

# COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, versión 2.0

**cobas®**

Rx Only

## PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®  
HIV-1 Test, v2.0

**HI2CAP**

48 Tests

P/N: 05212294 190

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®  
Wash Reagent

**PG WR**

5.1 Liters

P/N: 03587797 190

## USO PREVISTO

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, versión 2.0 (v2.0), es una prueba de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos para la cuantificación del ARN del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1) en plasma humano conservado en EDTA o en muestras de plasma seco procedentes de una **cobas®** Plasma Separation Card (**PSC**) mediante el equipo COBAS® AmpliPrep para el procesamiento automatizado de muestras y el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48 para la amplificación y la detección automatizadas. La prueba puede cuantificar el ARN del HIV-1 en el intervalo de 20 a 10.000.000 copias/ml (entre 33 y 1,67 x 10<sup>7</sup> unidades internacionales [UI]/ml en plasma conservado en EDTA y de 738 a 10.000.000 copias/ml (entre 1.230 y 1,67 x 10<sup>7</sup> unidades internacionales [UI]/ml) en una muestra de plasma seco procedente de una **PSC**). Una copia de ARN de HIV-1 equivale a 1,67 UI según el primer estándar internacional de la OMS para el ARN de HIV-1 para técnicas basadas en ácidos nucleicos (NAT) (NIBSC 97/656)<sup>36</sup>.

La prueba se emplea junto con presentaciones clínicas u otros marcadores de laboratorio de la evolución de la enfermedad para el tratamiento clínico de los pacientes infectados por el HIV-1 grupo M y HIV-1 grupo O. La prueba se puede usar para valorar el pronóstico del paciente mediante la determinación del nivel de ARN del HIV-1 de la línea de base o para monitorizar los efectos de la terapia antirretroviral por medio de la determinación de los cambios de los niveles de ARN del HIV-1 durante el curso del tratamiento antirretroviral.

**La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, no está indicada para uso como prueba de detección sistemática de la presencia del HIV-1 en sangre o hemoderivados ni como prueba diagnóstica para confirmar la presencia de una infección por HIV-1.**

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es el agente etiológico del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)<sup>1-3</sup>. La infección por HIV se puede transmitir mediante contacto sexual, exposición a sangre infectada o hemoderivados o por medio de la madre infectada al feto<sup>4</sup>. Al cabo de tres a seis semanas de exposición al HIV, las personas infectadas, por lo general, desarrollan un síndrome breve, agudo, caracterizado por síntomas pseudogripales y asociado a niveles elevados de viremia en sangre periférica<sup>5-8</sup>. En la mayoría de las personas infectadas se produce a continuación una respuesta inmunitaria específica del HIV y una disminución de la viremia plasmática, normalmente al cabo de cuatro o seis semanas del inicio de los síntomas<sup>9,10</sup>. Tras la seroconversión, las personas infectadas, por lo general, entran en una fase asintomática, clínicamente estable, que puede prolongarse durante años<sup>11-13</sup>. El período asintomático se caracteriza por un nivel plasmático bajo de viremia persistente<sup>14</sup> y una disminución gradual de linfocitos CD4<sup>+</sup> T, lo que puede dar lugar a inmunodeficiencia grave, múltiples infecciones oportunistas, tumores malignos y la muerte<sup>15</sup>. Aunque las concentraciones de virus en sangre

periférica son relativamente bajas durante la fase asintomática de la infección, la replicación y eliminación del virus son procesos dinámicos en los que los altos índices de producción de virus y de infección de los linfocitos CD4<sup>+</sup> quedan equilibrados por los índices, igualmente altos, de eliminación vírica, muerte de las células infectadas y reabastecimiento de linfocitos CD4<sup>+</sup>, lo que da lugar a niveles relativamente estables de viremia y linfocitos CD4<sup>+</sup> plasmáticos<sup>16-18</sup>.

Las determinaciones cuantitativas de viremia por HIV en sangre periférica han demostrado que los niveles mayores de virus pueden estar relacionados con un aumento del riesgo de evolución clínica de la enfermedad producida por el HIV y que las disminuciones de los niveles plasmáticos de virus se pueden asociar con un riesgo menor de evolución clínica<sup>19-21</sup>. Los niveles de virus en sangre periférica se pueden cuantificar mediante la determinación sérica del antígeno p24 del HIV por medio de cultivo cuantitativo del HIV procedente del plasma o mediante la determinación directa del ARN viral en plasma por medio de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos o amplificación de señales<sup>22-26</sup>.

En la actualidad, la OMS también recomienda el uso de muestras secas para ampliar el alcance de las pruebas de carga viral en situaciones de recursos limitados sin acceso inmediato a servicios de flebotomía u opciones sólidas de transporte de muestras de plasma conservadas en EDTA<sup>27</sup>. Las muestras de plasma seco procedentes de **PSC**, que también estabilizan el ARN del HIV en plasma seco, pueden mejorar la cobertura de las pruebas de carga viral en estas situaciones, ya que permiten transportar las muestras durante distancias más largas y en condiciones ambientales más extremas que el plasma conservado en EDTA.

El antígeno p24 es la principal proteína del núcleo del HIV y se encuentra en el suero en forma libre o unido al anticuerpo anti-p24. El antígeno p 24 libre se puede determinar mediante ensayos de inmunoenzimología (EIA) aunque la utilidad del antígeno p24 como marcador de la carga viral es escasa dado que el antígeno se detecta sólo en el 20% de los pacientes asintomáticos y el 40-50% de los pacientes sintomáticos. Los procedimientos para disociar los complejos antígeno-anticuerpo aumentan la sensibilidad de las pruebas del antígeno p24 pero la proteína vírica permanece indetectable en la mayoría de los pacientes asintomáticos<sup>22</sup>.

El HIV infeccioso en plasma se puede cultivar mediante inoculación en células mononucleares activadas de sangre periférica (CMSP) de donantes sanos. La cuantificación se logra mediante la inoculación de CMSP con diluciones sucesivas de la muestra de plasma. El cultivo cuantitativo posee utilidad escasa para la monitorización de los niveles de virus en personas infectadas, dado que sólo una pequeña fracción de partículas víricas es infecciosa *in vitro*. El virus infeccioso a menudo es indetectable en personas asintomáticas<sup>22</sup>.

El ARN del HIV se puede cuantificar en plasma mediante tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>28-30</sup>. La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 utiliza la tecnología de PCR para conseguir la máxima sensibilidad y el más amplio intervalo dinámico en la detección cuantitativa de ARN del HIV-1 en plasma con anticoagulante EDTA y muestras de plasma seco procedentes de **PSC**.

## PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos para la cuantificación del ARN del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) en plasma humano conservado en EDTA o en muestras de plasma seco procedentes de **PSC**. La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 se basa en tres procesos principales: (1) preparación de la muestra para aislar el ARN del HIV-1; (2) transcripción inversa del ARN del fragmento objetivo para generar ADN complementario (ADNc) y (3) amplificación mediante PCR del ADNc del fragmento objetivo y detección simultánea de sonda de detección oligonucleotídica doblemente marcada, escindida y específica del fragmento objetivo.

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, permite la preparación automatizada de la muestra seguida de la transcripción inversa, la amplificación mediante PCR y la detección de ARN del

fragmento objetivo del HIV-1 y Armored RNA del estándar de cuantificación (QS) del HIV-1, también automatizadas. El reactivo de mezcla maestra contiene cebadores y sondas específicos tanto para el ARN del HIV-1 como para el ARN del estándar de cuantificación del HIV-1. La mezcla maestra se ha desarrollado de modo que se asegure la cuantificación equivalente de los distintos subtipos del grupo M del HIV-1 y del grupo O del HIV-1. La detección del ADN amplificado se realiza utilizando sondas oligonucleótidas doblemente marcadas específicas del fragmento objetivo y del QS, respectivamente, que permiten la identificación independiente del amplicón del HIV-1 y el amplicón del QS del HIV-1.

La cuantificación del ARN vírico del HIV-1 se realiza empleando el estándar de cuantificación del HIV-1. Este estándar compensa los efectos de inhibición y controla los procesos de preparación y amplificación para permitir una cuantificación más exacta del ARN del HIV-1 presente en cada muestra. El estándar de cuantificación del HIV-1 es un constructo de Armored RNA no infeccioso que contiene las secuencias del HIV con regiones de unión de cebadores idénticos al ARN del fragmento objetivo del HIV-1 y una región exclusiva de unión a sonda que permite diferenciar el amplicón del estándar de cuantificación del HIV-1 del amplicón del fragmento objetivo del HIV-1.

El estándar de cuantificación del HIV-1 se añade a cada una de las muestras en un número de copias conocido y está presente durante los pasos posteriores de preparación de las muestras, transcripción inversa y amplificación mediante PCR y detección simultánea de las sondas de detección oligonucleótidas doblemente marcadas, escindidas. El analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48 calcula la concentración de ARN de HIV-1 presente en las muestras de prueba comparando la señal del HIV-1 con la señal del QS del HIV-1 para cada muestra y control.

### Selección del fragmento objetivo

La selección de la secuencia de ARN del fragmento objetivo del HIV-1 depende de la identificación de regiones dentro del genoma del HIV-1 que presenten una conservación máxima de la secuencia entre las muestras de los distintos subtipos del grupo M del HIV-1 y del grupo O del HIV-1. Debido a la elevada variabilidad genética del virus, la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 se dirige a dos regiones del genoma del HIV de forma simultánea para su amplificación y detección.

