas® omni Processing Plate	05534917001
cobas® omni Amplification Plate	05534941001
cobas® omni Pipette Tips	05534925001
cobas® omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas® omni Lysis Reagent	06997538190
cobas® omni MGP Reagent	06997546190
cobas® omni Specimen Diluent	06997511190
cobas® omni Wash Reagent	06997503190
Bolsa para residuos sólidos y recipiente de residuos sólidos o	07435967001 y 07094361001 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
cobas® 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 TR 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® MAI 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. Antes de utilizar etiquetas de códigos de barras distintas a las recomendadas, es necesario que el usuario compruebe si son compatibles con el flujo de trabajo cobas® MAI del 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**® MAI 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**® MAI para uso en el sistema **cobas**® 6800/8800 en los instrumentos **cobas**® 6800/8800. El servidor IG (Instrument Gateway) se suministra con el sistema.

Tabla 11 Instrumentos

Equipo	P/N
Sistema cobas ® 5800	08707464001
Sistema cobas ® 6800 (opción móvil)	06379672001
Sistema cobas ® 6800 (fijo)	05524245001
Sistema cobas ® 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.¹⁶⁻¹⁸ Solamente el personal competente en la manipulación de material biopeligroso y en el uso de la prueba cobas® MAI 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.¹⁶
- El éxito de la inactivación micobacteriana depende del cumplimiento de los procedimientos descritos en este documento y de 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® MAI**, el **cobas® MAI** 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.¹⁴
- 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® MAI**, el **cobas® MAI** Positive Control Kit, el **cobas® Buffer Negative Control Kit**, los reactivos **cobas® omni** y el material fungible 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® MAI 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 ≤ -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 ≤ -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 ≤ -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® MAI, el cobas® MAI 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 MAI 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.¹⁶

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.¹⁶

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 cobas ® 5800 o los sistemas cobas ® 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"> • 1 ml de MIS para 1 prueba (0,2 ml de muestra de sedimento) • 2 ml de MIS para 2 pruebas (0,4 ml de muestra de sedimento) • 3 ml de MIS para 3 pruebas (0,6 ml de muestra de sedimento)
3		30-60 segundos	Agite fuertemente o agite en vórtex durante 30-60 segundos
4		≥ 60 minutos	Incubar la muestra como mínimo 60 min 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® MAI.

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 de 10 a 20 veces 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® MAI.

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

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® MAI 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 sonicador 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**® MAI o bien almacenarse según las condiciones especificadas en el apartado “Almacenamiento de muestras inactivadas”.

Ejecución de la prueba **cobas**® MAI en el sistema **cobas**® 5800

La prueba **cobas**® MAI 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 y/o la Guía del usuario de los sistemas **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® MAI en el sistema cobas® 5800

1	Inicie una sesión en el sistema.
2	<p>Cargue las muestras en el sistema.</p> <ul style="list-style-type: none">• Retire el tapón de los tubos.• Transfiera el tubo directamente al rack.• Cargue los racks de muestras en el sistema.• El sistema se prepara automáticamente.• Solicite las pruebas.<ul style="list-style-type: none">• Seleccione "Raw sputum" (Esputo crudo) para solicitar muestras de esputo crudo tratadas con MIS.• Seleccione "Sediment" (Sedimento) para solicitar muestras de sedimento de esputo/sedimento de LBA tratadas con MIS.
3	<p>Cargue los reactivos y el material fungible según las indicaciones del sistema.</p> <ul style="list-style-type: none">• Cargue el casete de reactivo específico de la prueba.• Cargue los miniracks de control.• Cargue las puntas de procesamiento.• Cargue las puntas de elución.• Cargue las placas de procesamiento.• Cargue las placas de residuos líquidos.• Cargue las placas de amplificación.• Cargue el casete con MGP.• Cargue el diluyente de muestras.• Cargue el reactivo de lisis.• Cargue el reactivo de lavado.
4	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.
5	Revise y exporte los resultados.
6	<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">• Descargue los miniracks de control vacíos.• Descargue el casete de reactivo específico de la prueba vacío.• Vacíe el cajón de placas de amplificación.• Vacíe los residuos líquidos.• Vacíe los residuos sólidos.

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

La prueba cobas® MAI 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 $3.000 \times g$.
- 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 los sistemas cobas® 6800/8800.