Dos sondas oligonucleótidas doblemente marcadas específicas del fragmento objetivo y una sonda oligonucleótida doblemente marcada específica del QS permiten la identificación independiente del amplicón del HIV-1 y del amplicón del QS del HIV-1. Por lo tanto, resulta crucial una selección apropiada de los cebadores y de la sonda oligonucleótida doblemente marcada para que la prueba pueda amplificar y detectar los subtipos del grupo M del HIV-1 y el grupo O del HIV-1. La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 utiliza transcripción inversa y cebadores de amplificación mediante PCR que definen las secuencias dentro de las regiones altamente conservadas del gen *gag* del HIV-1<sup>33</sup> y de la región LTR del HIV-1.

### Preparación de las muestras

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, utiliza la preparación automatizada de la muestra en el equipo COBAS® AmpliPrep mediante una técnica de captura genérica basada en sílice. El procedimiento procesa 850 µl de plasma o extracto basado en SPEX procedente de la **PSC**. Se lleva a cabo la lisis de las partículas víricas del HIV-1 mediante incubación a alta temperatura con una proteasa y un tampón de lisis/unión caotrópico que libera los ácidos nucleicos y protege al ARN del HIV-1 liberado de las RNasas presentes en el plasma. Junto con el reactivo de lisis y las micropartículas magnéticas, se introducen en cada muestra proteasa y un número conocido de moléculas de Armored RNA del estándar de cuantificación del HIV-1. Posteriormente se incuba la mezcla y el ARN del HIV-1 y el ARN del estándar de cuantificación del HIV-1 quedan unidos a la superficie de las micropartículas magnéticas. Las sustancias no unidas, tales como sales, proteínas y otras impurezas celulares, se eliminan mediante el lavado de las micropartículas magnéticas. Tras la separación de las micropartículas magnéticas y la completa realización de los pasos de lavado, los ácidos nucleicos adsorbidos se eluyen a temperatura elevada con una solución acuosa. Entonces se añade la muestra procesada, que contiene las micropartículas magnéticas además del

ARN del HIV-1 y el ARN del QS del HIV-1 liberados, a la mezcla de amplificación y se transfiere al analizador COBAS® TaqMan® o al analizador COBAS® TaqMan® 48. El ARN del fragmento objetivo del HIV-1 y el ARN del QS del HIV-1 se transcriben (transcripción inversa), amplifican y detectan simultáneamente mediante la escisión de sondas oligonucleótidas, doblemente marcadas, dos específicas del fragmento objetivo y una específica del QS.

### **Transcripción inversa y amplificación mediante PCR**

La transcripción inversa y la reacción de amplificación mediante PCR se lleva a cabo con la enzima ADN polimerasa termoestable recombinante de *Thermus specie* Z05 (Z05). En presencia de manganeso ( $Mn^{2+}$ ) y bajo condiciones de tampón apropiadas, Z05 exhibe actividad tanto de transcriptasa reversa como de polimerasa de ADN<sup>31,32</sup>. Esto permite que la transcripción inversa y la amplificación mediante PCR tengan lugar junto con la detección a tiempo real del amplicón.

Las muestras procesadas se añaden a la mezcla de amplificación en tubos de amplificación (tubos K), donde se producen tanto la transcripción inversa como la amplificación mediante PCR. La mezcla de reacción se calienta para permitir que los cebadores descendentes (downstream) hibriden específicamente con el ARN objetivo del HIV-1 y el ARN del QS del HIV-1. En presencia de  $Mn^{2+}$  y un exceso de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), entre los que se encuentran trifosfatos de desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitidina, desoxiuridina y desoxitimidina, la polimerasa Z05 extiende los cebadores hibridados para formar una cadena de ADN complementaria del fragmento objetivo del ARN.

#### Amplificación del fragmento objetivo

Las muestras procesadas se añaden a la mezcla de amplificación en tubos de amplificación (tubos K) donde se produce la amplificación mediante PCR. Tras la transcripción inversa del ARN del fragmento objetivo del HIV-1 y el ARN del QS del HIV-1, el termociclador del analizador COBAS® TaqMan® o del analizador COBAS® TaqMan® 48 calienta la mezcla de reacción para desnaturalizar los híbridos ARN:ADNc y exponer las secuencias del fragmento objetivo específicas del cebador. A medida que la mezcla se enfría, los cebadores se hibridan con el ADN del fragmento objetivo. En presencia de  $Mn^{2+}$  y un exceso de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), entre los que se encuentran trifosfatos de desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitidina, desoxiuridina y desoxitimidina, la polimerasa Z05 extiende los cebadores templados para formar moléculas de ADN bicatenario denominadas amplicones. El analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48 repite automáticamente este proceso durante un número de ciclos predeterminado, con el fin de duplicar en cada ciclo la cantidad de ADN amplicón. El número de ciclos requerido se programa previamente en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48. La amplificación tiene lugar únicamente en las dos regiones del genoma del HIV-1 situadas entre los cebadores. No se amplifica el genoma entero del HIV-1.

#### Amplificación selectiva

La amplificación selectiva del ácido nucleico del fragmento objetivo de la muestra se logra en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, mediante el uso de la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) y trifosfato de desoxiuridina (dUTP). La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen desoxiuridina<sup>34</sup>, pero no del ADN que contiene desoxitimidina.

El ADN natural carece de desoxiuridina que, sin embargo, está siempre presente en el amplicón debido al uso de trifosfato de desoxiuridina como uno de los dNTPs del reactivo de la mezcla maestra; por lo tanto, solo el amplicón contiene desoxiuridina. La desoxiuridina permite que la enzima AmpErase pueda destruir el amplicón contaminante antes de la amplificación del ADN del fragmento objetivo. Además, la enzima AmpErase destruye cualquier producto inespecífico que se pueda formar tras la activación inicial de la mezcla maestra por el manganeso. La enzima AmpErase, que se incluye en el reactivo de la Master Mix, cataliza la escisión del ADN que contiene desoxiuridina en la posición de los residuos de desoxiuridina

abriendo la cadena de la desoxirribosa en la posición C1. Cuando se calienta en el primer paso del ciclo térmico, la cadena de ADN amplión se rompe en la posición de la desoxiuridina, por lo que el ADN ya no puede amplificarse. La enzima AmpErase permanece inactiva durante un período de tiempo prolongado una vez expuesta a temperaturas superiores a los 55 °C, es decir, durante los pasos de la ciclación térmica y, por consiguiente, no destruye el amplicón objetivo formado durante la amplificación.

### **Detección de productos de la PCR en una prueba COBAS® TaqMan®**

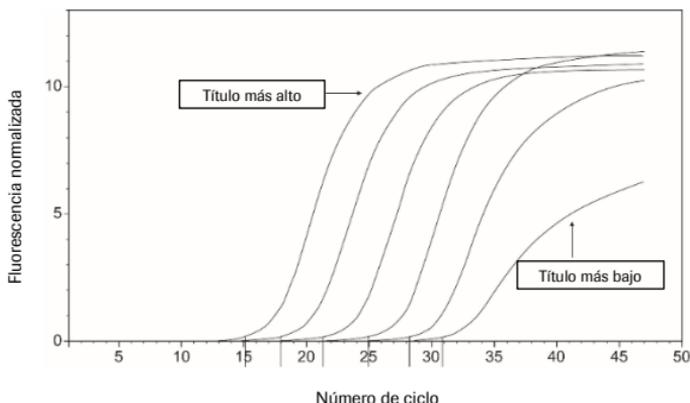
La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 utiliza la tecnología de la PCR en tiempo real<sup>35,36</sup>. El uso de sondas marcadas con doble marcador fluorescente permite detectar a tiempo real la acumulación del producto de la PCR mediante la supervisión de la intensidad de emisión de los marcadores emisores fluorescentes liberada durante el proceso de amplificación. Las sondas constan de sondas oligonucleótidas específicas para el HIV-1 y el QS del HIV-1 con un marcador emisor y un marcador silenciador. En la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, las sondas del HIV-1 y del QS del HIV-1 están marcadas con distintos marcadores emisores fluorescentes. Cuando las sondas están intactas, la proximidad del marcador silenciador suprime la fluorescencia del marcador emisor debido a efectos de transferencia de energía de tipo Förster. Durante la PCR, la sonda se hibrida con una secuencia del fragmento objetivo y se escinde por la actividad de las nucleasas 5' → 3' de la ADN polimerasa Z05 termoestable. Cuando se han liberado y separado el marcador emisor y el marcador silenciador, cesa el enmascaramiento (quenching) y la actividad fluorescente del marcador emisor experimenta un aumento. La amplificación del ARN del HIV-1 y el ARN del QS del HIV-1 se miden de forma independiente en distintas longitudes de onda. Este proceso se repite durante un número de ciclos predeterminado, aumentando en cada ciclo la intensidad de emisión de los marcadores emisores individuales, lo que permite la identificación independiente del ARN del HIV-1 y el ARN del QS del HIV-1. El ciclo de la PCR en el que la curva de crecimiento adquiere forma exponencial está relacionado con la cantidad de material de partida presente al inicio de la PCR.

### **Fundamentos de la cuantificación en una prueba COBAS® TaqMan®**

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, ofrece resultados cuantitativos de forma inherente en un rango dinámico muy amplio puesto que la supervisión del amplicón se realiza durante la fase exponencial de la amplificación. Cuanto más alto sea el título de HIV-1 de una muestra, antes se apreciará la fluorescencia del marcador emisor de la sonda del HIV-1 por encima del nivel de fluorescencia que constituye la línea de base (consulte la Ilustración 1). Puesto que la cantidad de ARN del QS del HIV-1 es la misma para todas las muestras, la fluorescencia del marcador emisor de la sonda del QS del HIV-1 debería aparecer en un ciclo similar para todas las muestras (consulte la Ilustración 2). En muestras en las que la fluorescencia del QS se vea afectada, la concentración se ajusta en consonancia. La aparición de las señales fluorescentes específicas se comunica como un valor umbral crítico (Ct). El Ct se define como el número de ciclo fraccional en el que la fluorescencia del marcador emisor supera un umbral predeterminado (el nivel de fluorescencia asignado) y comienza la fase de crecimiento exponencial de la señal (consulte la Ilustración 3). Los valores de Ct más altos indican un menor título del material del fragmento objetivo del HIV-1 inicial. Una duplicación del título se relaciona con una disminución de 1 Ct para el ARN del HIV-1 del fragmento objetivo, mientras que una disminución de 3,3 Ct se relaciona con un aumento de 10 veces del título.

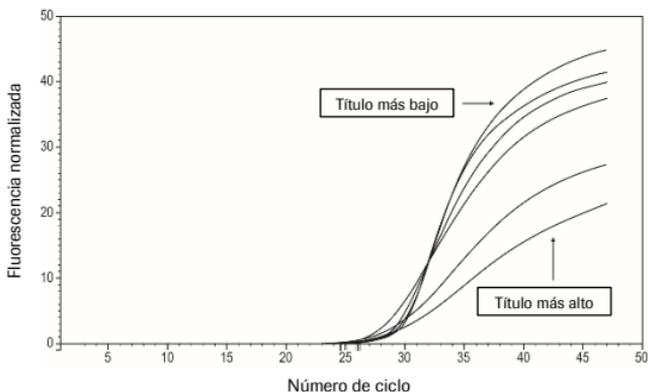
La Ilustración 1 muestra las curvas de crecimiento correspondientes al fragmento objetivo para una serie de dilución que abarca un intervalo de 5 unidades log<sub>10</sub>. A medida que aumenta la concentración del virus, las curvas de crecimiento se desplazan hacia ciclos más tempranos. Por lo tanto, la curva de crecimiento situada más a la izquierda corresponde al nivel de título vírico más alto, mientras que la situada más a la derecha corresponde al nivel de título vírico más bajo.

**Ilustración 1**  
**Curvas de crecimiento del fragmento objetivo para una serie de dilución con un intervalo de  $5 \log_{10}$**



La Ilustración 2 muestra las curvas de crecimiento correspondientes al estándar de cuantificación (QS) para las muestras de una serie de dilución del virus que abarca un intervalo de  $5 \log_{10}$ . La cantidad de estándar de cuantificación añadida a cada muestra es constante para cada reacción. El valor de Ct correspondiente al estándar de cuantificación es similar con independencia del título vírico.

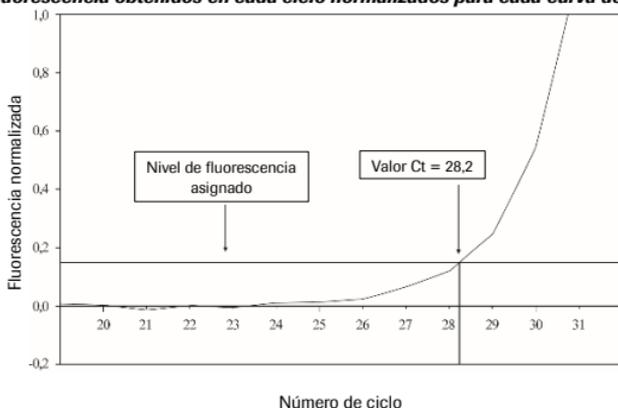
**Ilustración 2**  
**Curvas de crecimiento del estándar de cuantificación para una serie de dilución del virus que abarca un intervalo de  $5 \log_{10}$**



La Ilustración 3 constituye un ejemplo de la normalización de los valores de fluorescencia en cada ciclo de cada curva de crecimiento. El número de ciclo fraccional (Ct) se calcula como el punto donde la señal de fluorescencia intersecciona con el nivel de fluorescencia asignado.

### Ilustración 3

#### Valores de fluorescencia obtenidos en cada ciclo normalizados para cada curva de crecimiento



#### Cuantificación del ARN del HIV-1

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, cuantifica el ARN vírico del HIV-1 utilizando una segunda secuencia del fragmento objetivo (estándar de cuantificación del HIV-1) que se añade en una concentración conocida a cada muestra de prueba. El estándar de cuantificación del HIV-1 es un constructo de Armored RNA no infeccioso que contiene fragmentos de secuencias del HIV-1 con regiones de unión a cebadores idénticas a las de la secuencia objetivo del gen *gag* del HIV-1. El estándar de cuantificación del HIV-1 contiene regiones de unión a cebadores del HIV-1 y genera un producto de amplificación con la misma longitud y composición de bases que el ARN del fragmento objetivo del gen *gag* del HIV-1. La región de unión a la sonda de detección del QS del HIV-1 ha sido modificada para diferenciar el amplicón del QS del HIV-1 del amplicón objetivo del gen *gag* del HIV-1.

Durante la fase de annealing de la PCR en el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48, las muestras se iluminan y excitan con luz filtrada, lo que permite recoger los datos de emisión de fluorescencia filtrada correspondientes a cada muestra. Las lecturas obtenidas para cada muestra se corrigen entonces para compensar fluctuaciones instrumentales. El equipo envía esas lecturas de fluorescencia al programa AMPLILINK y las almacena en una base de datos. Se utilizan comprobaciones previas para determinar si los datos de ARN del HIV-1 y ARN del QS del HIV-1 constituyen conjuntos válidos y se generan avisos cuando los datos están fuera de los límites prefijados. Una vez completadas y superadas todas las comprobaciones previas, las lecturas de fluorescencia se procesan para generar valores de Ct correspondientes al ARN del HIV-1 y al ARN del QS del HIV-1. Se utilizan constantes de calibración específicas de lote incluidas con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, para calcular el valor de título de las muestras y los controles según los valores de Ct obtenidos para el ARN del HIV-1 y el ARN del QS del HIV-1. La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 está estandarizada con respecto a un estándar internacional de la OMS para el ARN del HIV-1. Los resultados de título se indican en copias/ml (cp/ml) o unidades internacionales (UI/ml). El factor de conversión entre el valor comunicado de cp/ml de ARN de HIV-1 y el valor en UI/ml de HIV-1 ha sido determinado por Roche Molecular Systems, Inc. como 0,6 cp/UI (1,67 UI/cp).

**REACTIVOS****COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0**

(P/N: 05212294 190)

**HI2CAP****48 pruebas****HIV-1 v2.0 CS1**

(Casete de reactivo de micropartículas magnéticas para HIV-1)

Micropartículas magnéticas

93% de isopropanol

**1 x 48 pruebas****HIV-1 v2.0 CS2**

(Casete de reactivo de lisis para HIV-1)

Citrato de sodio dihidratado

42,5% de tiocianato de guanidina

&lt; 14% de polidocanol

0,9% de ditiotreitol

**1 x 48 pruebas****HIV-1 v2.0 CS3**

Casete de multirreactivos para HIV-1 que contiene:

**Pase**

(Solución de proteinasa)

Tampón Tris

&lt; 0,05% de EDTA

Cloruro de calcio

Acetato de calcio

≤ 7,8% de proteinasa

Glicerol

1 x 3,8 ml

**EB**

(Tampón de elución)

Tampón TRIS base

0,2% de metilparabén

1 x 7,0 ml

**HIV-1 v2.0 CS4**

Casete de reactivo específico para la prueba HIV-1 que contiene:

**HIV-1 QS**

(Estándar de cuantificación del HIV-1)

Tampón Tris-HCl

EDTA

&lt; 0,005% de ARN poli Ar (sintético)

&lt; 0,001% de constructo de Armored RNA del HIV-1 que contiene secuencias de unión a cebadores del HIV-1 y una región exclusiva de unión a sonda (ARN no infeccioso en bacteriófago MS2)

0,05% de azida sódica

1 x 3,6 ml

**HIV-1 MMX**

(Master Mix para HIV-1)

Tampón tricina

Acetato de potasio

Hidróxido potásico

20% de dimetilsulfóxido

Glicerol

&lt; 0,04% de dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP

1 x 2,5 ml

- < 0,003% de cebadores ascendentes y descendente correspondientes a la región *gag* y la región LTR del HIV-1
- < 0,003% de aptámero oligonucleótido
- < 0,003% de sondas oligonucleótidas marcadas con fluorescente específicas para el HIV-1 y el estándar de cuantificación del HIV-1
- < 0,05% de ADN polimerasa Z05 (microbiana)
- < 0,1% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana)
- 0,09% de azida sódica

#### **CAP/CTM Mn<sup>2+</sup>**

1 x 19,8 ml

(Solución de manganeso para CAP/CTM)