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

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

Resultados

La prueba cobas® MAI detecta y diferencia automáticamente el ADN de *M. avium* y *M. intracellulare* 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 [MAI (+) 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 del cobas® 5800, en la app “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 lote para un tipo de resultado solicitado se procesa un control negativo [(-) Ctrl] y un control positivo [MAI (+) 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 MAI se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15 Resultados e interpretación de la prueba cobas® MAI

Diana 1	Diana 2	Interpretación
MIN Positive	MAV Positive	Todos los resultados solicitados son válidos. Se ha detectado una señal diana para el ADN de <i>M. intracellulare</i> y <i>M. avium</i> .
MIN Positive	MAV Negative	Todos los resultados solicitados son válidos. Se ha detectado una señal diana para el ADN de <i>M. intracellulare</i> . No se ha detectado ninguna señal diana para el ADN de <i>M. avium</i> .
MIN Positive	Invalid	No todos los resultados solicitados son válidos. Se ha detectado una señal diana para el ADN de <i>M. intracellulare</i> . El resultado para <i>M. intracellulare</i> es válido. El resultado para <i>M. avium</i> no es válido. La muestra original debe volver a analizarse para obtener resultados para <i>M. avium</i> válidos. Si el resultado sigue siendo no válido, deberá obtenerse una nueva muestra.
MIN Negative	MAV Positive	Todos los resultados solicitados son válidos. No se ha detectado ninguna señal diana para el ADN de <i>M. intracellulare</i> . Se ha detectado una señal diana para el ADN de <i>M. avium</i> .
MIN Negative	MAV Negative	Todos los resultados solicitados son válidos. No se ha detectado ninguna señal diana para el ADN de <i>M. intracellulare</i> . No se ha detectado ninguna señal diana para el ADN de <i>M. avium</i> .
MIN Negative	Invalid	No todos los resultados solicitados son válidos. No se ha detectado ninguna señal diana para el ADN de <i>M. intracellulare</i> . El resultado para <i>M. intracellulare</i> es válido. El resultado para <i>M. avium</i> no es válido. La muestra original debe volver a analizarse para obtener resultados para <i>M. avium</i> válidos. Si el resultado sigue siendo no válido, deberá obtenerse una nueva muestra.
Invalid	MAV Positive	No todos los resultados solicitados son válidos. El resultado para <i>M. intracellulare</i> no es válido. La muestra original debe volver a analizarse para obtener resultados para <i>M. intracellulare</i> válidos. Si el resultado sigue siendo no válido, deberá obtenerse una nueva muestra. Se ha detectado una señal diana para el ADN de <i>M. avium</i> . El resultado para <i>M. avium</i> es válido.
Invalid	MAV Negative	No todos los resultados solicitados son válidos. El resultado para <i>M. intracellulare</i> no es válido. La muestra original debe volver a analizarse para obtener resultados para <i>M. intracellulare</i> válidos. Si el resultado sigue siendo no válido, deberá obtenerse una nueva muestra. No se ha detectado ninguna señal diana para el ADN de <i>M. avium</i> . El resultado para <i>M. avium</i> es válido.
Invalid	Invalid	Tanto el resultado para <i>M. intracellulare</i> como el resultado para <i>M. avium</i> son no válidos. La muestra original debe volver a analizarse para obtener resultados válidos para <i>M. intracellulare</i> y <i>M. avium</i> . Si los resultados siguen siendo no válidos, 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® MAI en el sistema cobas® 5800

ID muestra	Prueba	Resultado de control	Aviso	Estado	Resultado		Fecha/Hora creación
MIA_S_pos-02	MAI	Valid		Released	MIN Positive (Ct 38.51)	MAV Positive (Ct 39.27)	6/30/2022 1:33:50 PM
MAI_S_pos-01	MAI	Valid		Released	MIN Positive (Ct 37.15)	MAV Positive (Ct 37.42)	6/30/2022 1:33:51 PM
MAI_S_neg-02	MAI	Valid		Released	MIN Negative	MAV Negative	6/30/2022 1:33:52 PM
MAI_S_neg-01	MAI	Valid		Released	MIN Negative	MAV Negative	6/30/2022 1:33:51 PM
MAI_S_inv-01	MAI	Valid		Released	MIN Invalid	MAV Invalid	6/30/2022 1:33:53 PM
MAI_RS_pos-02	MAI	Valid		Released	MIN Positive (Ct 38.72)	MAV Positive (Ct 38.61)	6/30/2022 1:33:51 PM
MAI_RS_pos-01	MAI	Valid		Released	MIN Positive (Ct 37.39)	MAV Positive (Ct 37.49)	6/30/2022 1:33:51 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 “Válida” y “Resultado global” no son aplicables a los resultados de las muestras de la prueba cobas® MAI 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® MAI en los sistemas cobas® 6800/8800