- < 0,5% de acetato de manganeso
- Ácido acético glacial
- 0,09% de azida sódica

#### **HIV-1 H(+), v2.0**

4 x 1,0 ml

(Control positivo alto del HIV-1, v2.0)

- < 0,001% de constructo de Armored RNA de HIV-1 con secuencias de HIV-1 (ARN no infeccioso en bacteriófago MS2)
- Plasma humano negativo, no reactivo según pruebas para anticuerpos frente al HCV, anticuerpos frente al HIV-1/2, antígeno p24 del HIV y HBsAg; ARN de HIV-1, ARN de HCV y ADN de HBV no detectables mediante métodos basados en la PCR
- 0,1% de conservante ProClin® 300

#### **HIV-1 L(+), v2.0**

4 x 1,0 ml

(Control positivo bajo del HIV-1, v2.0)

- < 0,001% de constructo de Armored RNA de HIV-1 con secuencias de HIV-1 (ARN no infeccioso en bacteriófago MS2)
- Plasma humano negativo, no reactivo según pruebas para anticuerpos frente al HCV, anticuerpos frente al HIV-1/2, antígeno p24 del HIV y HBsAg; ARN de HIV-1, ARN de HCV y ADN de HBV no detectables mediante métodos basados en la PCR
- 0,1% de conservante ProClin® 300

#### **CTM (-) C**

4 x 1,0 ml

[Control negativo para COBAS® TaqMan® (plasma humano)]

- Plasma humano negativo, no reactivo según pruebas para anticuerpos frente al HCV, anticuerpos frente al HIV-1/2, antígeno p24 del HIV y HBsAg; ARN de HIV-1, ARN de HCV y ADN de HBV no detectables mediante métodos basados en la PCR
- 0,1% de conservante ProClin® 300

#### **HIV-1 H(+), v2.0 Clip**

1 x 4 clips

(Clip de código de barras para control positivo alto del HIV-1, v2.0)

**HIV-1 L(+)<sup>C</sup>, v2.0 Clip**

(Clip de código de barras para control positivo bajo del HIV-1, v2.0)

**1 x 4 clips****HIV-1 (-) C Clip**

(Clip de código de barras para control negativo del HIV-1, v2.0)

**1 x 4 clips****COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent**

(P/N: 03587797 190)

**PG WR****1 x 5,1 l****PG WR**

(Reactivo de lavado COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

Citrato de sodio dihidratado

&lt; 0,1% de N-metilisotiazolona-HCl

**COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Specimen****Pre-Extraction Reagent**

(P/N: 06989861190)

**SPEX****5 x 78 ml****SPEX**(Reactivo previo a la extracción de muestras **cobas®**)

42,5% de tiocianato de guanidina

0,79% de citrato de sodio

0,01% de ácido cítrico

3,6% de polidocanol

1,8% de ditiotreitolo

**Nota: este reactivo es opcional y únicamente debe utilizarse en combinación con la PSC para generar muestras de plasma seco. Consulte las instrucciones ms\_09411763190, correspondientes a la PSC.**

**ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

- A. **PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO.**
- B. Esta prueba está diseñada para su uso con plasma humano recogido en anticoagulante EDTA o muestras de plasma seco procedentes de **PSC**.
- C. No pipetee con la boca.
- D. No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo del laboratorio. Utilice guantes desechables, batas de laboratorio y protección ocular para manipular las muestras o los reactivos del kit. Lávese muy bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos de las pruebas.
- E. **Evite la contaminación microbiana y con ribonucleasa de los reactivos cuando extraiga alícuotas de los viales de control.**
- F. **Se recomienda la utilización de pipetas estériles desechables y puntas de pipetas sin ribonucleasa.**
- G. No mezcle controles de distintos lotes o de distintas botellas de un mismo lote.
- H. No mezcle casetes de reactivos o controles de distintos kits.
- I. No abra los casetes COBAS® AmpliPrep ni cambie, mezcle, retire o añada botellas.

- J. Elimine los reactivos no utilizados así como los desechos y las muestras según las reglamentaciones nacionales, federales, estatales y locales.
- K. No utilice ningún kit con posterioridad a la fecha de caducidad.
- L. Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.
- M. Las muestras y los controles deben tratarse como si fueran infecciosos, utilizando procedimientos de seguridad de laboratorio como los descritos en la publicación *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>38</sup> y en el documento M29-A3<sup>39</sup> del CLSI. Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo con una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5% en agua destilada o desionizada.

**Nota: la lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25%. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.**

**Nota: si se produce un derrame de muestras de plasma seco procedentes de una PSC en el cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPEX) (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.**

- N. **PRECAUCIÓN:** los controles **CTM (-) C, HIV-1 L(+)**C**, v2.0 y HIV-1 H(+)**C**, v2.0** contienen plasma humano derivado de sangre humana. El material de origen ha sido probado con resultado no reactivo para la presencia de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos frente al HIV-1/2 y al HCV, y antígeno p24 del HIV. En ensayos del plasma humano negativo mediante métodos basados en la PCR, no se detectó ARN del HIV-1, ARN del HCV ni ADN del HBV. Ningún método de prueba conocido puede garantizar totalmente que un producto derivado de la sangre humana no transmita agentes infecciosos. Por lo tanto, cualquier material de procedencia humana debe considerarse potencialmente infeccioso. Los controles **CTM (-) C, HIV-1 L(+)**C**, v2.0 y HIV-1 H(+)**C**, v2.0** deben tratarse como si fueran infecciosos, utilizando procedimientos de seguridad de laboratorio como los descritos en la publicación *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>38</sup> y en el documento M29-A3<sup>39</sup> del CLSI. Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo con una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5% en agua destilada o desionizada.
- O. Los reactivos **HIV-1 QS, CAP/CTM Mn<sup>2+</sup> y HIV-1 MMX** contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Cuando elimine soluciones que contengan azida sódica vertiéndolas en fregaderos de laboratorio, deje correr abundante agua para evitar la formación de depósitos de azida.
- P. Utilice guantes de laboratorio, batas de laboratorio y protección ocular cuando manipule cualquier reactivo. Evite el contacto de estos materiales con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua. Pueden producirse quemaduras si no se actúa adecuadamente. Si se derrama alguno de estos reactivos, dilúyalo con agua antes de limpiarlo con un paño.
- Q. No permita que el reactivo **HIV-1 v2.0 CS2, SPEX** (utilizado en el procedimiento de las muestras de plasma seco de una **PSC**) ni los residuos líquidos del instrumento COBAS® AmpliPrep, que contienen tiocianato de guanidina, entren en contacto con la solución de hipoclorito de sodio (lejía). Tales mezclas pueden producir gases muy tóxicos.
- R. El reactivo **SPEX** es sensible a la luz y se suministra en botellas con protección lumínica.
- S. Cuando deseche las cubetas de reacción (SPU) COBAS® AmpliPrep, que contienen tiocianato de guanidina, evite el contacto con soluciones de hipoclorito de sodio (lejía). Tales mezclas pueden producir gases muy tóxicos.

- T. Consulte la metódica de la **PSC** ms\_09411763190 para conocer las advertencias y precauciones adicionales.

## REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

- A. **No congele los reactivos ni los controles.**
- B. Antes de utilizarlos, revise cada casete y vial de reactivo para asegurarse de que no hay signos de fugas. No utilice el material si hay alguna evidencia de fuga.
- C. Almacene los reactivos **HIV-1 v2.0 CS1**, **HIV-1 v2.0 CS2**, **HIV-1 v2.0 CS3** y **HIV-1 v2.0 CS4** a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C. Si no se utilizan, estos reactivos se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez usados, los reactivos permanecen estables durante 28 días a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C o hasta la fecha de caducidad, lo que se produzca primero. Los reactivos **HIV-1 v2.0 CS1**, **HIV-1 v2.0 CS2**, **HIV-1 v2.0 CS3** y **HIV-1 v2.0 CS4** pueden utilizarse para un máximo de 4 ciclos instrumentales, hasta acumular un máximo de 64 horas totales en el instrumento COBAS® AmpliPrep. Entre ciclos instrumentales, los reactivos deben almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.
- D. Almacene los controles **HIV-1 H(+)**C, **v2.0**, **HIV-1 L(+)**C, **v2.0** y **CTM (-) C** a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C. Los controles se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abiertos, deben desecharse las partes sobrantes.
- E. Almacene los clips de código de barras [**HIV-1 H(+)**C, **v2.0 Clip**, **HIV-1 L(+)**C, **v2.0 Clip** y **HIV-1 (-) C Clip**] a una temperatura comprendida entre 2 y 30 °C.
- F. Almacene el reactivo **PG WR** a una temperatura comprendida entre 2 y 30 °C. **PG WR** se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abierto, este reactivo permanece estable durante 28 días a una temperatura comprendida entre 2 y 30 °C o hasta su fecha de caducidad, lo que se produzca primero.
- G. Conserve el reactivo **SPEX** (utilizado en el procedimiento de las muestras de plasma seco de una **PSC**) a una temperatura comprendida entre 2 y 8°C. **SPEX** permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abierto, este reactivo permanece estable durante 28 días a una temperatura comprendida entre 2 y 30 °C o hasta su fecha de caducidad, lo que se produzca primero.
- H. Los requisitos para el almacenamiento y la manipulación de la **PSC** se especifican en la metódica ms\_09411763190 de la **PSC**.

## MATERIALES SUMINISTRADOS

- A. **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0** (P/N: 05212294 190)

**HI2CAP**

### **HIV-1 v2.0 CS1**

(Casete de reactivos de micropartículas magnéticas para HIV-1)

### **HIV-1 v2.0 CS2**

(Casete de reactivos de lisis para HIV-1)

### **HIV-1 v2.0 CS3**

(Casete de multirreactivos para HIV-1)

### **HIV-1 v2.0 CS4**

(Casete de reactivos específico para la prueba HIV-1)

**HIV-1 H(+)**C**, v2.0**

(Control positivo alto del HIV-1, v2.0)

**HIV-1 L(+)**C**, v2.0**

(Control positivo bajo del HIV-1, v2.0)

**CTM (-) **C****

[Control negativo para COBAS® TaqMan® (plasma humano)]

**HIV-1 H(+)**C**, v2.0 Clip**

(Clip de código de barras para control positivo alto del HIV-1, v2.0)

**HIV-1 L(+)**C**, v2.0 Clip**

(Clip de código de barras para control positivo bajo del HIV-1, v2.0)

**HIV-1 (-) **C** Clip**

(Clip de código de barras para control negativo del HIV-1)

**B. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent**

(P/N: 03587797 190)

**PG WR**

**C. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Specimen Pre-Extraction Reagent**

(P/N: 06989861190)

**SPEX**

**MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS****Instrumentos y programa**

- Equipo COBAS® AmpliPrep
- Analizador COBAS® TaqMan® o analizador COBAS® TaqMan® 48
- Opcional: equipo **cobas p** 630
- Opcional: Docking Station
- Programa AMPLILINK versión 3.3 o versión 3.4 Series
- Unidad de control para el programa AMPLILINK, con impresora
- Manuales de equipo y software:
  - Manual del equipo COBAS® AmpliPrep para su uso con el programa AMPLILINK versión 3.3 y 3.4 Series
  - Manual del equipo del analizador COBAS® TaqMan® para su uso con el programa AMPLILINK versión 3.3 y 3.4 Series
  - Manual del equipo del analizador COBAS® TaqMan® 48 para su uso con el programa AMPLILINK versión 3.3 y 3.4 Series
  - Manual de aplicaciones del programa AMPLILINK versión 3.3 Series para uso con el equipo COBAS® AmpliPrep, el analizador COBAS® TaqMan®, el analizador COBAS® TaqMan® 48, el analizador COBAS® AMPLICOR® y el equipo **cobas p** 630
- 
- Manual de aplicaciones del programa AMPLILINK versión 3.4 Series
- Opcional: Manual de usuario del equipo **cobas p** 630, versión del programa 2.2
- Archivo de definiciones de pruebas (TDF). Consulte la tarjeta de información del producto del kit para conocer el nombre y la versión actual del TDF.

## Consumibles

- Cubetas de reacción: SPU
- Tubos para introducción de la muestra (tubos S) con clip de código de barras
- Bandejas de puntas K
- Caja de tubos K, 12 x 96

## OTROS MATERIALES NECESARIOS (SOLO PARA LA APLICACIÓN DE MUESTRAS DE PLASMA EN EDTA) NO SUMINISTRADOS

- Bandeja de muestras (bandeja de 24 tubos SK)
- Bandeja de reactivos
- Bandeja de SPU
- Taponador de tubos K, motorizado
- Taponador de tubos K
- Gradilla de tubos K
- Transportador de gradillas de tubos K
- Bandeja de gradillas de tubos K
- Pipetas con puntas exentas de RNasa con filtro para aerosol o desplazamiento positivo (capacidad de 1.000 µl)\*
- Guantes de laboratorio, sin polvo
- Agitador vórtex

\* La precisión de las pipetas debe estar dentro del 3% del volumen indicado. Para evitar la contaminación cruzada de la muestra y el amplicón, deben utilizarse puntas exentas de ribonucleasa con filtro para aerosol o desplazamiento positivo cuando así se especifique.

## OTROS MATERIALES Y CONSUMIBLES NECESARIOS (SOLO PARA LA APLICACIÓN DE MUESTRAS DE PLASMA SECO DE UNA PSC) NO SUMINISTRADOS

- **cobas**<sup>®</sup> Plasma Separation Card (P/N 07963084190 o P/N 09411763190)\*
- Fórceps o pinzas estériles o desechables\*\*
- Capilar de 140 µl (p. ej., tubo de plástico Vitrex) con dispensador compatible (p. ej., soporte para pipetas Vitrex)\*
- Dispositivo de punción de un solo uso (p. ej., Greiner Bio-One: MiniCollect<sup>®</sup> Safety Lancet, profundidad de penetración de 2,00 mm)\*
- Bolsa de muestras (de plástico transparente resellable con cierre hermético) y bolsas desecantes de gel de sílice (para un total de 4 gramos. Para obtener más información sobre el almacenamiento y la entrega de la **PSC**, consulte la metódica ms\_09411763190 de la **PSC**).
- Bolsa de transporte (p. ej., Wicoseal 180 x 60 x 240 mm)
- Pipeta (p. ej., pipeta Multistep<sup>®</sup>)
- Eppendorf Thermomixer<sup>®</sup> (p. ej., el modelo R 5355, C o equivalente) con termobloque para 24 criotubos

\* Consulte la metódica ms\_09411763190 de la **PSC** para obtener más información sobre la recogida de muestras en una **PSC**.

\*\* Para evitar la contaminación por arrastre, utilice únicamente un par de fórceps por paciente. Se recomienda utilizar fórceps de metal y esterilizarlos en un autoclave tras cada uso.

## OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PLASMA EN EDTA

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

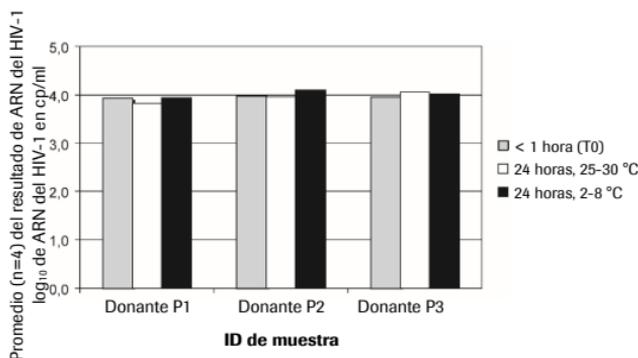
**Nota: esta prueba se ha validado únicamente para su uso con plasma humano recogido en anticoagulante EDTA o con muestras de plasma seco procedentes de una PSC. La realización de la prueba en otros tipos de muestras puede dar lugar a resultados inexactos.**

### A. Obtención de las muestras

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 ha sido concebida para su uso con muestras de plasma. La sangre debe recogerse en tubos estériles y utilizar EDTA como anticoagulante; posteriormente, debe mezclarse adecuadamente según las instrucciones del fabricante del tubo.

La sangre total debe conservarse a una temperatura comprendida entre 2 y 25 °C durante un período no superior a 24 horas. Separe el plasma de la sangre total en un plazo de 24 horas tras su recogida mediante centrifugación a entre 800 y 1.600 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transfiera el plasma a un tubo de polipropileno estéril. La ilustración 4 muestra los datos de estabilidad de las muestras obtenidos de los estudios de estabilidad de muestras realizados con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 (P/N: 03543005 190).

**Ilustración 4**  
**Estabilidad del HIV-1 en sangre entera (recogida en tubos de plasma con EDTA)**



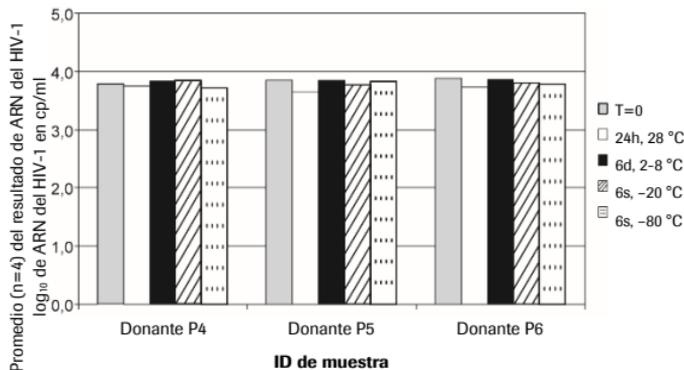
### B. Transporte de las muestras

El transporte de sangre entera o plasma debe cumplir las reglamentaciones locales, estatales, federales y nacionales para el transporte de agentes etiológicos<sup>40</sup>. La sangre total debe transportarse a una temperatura comprendida entre 2 y 25 °C y procesarse dentro de las 24 horas siguientes a su extracción. El plasma puede transportarse a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C o congelarse a una temperatura entre -20 y -80 °C.