Prueba	ID muestra	Válido	Avisos	Tipo de muestra	Resultado general	Diana 1	Diana 2
MAI 850 µl	MAI_R_0001	NA		Raw sputum	NA	MIN Negative	MAV Positive
MAI 850 µl	MAI_R_0002	NA		Raw sputum	NA	MIN Positive	MAV Negative
MAI 850 µl	MAI_R_0003	NA	P02T	Raw sputum	NA	Invalid	Invalid
MAI 850 µl	MAI_S_0001	NA		Sediment	NA	MIN Negative	MAV Positive
MAI 850 µl	MAI_S_0002	NA		Sediment	NA	MIN Positive	MAV Negative
MAI 850 µl	MAI_S_0003	NA	C02H1	Sediment	NA	Invalid	Invalid
MAI 850 µl	C161420284090428828404	Yes		(-) Ctrl	Valid	Valid	Valid
MAI 850 µl	C161420284093009580264	Yes		MAI (+) C	Valid	Valid	Valid

Limitaciones del procedimiento

- La prueba cobas® MAI siempre debe realizarse junto con un cultivo micobacteriano para minimizar el riesgo de obtener resultados falsos negativos además de para permitir la realización de pruebas de farmacosenibilidad del aislado de MAC como ayuda en la atención del paciente.
- El rendimiento de la prueba cobas® MAI 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.¹⁹ 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® MAI 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 micobacteriana depende del cumplimiento de los procedimientos descritos en este documento y de 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 los organismos.
- 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® MAI se ha evaluado únicamente para su uso en combinación con el cobas® MAI 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**® MAI 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**® MAI distingue entre *M. intracellulare* y *M. avium*. La prueba **cobas**® MAI detecta otras especies del complejo *M. avium*, pero no las diferencia. La detección se lleva a cabo en el fragmento diana de *M. intracellulare* o de *M. avium*. Para obtener información detallada, consulte el estudio de inclusividad del apartado “Evaluación del rendimiento”.
- La detección del complejo *M. avium* depende del número de organismos presentes en la muestra y puede verse afectada por los métodos de obtención de las muestras y factores propios del paciente (como la edad, la gravedad de la enfermedad y el estado de VIH).
- Los pacientes infectados tanto por MAI como por VIH tienen una mayor probabilidad de que las muestras resulten negativas en la microscopía de frotis y que, por lo tanto, su nivel de ADN de MAC sea inferior 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**® MAI 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**® MAI 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. avium* cubiertas por los cebadores y/o las sondas de la prueba **cobas**® MAI 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**® MAI 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**® MAI en el laboratorio. El empleo de otros 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 micobacteriana mediante el 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 5×10^7 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® MAI se determinó mediante el análisis de diluciones en serie de una cepa de *M. intracellulare* (ATCC® 13209™) y de una cepa de *M. avium* (ATCC® 19075™), cada una de ellas en dos matrices clínicas de pools negativos (esputo crudo y sedimentos de esputo/LBA). Se analizaron paneles de niveles de concentración más un blanco con un total de 72 réplicas por concentración utilizando tres lotes de reactivo de la prueba cobas® MAI, con múltiples series analíticas, días, operadores e instrumentos.

El LoD para *M. intracellulare* osciló entre 46,3 UFC/ml (esputo/sedimento de LBA) y 46,6 UFC/ml (esputo crudo).

El LoD para *M. avium* osciló entre 43,5 UFC/ml (esputo/sedimento de LBA) y 44,9 UFC/ml (esputo crudo).

Inclusividad

La inclusividad de la prueba cobas® MAI se confirmó para once miembros del complejo *M. avium* mediante el análisis de un total de 25 cepas.

Se detectaron las siguientes especies que generaron resultados positivos para *M. intracellulare*:

- *M. intracellulare* (ATCC® 25130™, ATCC® 35763™, B99-03.25.0163, B99-04.23.0178, B00-08.20.1090, B99-05.19.0190, B98-10.30.0156)
- *M. arosiense* (E. Tortoli)
- *M. chimaera* (HO1421839)
- *M. colombiense* (DSM 45105)
- *M. indicus pranii* (DSM 45239)
- *M. marseillense* (CCUG 56325 T)
- *M. timonense* (11324/16)
- *M. vulneris* (DMS 45247)
- *M. yongonense* (B04-09.20.0164)

Se detectaron las siguientes especies que generaron resultados positivos para *M. avium*:

- *M. avium* (N-315 y N-337, aislado en cultivo de pacientes japoneses)
- *M. avium* subesp. *avium* (B95-X25 serotipo 3, B95-25522 serotipo 8, B95-18302 serotipo 15, ATCC® 35718™)
- *M. avium* subesp. *hominissuis* (ITM 960255)
- *M. avium* subesp. *paratuberculosis* (B98-11.02.0221)
- *M. avium* subesp. *silvaticum* (DSM 44157)
- *M. bouchedurhonense* (CCUG 56331)

Todas las cepas se detectaron a 256 UFC/ml y 241 UFC/ml para *M. intracellulare* y *M. avium*, respectivamente, utilizando el tipo de muestra de sedimento.

Precisión

La precisión interna se examinó utilizando un panel formado por cultivos de *M. intracellulare* (ATCC® 13209™) y *M. avium* (ATCC® 19075™) 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 por tres niveles de concentración, utilizando tres lotes de reactivos para la prueba cobas® MAI y dos instrumentos durante un periodo de 12 días y con un total de 24 series. En la Tabla 16 y en la Tabla 17 se muestra una descripción de los paneles de precisión y 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 18 y la Tabla 19) se obtuvieron CV (%) globales que oscilaban entre el 1,5 % y el 2,7 % para *M. intracellulare* y entre el 1,5 % y el 2,5 % para *M. avium*.

Tabla 16 Resumen de la precisión intralaboratorio — *M. intracellulare*

Concentración de diana	N pruebas	N MIN Positivas	Tasa de positividad de MIN	Intervalo de confianza del 95 %	
				Límite inferior	Límite superior
<i>M. intracellulare</i> — esputo crudo					
Negativa	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
77,4 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
232 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
<i>M. intracellulare</i> — sedimento					
Negativa	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
74,3 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
223 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %

Tabla 17 Resumen de la precisión intralaboratorio — *M. avium*

Concentración de diana	N pruebas	N MAV Positivas	Tasa de positividad de MAV	Intervalo de confianza del 95 %	
				Límite inferior	Límite superior
<i>M. avium</i> — esputo crudo					
Negativa	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
88,0 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
264 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
<i>M. avium</i> — sedimento					
Negativa	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
71,1 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
213 UFC/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %

Tabla 18 Media global, desviaciones estándar y coeficientes de variación (%) para el ciclo umbral, paneles de *M. intracellulare* 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. intracellulare</i> — esputo crudo														
77,4 UFC/ml	100,0 %	37,6	0,83	2,2	0,00	0,0	0,48	1,3	0,20	0,5	0,00	0,0	0,98	2,6
232 UFC/ml	100,0 %	36,5	0,74	2,0	0,47	1,3	0,33	0,9	0,00	0,0	0,29	0,8	0,98	2,7
<i>M. intracellulare</i> — sedimento														
74,3 UFC/ml	100,0 %	38,1	0,56	1,5	0,34	0,9	0,00	0,0	0,17	0,4	0,13	1,8	0,69	1,8
223 UFC/ml	100,0 %	36,9	0,37	1,0	0,25	0,7	0,00	0,0	0,33	0,9	0,00	0,0	0,56	1,5

Tabla 19 Media global, desviaciones estándar y coeficientes de variación (%) para el ciclo umbral, paneles de *M. avium* 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. avium</i> — esputo crudo														
88,0 UFC/ml	100,0 %	37,9	0,87	2,3	0,00	0,0	0,25	0,7	0,24	0,6	0,00	0,0	0,94	2,5
264 UFC/ml	100,0 %	36,4	0,48	1,3	0,40	1,1	0,35	1,0	0,16	0,4	0,00	0,0	0,73	2,0
<i>M. avium</i> — sedimento														
71,1 UFC/ml	100,0 %	38,8	0,51	1,3	0,25	0,7	0,10	0,3	0,00	0,0	0,11	0,3	0,59	1,5
213 UFC/ml	100,0 %	37,5	0,50	1,3	0,34	0,9	0,40	1,0	0,00	0,0	0,12	0,3	0,74	2,0