### C. Almacenamiento de las muestras

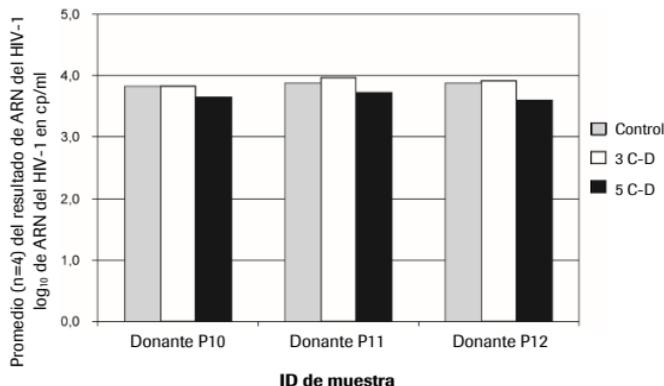
Las muestras de plasma pueden almacenarse a temperatura ambiente (25-30 °C) durante 1 día o a una temperatura comprendida entre 2-8 °C durante 6 días. Las muestras de plasma se mantienen estables durante seis semanas si se congelan a una temperatura comprendida entre -20 °C y -80 °C. Se recomienda almacenar las muestras en alícuotas de 1.100-1.200 µl depositadas en tubos de polipropileno estériles con tapones de rosca de 2,0 ml de capacidad (por ejemplo, los tubos Sarstedt 72.694.006). La ilustración 5 muestra los datos de estabilidad de las muestras obtenidos de los estudios de almacenamiento de muestras realizados con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 (P/N: 03543005 190).

**Ilustración 5**  
**Estabilidad del HIV-1 en plasma conservado en EDTA**



Las muestras de plasma se pueden congelar y descongelar hasta cinco veces sin que se produzca pérdida significativa de ARN del HIV-1. La ilustración 6 muestra los datos de congelación-descongelación obtenidos de los estudios realizados con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 (P/N: 03543005 190).

**Ilustración 6**  
**Resultados del HIV-1 después de cinco ciclos de congelación-descongelación (C-D)**  
**(plasma con EDTA)**



### RECOGIDA, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE PLASMA SECO EN PSC

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

***Nota: esta prueba se ha validado únicamente para su uso con plasma humano recogido en anticoagulante EDTA o con muestras de plasma seco procedentes de una PSC. La realización de la prueba en otros tipos de muestras puede dar lugar a resultados inexactos.***

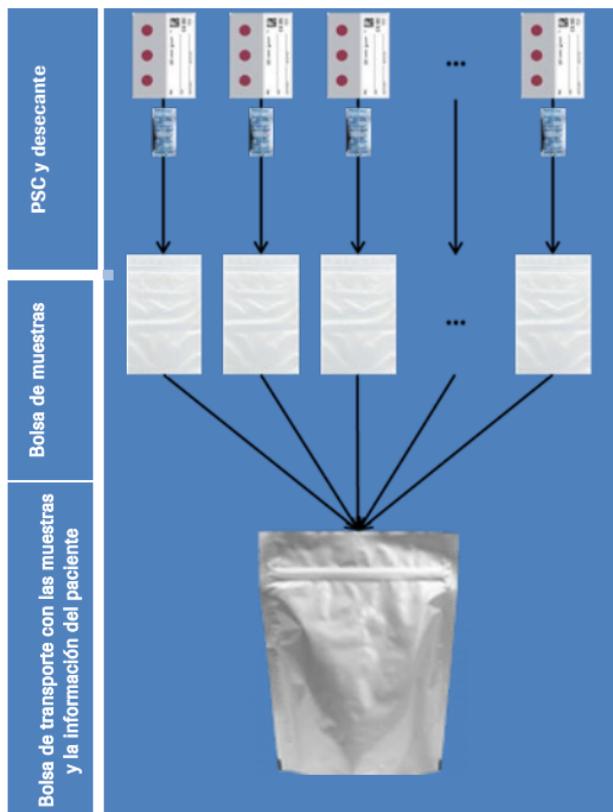
#### **A. Recogida de las muestras**

Las muestras de plasma seco en **PSC** se recogen mediante los procedimientos clínicos pertinentes. Antes de su uso, debe revisarse la fecha de caducidad de la **PSC**. Utilice la **PSC** únicamente si no está caducada y si la bolsa en la que está sellada la **PSC** está completamente cerrada e intacta. Etiquete la **PSC** con el nombre del paciente, su fecha de nacimiento y la fecha y hora de obtención de la muestra. Aplique 140 µl de sangre total en cada uno de los círculos de la membrana de la **PSC** delineados por la lámina de muestras mediante un capilar y un dispensador adecuados. Se recomienda rellenar las tres muestras de la **PSC** para posibilitar las repeticiones. No aplique muestras de más de un paciente en la misma **PSC**. Asegúrese de que **AMBAS** caras de las muestras de la **PSC** (frontal: membrana con sangre; posterior: muestra con plasma) están saturadas transcurridos 5 minutos. Compruebe la cara posterior a través de la lámina posterior transparente. No permita que las membranas entren en contacto con guantes, herramientas o cualquier superficie potencialmente contaminada durante este proceso.

Deje secar la **PSC** a temperatura ambiente durante 4 horas como mínimo (y como máximo durante toda la noche), protegiéndola de la luz solar directa. No retire la lámina de muestras. Este paso se realiza en el laboratorio. Tras el secado, guarde la **PSC** en una bolsa de muestras individual con 4 gramos de desecante y séllela (Ilustración 7). Las bolsas de muestras recogidas deben empaquetarse en una bolsa de transporte junto con las hojas informativas de paciente correspondientes. Se recomienda empaquetar un máximo de 25 **PSC** por bolsa de transporte.

## Ilustración 7

### Visión general del concepto de empaquetado para el transporte de PSC



#### B. Transporte de las muestras

Si las muestras se van a transportar, es recomendable empaquetarlas y etiquetarlas de acuerdo con la reglamentación estatal y/o internacional relativa al transporte de muestras y agentes etiológicos. Las bolsas de transporte con las **PSC** deben transportarse en el plazo de 28 días a una temperatura de 18-45 °C y con una humedad de hasta el 85%.

#### C. Almacenamiento de las muestras

Tras el transporte, las **PSC** en bolsas de muestras individuales con 4 gramos de desecante colocadas dentro de una bolsa de transporte pueden almacenarse a temperatura ambiente (18-30 °C), a 2-8 °C o a  $\leq -10$  °C durante un máximo de 56 días (con y sin separación de las láminas).

## INSTRUCCIONES DE USO

**Nota:** para obtener instrucciones detalladas sobre el funcionamiento, una descripción exhaustiva de las posibles configuraciones, la impresión de los resultados y la interpretación de los avisos, comentarios y mensajes de error, consulte: (1) el Manual del equipo COBAS® AmpliPrep para su uso con el programa AMPLILINK versión 3.3 y 3.4 Series; (2) el Manual del equipo del analizador COBAS® TaqMan® para su uso con el programa AMPLILINK versión 3.3 y 3.4 Series; (3) el Manual del analizador COBAS® TaqMan® 48 para su uso con el programa AMPLILINK versión 3.3 y 3.4 Series; (4) el Manual de aplicaciones del programa AMPLILINK versión 3.3 Series para su uso con el equipo COBAS® AmpliPrep, el analizador COBAS® TaqMan®, el analizador COBAS® TaqMan® 48, el analizador COBAS® AMPLICOR® y el equipo cobas p 630 o el Manual de aplicaciones del programa AMPLILINK versión 3.4 Series; (5) Opcional: Manual de usuario del equipo cobas p 630 versión del programa 2.2.

La información incluida en las partes A-C y F-J es genérica para ambos tipos de muestras (muestras de plasma conservado en EDTA y muestras de plasma seco en PSC). La parte D contiene información para la petición y la carga de muestras de plasma conservado en EDTA únicamente. La parte E contiene información para la petición y la carga de muestras de plasma seco en PSC únicamente.

### Tamaño del lote

Cada kit contiene reactivos suficientes para 48 pruebas, las cuales pueden efectuarse en lotes de 12 a 24 pruebas. En cada lote debe incluirse como mínimo un reactivo de cada control [CTM (-) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 e HIV-1 H(+)C, v2.0]; consulte el apartado "Control de calidad".

### Flujo de trabajo

La serie se debe iniciar en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48 durante los 120 minutos posteriores a la finalización de la preparación de las muestras y los controles.

**Nota:** no congele ni almacene muestras o controles procesados a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.

### Preparación de las muestras y los controles

**Nota:** si utiliza muestras congeladas, déjelas a temperatura ambiente hasta conseguir su completa descongelación y agítelas durante 3-5 segundos antes de usarlas. Los controles se deben extraer de su lugar de almacenamiento a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C con tiempo suficiente para que alcancen el equilibrio con la temperatura ambiente antes de su uso.

### Configuración del equipo COBAS® AmpliPrep

#### Parte A. Mantenimiento y cebado

- A1. El equipo COBAS® AmpliPrep está listo para su funcionamiento en modo Stand-by.
- A2. Encienda la unidad de control del programa AMPLILINK (**ON**). Prepárela tal como se indica a continuación:
  1. Inicie una sesión en el sistema operativo Microsoft Windows.
  2. Haga doble clic sobre el icono del programa AMPLILINK.
  3. Inicie una sesión en el programa AMPLILINK introduciendo el identificador de usuario y la contraseña asignados.

- A3. Compruebe el suministro de **PG WR** en la pantalla **Status** y repóngalo en caso necesario.
- A4. Lleve a cabo todas las tareas de mantenimiento que aparecen en la pestaña Due. El equipo COBAS® AmpliPrep procederá automáticamente al cebado del sistema.