Especificidad analítica/reactividad cruzada

Se analizó un panel de 173 bacterias, hongos y virus, incluidos los de mayor presencia en el tracto respiratorio, con la prueba cobas® MAI a fin de valorar su especificidad analítica. Se analizaron los organismos indicados en la Tabla 20 con concentraciones de aproximadamente 1×10^6 unidades/ml para las bacterias y de aproximadamente 1×10^5 unidades/ml para los virus. Se analizaron todos los posibles organismos interferentes en ausencia y presencia de la diana de *M. intracellulare*/*M. avium* (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 de *M. intracellulare*/*M. avium* no se vio afectada por los organismos analizados, a excepción de *M. kansasii* y *M. szulgai* con unos niveles de concentración $> 1E+05$ UFC/ml y de *M. gastri* con unos niveles de concentración $> 1E+04$ UFC/ml.

La posible reactividad cruzada de *Histoplasma capsulatum*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii* y *Mycobacterium suricattae* se evaluó *in silico*. Los resultados de los análisis *in silico* predicen una probabilidad reducida de amplificación y detección de dichos organismos cuando se utiliza la prueba cobas® MAI.

Tabla 20 Microorganismos analizados para la especificidad analítica/reactividad cruzada

Microorganismo	Concentración	Microorganismo	Concentración
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium gordonae</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium haemophilum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Actinomyces israelii</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium holsaticum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium intermedium</i>	1,0E+06 UFC/ml
Adenovirus	1,0E+05 U/ml	<i>Mycobacterium kansasii</i>	1,0E+05 UFC/ml*
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium kumamontense</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Bacillus cereus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium malmoense</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Bacillus subtilis</i> subesp. <i>subtilis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium mantonii</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Bactericides fragilis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium marinum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Bordetella parapertussis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Bordetella pertussis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Burkholderia cepacia</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium orygis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Campylobacter jejuni</i> subesp. <i>jejuni</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Candida albicans</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Candida glabrata</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium simiae</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Candida krusei</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Candida parapsilosis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium szulgai</i>	1,0E+05 UFC/ml*
<i>Candida tropicalis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium terrae</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,0E+06 UFI/ml	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	1,0E+06 UFI/ml	<i>Mycobacterium triviale</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Citrobacter freundii</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium vaccae</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycobacterium xenopi</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,0E+06 UCC/ml
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,0E+06 UFC/ml

Microorganismo	Concentración	Microorganismo	Concentración
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Neisseria lactamica</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Neisseria mucosa</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Neisseria sicca</i>	1,0E+06 UFC/ml
Citomegalovirus	1,0E+05 UFI/ml	<i>Nocardia asteroides</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Eikenella corrodens</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Nocardia brasiliensis</i>	1,0E+06 geq/ml
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Enterobacter cloacae</i> subesp. <i>cloacae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Nocardia farcinica</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Enterococcus avium</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Nocardia nova</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Enterococcus faecium</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Nocardia transvalensis</i>	1,0E+06 UFC/ml
Enterovirus tipo 68/2007	1,0E+05 U/ml	<i>Pasteurella multocida</i> subesp. <i>tigris</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Escherichia coli</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1,0E+06 geq/ml
<i>Escherichia coli</i> productora de CTX-M-15 ESBL	1,0E+06 UFC/ml	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subesp. <i>nucleatum</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Penicillium chermesinum</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Gordona rubropertinctus</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus del herpes simple tipo 1	1,0E+05 cp/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus del herpes simple tipo 2	1,0E+05 cp/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus de inmunodeficiencia humana	1,0E+05 cp/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus de la gripe humana A	1,0E+05 U/ml	<i>Providencia stuartii</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus de la gripe humana B	1,0E+05 U/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,0E+06 UFC/ml
Metapneumovirus humano	1,0E+05 U/ml	<i>Rhizopus</i> spp.	1,0E+06 UFC/ml
Virus de la parainfluenza humana tipo 1	1,0E+05 U/ml	<i>Rhodococcus equi</i>	1,0E+06 UFC/ml
Virus de la parainfluenza humana tipo 2	1,0E+05 U/ml	Virus del sarampión	1,0E+05 U/ml
Virus de la parainfluenza humana tipo 3	1,0E+05 U/ml	Virus de la rubeola	1,0E+05 U/ml
Virus de la parainfluenza humana tipo 4	1,0E+05 U/ml	Rubulavirus	1,0E+05 U/ml
Virus sincitial respiratorio humano A	1,0E+05 U/ml	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovar Dublín	1,0E+06 UFC/ml
Virus sincitial respiratorio humano B	1,0E+05 U/ml	<i>Scedosporium</i> spp.	1,0E+06 UFC/ml
Rinovirus humano 16	1,0E+05 U/ml	<i>Serratia marcescens</i> subesp. <i>marcescens</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Kingella kingae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Shigella flexneri</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Kingella oralis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Shigella sonnei</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Staphylococcus aureus</i> subesp. <i>aureus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de KPC-3 <i>carbapenemase</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Staphylococcus capitis</i> subesp. <i>capitis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subesp. <i>pneumoniae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Lactobacillus casei</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Staphylococcus hominis</i> subesp. <i>hominis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Legionella micdadei</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Legionella pneumophila</i> subesp. <i>pneumophila</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,0E+06 UFC/ml

Microorganismo	Concentración	Microorganismo	Concentración
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus constellatus</i> subesp. <i>constellatus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus equi</i> subesp. <i>equi</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Morganella morganii</i> subesp. <i>morganii</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus mitis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus mutans</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium bovis</i> subesp. <i>bovis</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium bovis</i> subesp. <i>caprae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus salivarius</i> subesp. <i>salivarius</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium canetti</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium caprae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptococcus uberis</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium celatum</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptomyces anulatus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Streptomyces griseus</i>	1,0E+06 UFC/ml
<i>Mycobacterium chubuense</i>	1,0E+06 UFC/ml	<i>Tsukamurella</i> spp.	1,0E+06 geq/ml
<i>Mycobacterium confluentis</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
<i>Mycobacterium gastri</i>	1,0E+04 UFC/ml*	-	-

* Nivel al que no se observó ninguna interferencia con la detección de *M. intracellulare* y *M. avium*, analizado también con concentración de 1,0E+06 UFC/ml, en cuyo caso se produjeron interferencias con las dianas tanto de *M. intracellulare* como de *M. avium*.

Interferencia

Se evaluó el efecto de sustancias exógenas potencialmente secretadas en las muestras respiratorias (Tabla 21). 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 de *M. intracellulare* y *M. avium* (añadido a 200 UFC/ml).

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

Tabla 21 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	Levofloxacina	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
Petasita	225 mg/ml	Moxifloxacina	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

Sustancia	Concentración	Sustancia	Concentración
Epinefrina	100 µg/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
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	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 22). 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 de *M. intracellulare* y *M. avium* (añadido a 200 UFC/ml).

Ninguna de las sustancias interfirió con el rendimiento de la prueba generando resultados falsos positivos. Ninguna de las sustancias, a excepción de la mucina al 5 %, interfirió con el rendimiento de la prueba generando resultados falsos negativos. No se observó ninguna interferencia para la mucina con niveles de concentración del 4 % o inferiores.

Tabla 22 Lista de sustancias endógenas analizadas para determinar su interferencia

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

* Nivel al que no se observó ninguna interferencia con la detección de *M. intracellulare* y *M. avium*, analizado también con una concentración del 5 %, en cuyo caso se detectaron interferencias parciales con las dianas tanto de *M. intracellulare* como de *M. avium*.

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 de *M. intracellulare* y *M. avium* con una concentración de aproximadamente $3 \times \text{LoD}$ de la matriz respectiva. Los resultados de este estudio determinaron que todas las réplicas fueron válidas y positivas para *M. intracellulare* y *M. avium*, lo que representa una tasa de fallo de todo el sistema del 0 % con un intervalo de confianza unilateral superior del 95 % del 3,0 %.