#### **Parte B. Carga de casetes de reactivos**

**Nota:** *todos los casetes de reactivos se deben extraer de su lugar de almacenamiento a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C para cargarlos inmediatamente en el equipo COBAS® AmpliPrep y dejar que alcancen el equilibrio con la temperatura ambiente en el equipo durante al menos 30 minutos antes de proceder a procesar la primera muestra. No permita que los casetes de reactivos alcancen la temperatura ambiente fuera del equipo, ya que podría formarse condensación en las etiquetas de código de barras. En caso de aparecer condensación en las etiquetas de código de barras, no trate de eliminarla con un paño.*

- B1. Coloque **HIV-1 v2.0 CS1** en una bandeja de reactivos. Coloque **HIV-1 v2.0 CS2**, **HIV-1 v2.0 CS3** y **HIV-1 v2.0 CS4** en otra bandeja de reactivos distinta.
- B2. Cargue la bandeja de reactivos que contiene **HIV-1 v2.0 CS1** en la posición para bandejas **A** del equipo COBAS® AmpliPrep.
- B3. Cargue la bandeja de reactivos que contiene **HIV-1 v2.0 CS2**, **HIV-1 v2.0 CS3** y **HIV-1 v2.0 CS4** en la posición para bandejas **B**, **C**, **D** o **E** del equipo COBAS® AmpliPrep. (Consulte la tabla 1 para conocer información adicional.)

#### **Parte C. Carga de consumibles**

**Nota:** *determine el número de casetes de reactivos COBAS® AmpliPrep, cubetas de reacción (SPU), tubos de muestras (tubos S), puntas K y tubos K necesarios. Se necesita una SPU, un tubo S de entrada, una punta K y un tubo K por cada muestra o control.*

Hay múltiples configuraciones posibles de uso del equipo COBAS® AmpliPrep con el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48. Consulte la tabla 1 que se muestra a continuación como referencia. Según la configuración utilizada, cargue el número apropiado de bandejas de casetes de reactivos, bandejas de muestras con tubos S de entrada, bandejas de SPU, bandejas de puntas K, bandejas de tubos K y gradillas K en las bandejas de gradillas K en las respectivas posiciones de bandeja del equipo COBAS® AmpliPrep (consulte la Tabla 1 para obtener información adicional).

- C1. Coloque las SPU en las bandejas de SPU y cargue las bandejas en la posición de bandeja **J**, **K** o **L** del equipo COBAS® AmpliPrep.
- C2. Dependiendo de la configuración utilizada, cargue las bandejas llenas de tubos K en la posición de bandeja **M**, **N**, **O** o **P** del equipo COBAS® AmpliPrep.
- C3. Cargue las bandejas llenas de puntas K en la posición de bandeja **M**, **N**, **O** o **P** del equipo COBAS® AmpliPrep.
- C4. Para el flujo de trabajo 3 con el analizador COBAS® TaqMan® 48, cargue las gradillas de tubos K en las bandejas de gradillas de tubos K en la posición para bandejas **M** y **N** u **O** y **P** del equipo COBAS® AmpliPrep.

**Tabla 1**

**Posibles flujos de trabajo para utilizar el equipo COBAS® AmpliPrep con el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48**

Flujo de trabajo		Modo de transferencia al analizador COBAS® TaqMan® o al analizador COBAS® TaqMan® 48	Bandejas, transportadores y consumibles	Posición en el equipo COBAS® AmpliPrep
1	Equipo COBAS® AmpliPrep más Docking Station más analizador COBAS® TaqMan®	Transferencia automatizada de gradilla de tubos K	Tubos K en bandejas llenas de tubos K	M-P
			Puntas K en bandejas llenas de puntas K	M-P
			Tubos S de entrada con muestras y controles en bandejas de muestras	F-H
			SPU en bandejas de SPU	J-L
			CS1 en bandeja de casetes	A
			CS2, CS3, CS4 en bandeja de casetes	B-E
2	Equipo COBAS® AmpliPrep más analizador COBAS® TaqMan®	Transferencia manual de tubos K mediante bandejas de muestras en el analizador COBAS® TaqMan®	Tubos K en bandejas llenas de tubos K	M-P
			Puntas K en bandejas llenas de puntas K	M-P
			Tubos S de entrada con muestras y controles en bandejas de muestras	F-H
			SPU en bandejas de SPU	J-L
			CS1 en bandeja de casetes	A
			CS2, CS3, CS4 en bandeja de casetes	B-E
			<u>Una vez completado el procesamiento de las muestras:</u> tubos K en bandejas de muestras (listas para su transferencia manual)	Igual que arriba (F-H)
3	Equipo COBAS® AmpliPrep más analizador(es) COBAS® TaqMan® 48	Transferencia manual de gradilla de tubos K mediante bandeja(s) de gradillas de tubos K en el analizador COBAS® TaqMan® 48	Tubos K en bandejas de muestras	F-H
			Puntas K en bandejas llenas de puntas K	M-P
			Tubos S de entrada con muestras y controles en bandejas de muestras	F-H
			SPU en bandejas de SPU	J-L
			CS1 en bandeja de casetes	A
			CS2, CS3, CS4 en bandeja de casetes	B-E
			Gradilla de tubos K vacía con código de barras en bandeja de gradillas de tubos K	M-P
			<u>Una vez completado el procesamiento de las muestras:</u> tubos K en gradilla de tubos K en bandeja de gradillas de tubos K	Igual que arriba (M-P)

#### Parte D. Peticiones y carga de muestras: muestras de plasma conservadas en EDTA

- D1. Prepare las bandejas de muestras tal y como se indica a continuación: coloque un clip de etiqueta de código de barras en cada posición de la bandeja de muestras donde se vaya a colocar una muestra (en tubo S). Coloque uno de los clips de etiqueta de código de barras específicos para los controles [**CTM (-) C, HIV-1 L(+)+C, v2.0** y **HIV-1 H(+)+C, v2.0**] en cada posición de la bandeja de muestras donde se vaya a colocar los controles (en tubo S). Los clips de etiqueta de código de barras de los controles deben tener el mismo número de lote de control que los viales de control incluidos en el kit. Preste atención para asignar el control correcto a cada posición con el clip con código de barras apropiado. Coloque un tubo S de entrada en cada posición que contenga un clip de etiqueta de código de barras.
- D2. Con el programa AMPLILINK, seleccione el archivo de definiciones de pruebas (HI2CAP96 para el equipo COBAS® AmpliPrep más el analizador COBAS® TaqMan®, HI2CAP48 para el equipo COBAS® AmpliPrep más el analizador COBAS® TaqMan® 48), cree peticiones de muestra para cada una de las muestras y controles en la ventana **Orders**, carpeta **Sample**, y guarde para finalizar.
- D3. Asigne las peticiones de muestras y controles en las posiciones de bandeja de muestras en la carpeta **Sample Rack** de la ventana **Orders**. El número de bandeja de muestras debe corresponder a la bandeja preparada en el paso D1.
- D4. Imprima el informe **Sample Rack Order** para usarlo como hoja de trabajo.
- D5. Prepare las bandejas de muestras y controles en el área designada para la adición de muestras y controles, tal como sigue: Agite cada una de las muestras y los controles [**CTM (-) C, HIV-1 L(+)+C, v2.0** y **HIV-1 H(+)+C, v2.0**] de 3 a 5 segundos. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras y los controles.
- D6. Transfiera de 1.000 a 1.050 µl de cada muestra y control [[**CTM (-) C, HIV-1 L(+)+C, v2.0** y **HIV-1 H(+)+C, v2.0**] al tubo S de entrada con la etiqueta de código de barras apropiada utilizando para ello un micropipeteador con punta sin ribonucleasa y filtro para aerosol o desplazamiento positivo. **Evite la transferencia de partículas o coágulos de fibrina que pudieran estar presentes en la muestra original al tubo S de entrada.** Las muestras y los controles se deben transferir a las posiciones de tubo asignadas y registradas en la hoja de trabajo en el paso D4. Los clips de etiqueta de código de barras de los controles deben tener el mismo número de lote de control que los viales de control incluidos en el kit. Asigne cada control correctamente a la posición que tenga el clip con código de barras apropiado. **Evite la contaminación de la parte superior de los tubos S con muestras o controles.** Si utiliza el equipo **cobas p 630** para la preparación de muestras, consulte el Manual de usuario del equipo **cobas p 630**.
- D7. Para los flujo de trabajo 1 y 2, cargue las bandejas de muestras llenas de tubos S de entrada en las posiciones de bandeja **F, G o H** del equipo COBAS® AmpliPrep.
- D8. Para el flujo de trabajo 3 mediante el analizador COBAS® TaqMan® 48, cargue las bandejas de muestras con tubos S de entrada o tubos K (uno por cada tubo S de entrada, cargados en la posición derecha adyacente a los tubos S de entrada) en la posición de bandeja **F, G o H** del equipo COBAS® AmpliPrep.

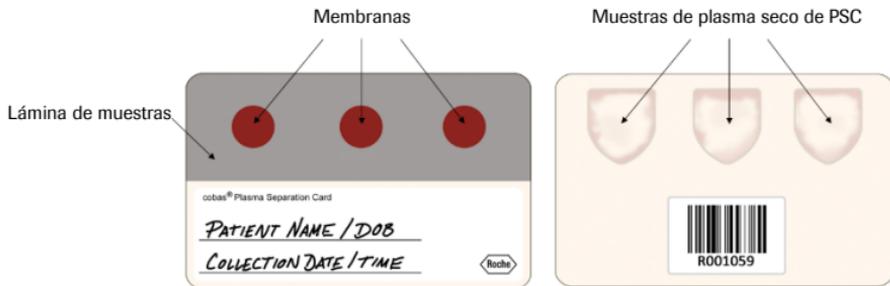
## Parte E. Peticiones y carga de muestras: muestras de plasma seco en PSC

- E1. Compruebe la integridad de la bolsa de transporte antes de abrirla. Siga con el procedimiento únicamente si la bolsa de transporte está completamente cerrada.