Contaminación por arrastre

Se ha estudiado la posible contaminación por arrastre en los sistemas **cobas**® 6800/8800 que utilizan la prueba **cobas**® MAI mediante la prueba relacionada **cobas**® MTB y tipos de muestras y flujos de trabajo idénticos. La contaminación por arrastre puede causar resultados falsos positivos. El estudio de rendimiento ha determinado que la tasa de contaminación por arrastre entre muestras es del 0,0 % (0/240) tras realizar alternativamente 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 2×10^6 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**® MAI utilizando muestras clínicas se evaluó mediante el análisis de muestras archivadas (esputo crudo, sedimentos de esputo/LBA) procedentes de sujetos de 18 años de edad como mínimo con presunta infección respiratoria micobacteriana en Alemania, Japón, Sudáfrica, Suiza y Texas. Se realizaron unas pruebas de comparación en paralelo con la prueba COBAS® TaqMan® MAI. La sensibilidad y especificidad se establecieron en comparación con el cultivo micobacteriano. La población de pacientes seleccionada para determinar la sensibilidad estaba formada por 51 frotis negativos a BAAR (49 %), 13 frotis con BAAR insuficientes (13 %), 19 frotis de BAAR 1+ (18 %), 15 frotis de BAAR 2+ (14 %), 4 frotis de BAAR 3+ (4 %) y 2 frotis de BAAR indeterminados (2 %) pertenecientes a sedimentos de esputo/LBA, lo que supone un total de 81 sedimentos de esputo y 23 sedimentos de LBA. En el caso de los esputos crudos, se analizaron 26 frotis negativos a BAAR (47 %), 5 frotis con BAAR insuficientes (9 %), 8 frotis de BAAR 1+ (15 %), 12 frotis de BAAR 2+ (22 %) y 4 frotis de BAAR 3+ (7 %).

Los resultados se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23 Sensibilidad y especificidad de la prueba **cobas**® MAI utilizando muestras clínicas

				Roche cobas ® MAI	Roche COBAS ® TaqMan® MAI
Sensibilidad	Espudo crudo	MIN C+	MIN	16/24 66,7 % [44,7-84,4 %]	N/A
		MAV C+	MAV	27/31 87,1 % [70,1-96,3 %]	N/A
		MIN y/o MAV C+	MIN/MAV	44/55 80,0 % [67,0-89,6 %]	N/A
	Sedimento	MIN C+	MIN	27/46 58,7 % [43,2-73,0 %]	32/46 69,6 % [54,2-82,3 %]
		MAV C+	MAV	35/58 60,3 % [46,6-72,9 %]	36/58 62,1 % [48,4-74,5 %]
		MIN y/o MAV C+	MIN/MAV	62/104 59,6 % [49,5-69,1 %]	68/104 65,4 % [55,4-74,4 %]

				Roche cobas® MAI	Roche COBAS® TaqMan® MAI
Especificidad	Espuito crudo	MIN C-	MIN	350/350 100,0 % [99,0-100,0 %]	N/A
		MAV C-	MAV	350/350 100,0 % [99,0-100,0 %]	N/A
		MIN y MAV C-	MIN/MAV	350/350 100,0 % [99,0-100,0 %]	N/A
	Sedimento	MIN C-	MIN	412/412 100,0 % [99,1-100,0 %]	408/412 99,0 % [97,5-99,7 %]
		MAV C-	MAV	412/412 100,0 % [99,1-100,0 %]	411/412 99,8 % [98,7-100,0 %]
		MIN y MAV C-	MIN/MAV	412/412 100,0 % [99,1-100,0 %]	407/412 98,8 % [97,2-99,6 %]
VPP	Espuito crudo	MIN PCR+	MIN	16/16 100,0 % [79,4-100 %]	N/A
		MAV PCR+	MAV	27/27 100,0 % [87,2-100 %]	N/A
		MIN y/o MAV PCR+	MIN/MAV	44/44 100,0 % [92,0-100 %]	N/A
	Sedimento	MIN PCR+	MIN	27/27 100,0 % [87,2-100 %]	32/36 88,9 % [73,9-96,9 %]
		MAV PCR+	MAV	35/35 100,0 % [90,0-100 %]	36/37 97,3 % [85,8-99,9 %]
		MIN y/o MAV PCR+	MIN/MAV	62/62 100,0 % [94,2-100 %]	68/73 93,2 % [84,7-97,7 %]

				Roche cobas® MAI	Roche COBAS® TaqMan® MAI
VPN	Espuito crudo	MIN PCR-	MIN	350/358 97,7 % [95,6-99,0 %]	N/A
		MAV PCR-	MAV	350/354 98,9 % [97,1-99,7 %]	N/A
		MIN y/o MAV PCR-	MIN/MAV	350/361 96,7 % [94,6-98,5 %]	N/A
	Sedimento	MIN PCR-	MIN	412/431 95,6 % [93,2-97,3 %]	408/422 96,7 % [94,5-98,2 %]
		MAV PCR-	MAV	412/435 94,7 % [92,2-96,6 %]	411/433 94,9 % [92,4-96,7 %]
		MIN y/o MAV PCR-	MIN/MAV	412/454 90,7 % [87,7-93,3 %]	407/443 91,9 % [88,9-94,2 %]

C = cultivo, MIN = *Mycobacterium intracellulare*, MAV = *Mycobacterium avium*

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

 Age/DOB Edad o fecha de nacimiento	 Dispositivo no apto para análisis en el lugar de asistencia al paciente	 QS IU/PCR UI de QS por reacción de PCR, utilice las unidades internacionales (UI) de QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.
 SW Software auxiliar	 Dispositivo no apto para autoexamen	 SN Número de serie
 Assigned Range [copies/mL] Intervalo asignado (copias/ml)	 Distribuidor <i>(Nota: el país o la región se indicará debajo de este símbolo.)</i>	 Site Centro
 Assigned Range [IU/mL] Intervalo asignado (UI/ml)	 No deben reutilizarse	 Procedure Standard Procedimiento estándar
 EC REP Representante autorizado en la Comunidad Europea	 Mujeres	 STERILE EO Esterilizado con óxido de etileno
 BARCODE Hoja de datos del código de barras	 Para evaluación del rendimiento IVD únicamente	 Almacenar en la oscuridad
 LOT Código de lote	 GTIN Número mundial de artículo comercial	 Límite de temperatura
 Riesgo biológico	 Importador	 TDF Archivo de definición de pruebas
 REF Número de catálogo	 IVD 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> .	 LLR Límite inferior del intervalo asignado	 Procedure UltraSensitive Procedimiento ultrasensible
 Collect Date Fecha de recogida	 Hombres	 UDI Identificación exclusiva del dispositivo
 Consulte las instrucciones de uso	 Fabricante	 ULR Límite superior del intervalo asignado
 Suficiente para <n> pruebas	 CONTROL - Control negativo	 Urine Fill Line Línea de llenado de orina
 CONTENT Contenido del kit	 Sin esterilizar	 Rx Only 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 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 + Control positivo	
	 QS copies / PCR 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

Fabricante

Tabla 25 Fabricante

Fabricado en los Estados Unidos



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
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. Goslee S, Wolinsky E. Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*. 1976;113:287-92.
2. Wolinsky E, Rynearson TK. Mycobacteria in soil and their relation to disease-associated strains. *Am Rev Respir Dis*. 1968;97:1032-7.
3. Chapman JS. The ecology of the atypical mycobacteria. *Arch Environ Health*. 1971;22:41-6.
4. Gruft H, Falkinham JO, 3rd, Parker BC. Recent experience in the epidemiology of disease caused by atypical mycobacteria. *Rev Infect Dis*. 1981;3:990-6.
5. Griffith DE, Aksomit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:367-416.
6. Cayrou C, Turenne C, Behr MA, Drancourt M. Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. *Microbiology (Reading)*. 2010;156:687-94.
7. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:727-52.
8. Saito H, Tomioka H, Sato K, Tasaka H, Dawson DJ. Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J Clin Microbiol*. 1990;28:1694-7.
9. Horsburgh Jr CR. Epidemiology of *Mycobacterium avium* complex disease. *Am J Med*. 1997;102:11-5.
10. Cassidy PM, Hedberg K, Saulson A, McNelly E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin Infect Dis*. 2009;49:e124-9.
11. Maugein J, Dailloux M, Carbonnelle B, et al. Sentinel-site surveillance of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2005;26:1092-6.
12. Freeman J, Morris A, Blackmore T, et al. Incidence of nontuberculous mycobacterial disease in New Zealand, 2004. *N Z Med J*. 2007;120:U2580.
13. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8.
14. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7.
15. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94.
16. World Health Organization. *Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual*. WHO: Geneva, Switzerland; 2012.
17. 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.
18. 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.
19. 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 Limitaciones del procedimiento al apartado Rendimiento con muestras clínicas.</p> <p>Se ha actualizado la marca cobas®.</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>