Abra la bolsa de transporte y proceda con cada bolsa de muestras únicamente si:

- El formulario de solicitud del laboratorio está totalmente cumplimentado.
- Los códigos de barras del formulario de solicitud del laboratorio y la **PSC** coinciden.
- La bolsa de muestras está completamente cerrada y contiene una **PSC** con 4 gramos de desecante.
- La fecha de recogida de las muestras está disponible y tuvo lugar durante los últimos 28 días y antes de la fecha de caducidad de la **PSC**.
- La **PSC** no está caducada.
- La muestra de plasma seco de la **PSC** parece homogénea en la cara frontal y completamente cubierta de plasma si se observa desde la parte posterior (consulte la Ilustración 8).

**Ilustración 8**  
**Muestras de plasma seco de PSC para procesar**  
(izquierda: parte frontal. Derecha: parte posterior)

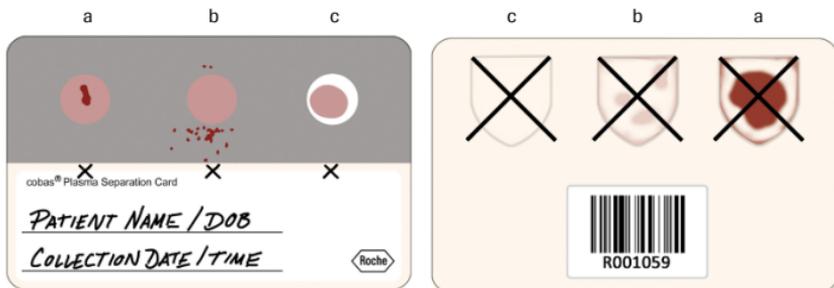


- E2. Es necesario marcar y rechazar las muestras de plasma seco de **PSC** si:
- Hay derrames de sangre visibles (Ilustración 9b) y/o la membrana no está totalmente cubierta de sangre (Ilustración 9c) y, por lo tanto, la **PSC** no presenta un área frontal homogénea y/o la cara posterior no está completamente cubierta con plasma (visible a través del transportador).
  - La membrana está dañada (Ilustración 9a) y, por lo tanto, la muestra de la **PSC** no presenta un área frontal homogénea y muestra una cara posterior entre rojo oscuro y marrón (visible a través del transportador).

**Nota: las tres muestras permiten realizar repeticiones de la prueba. Una PSC puede incluir una muestra errónea pero seguir proporcionando una buena muestra para el análisis. Marque adecuadamente las muestras erróneas para poder reconocerlas. Evite marcarlas en la lámina de muestras. Compare siempre las tres muestras entre ellas para valorar su calidad.**

### Ilustración 9

**Criterios de rechazo de las PSC (izquierda: cara frontal; derecha: parte posterior). Las muestras con derrames de sangre (b), membrana parcialmente sin cubrir (c) o membrana visiblemente dañada (a) no deben procesarse. Las muestras deben marcarse claramente cuando se rechazan.**



- E3. Prepare las bandejas de muestras tal y como se indica a continuación: coloque un clip de etiqueta de código de barras en cada posición de la bandeja de muestras donde se vaya a colocar una muestra (en tubo S). Coloque uno de los clips de etiqueta de código de barras específicos para los controles [CTM (-) C, HIV-1 L(+ )C, v2.0 y HIV-1 H(+ )C, v2.0] en cada posición de la bandeja de muestras donde se vayan a colocar los controles (en tubo S). Los clips de etiqueta de código de barras de los controles deben tener el mismo número de lote de control que los viales de control incluidos en el kit. Preste atención para asignar el control correcto a cada posición con el clip con código de barras apropiado. Coloque un tubo S de entrada en cada posición que contenga un clip de etiqueta de código de barras.
- E4. Con el programa AMPLILINK, seleccione el archivo de definiciones de pruebas adecuado (HI2PSC96 para el equipo COBAS® AmpliPrep más el analizador COBAS® TaqMan®, HI2PSC48 para el equipo COBAS® AmpliPrep más el analizador COBAS® TaqMan® 48), cree peticiones de muestra para cada una de las muestras y controles en la ventana **Orders**, carpeta **Sample**, y guarde para finalizar.
- E5. Asigne las peticiones de muestras y controles en las posiciones de bandeja de muestras en la carpeta **Sample Rack** de la ventana **Orders**. El número de bandeja de muestras debe corresponder a la bandeja preparada en el paso E1. El código de barras del paciente de la parte posterior de la **PSC** puede escanearse a través de la bolsa de muestras (Ilustración 10). No abra la bolsa de muestras en este momento y guarde para finalizar.

**Ilustración 10**  
**Escaneado del código de barras de la muestra**  
**para realizar peticiones de muestras de plasma seco en PSC**



- E6. Imprima el informe **Sample Rack Order** para utilizarlo como hoja de trabajo y vuelva a verificar que está utilizando el archivo de pruebas adecuado.
- E7. Realice los pasos del E7 al E11 en una cabina de seguridad. Abra la bolsa de muestras de la **PSC** seleccionada y retire la lámina de muestras (Ilustración 11). Doble ligeramente la **PSC** y extraiga una muestra de plasma seco con fórceps o pinzas estériles tirando de ella hacia arriba. Doble la muestra de plasma seco extraída en la **PSC** para facilitar la inserción del tubo (Ilustración 12).

**Ilustración 11**  
**Retirada de la lámina de muestras**



**Ilustración 12**  
**Extracción y doblado de la muestra de plasma seco de la PSC**



**Nota:** *utilice un par de fórceps o pinzas por paciente.*

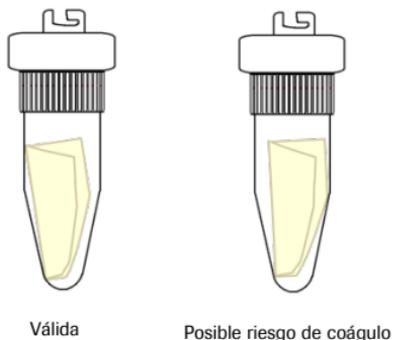
- E8. Transfiera una muestra de plasma seco de la **PSC** previamente doblada al tubo S de entrada correspondiente de forma que la punta inferior de la muestra de plasma seco de la **PSC** toque el fondo del tubo y se adhiera a la pared del tubo para evitar errores de pipeteo (Ilustración 13 e Ilustración 14).

**Nota:** las muestras de plasma seco pueden volverse frágiles tras su almacenamiento. Consulte los requisitos de almacenamiento para las PSC. Manipúlelas con cuidado al introducirlas en el tubo.

**Ilustración 13**  
**Transferencia de la muestra de plasma seco de la PSC al tubo**



**Ilustración 14**  
**Mejor posición de la muestra de plasma seco de la PSC en el tubo S**



**Nota:** asegúrese de que el número de posición del tubo S de entrada en el informe "Sample Rack Order" es el mismo que el de la posición de la bandeja SK24.

- E9. Vuelva a colocar la **PSC** con las muestras de plasma seco restantes en su bolsa de muestras original con 4 gramos de desecante nuevo para repetir el análisis, en caso necesario (Ilustración 15). Las **PSC** pueden almacenarse durante un periodo de 56 días después del transporte con o sin separación de lámina de muestras (a 18-30 °C, a 2-8 °C o a ≤ -10 °C).

**Ilustración 15**  
**PSC en bolsa de muestras para posible repetición**



- E10. Cierre el tubo S de entrada y transfiera el tubo que contiene la muestra de plasma seco de **PSC** a la posición 4-24 de bandeja SK24 (para obtener información más detallada, consulte la Tabla 2). Repita este paso hasta procesar todas las muestras.

**Nota:** *permíta que SPEX alcance la temperatura ambiente antes del uso.*

- E11. Abra los tubos S individualmente, guarde el tapón en un lugar limpio y añada 1.100 µl de reactivo **SPEX** a cada tubo S de entrada (Ilustración 16). Vuelva a tapar el tubo S de entrada. Repita este paso hasta procesar todas las muestras.

**Ilustración 16**  
**1.100 µl de SPEX añadidos a cada muestra de plasma seco en PSC**



**Nota:** *evite contaminar la parte superior de los tubos S de entrada con las muestras y asegúrese de que los tubos están tapados correctamente para evitar la evaporación.*

- E12. Transfiera los tubos S de entrada a un equipo Eppendorf Thermomixer e incube los tubos S de entrada preparados a 56 °C y 1.000 rpm de agitación continua durante 10 minutos para extraer el virus del plasma seco (Ilustración 17).

**Ilustración 17**  
**Incubación durante 10 minutos**



**Nota:** *inicie la incubación inmediatamente después de incorporar el SPEX.*

E13. Durante el tiempo de incubación, prepare los controles de la siguiente forma.

**Nota:** *no incube los controles.*

Coloque un tubo S de entrada en cada posición (de la 1 a la 3) de la bandeja SK24 preparada que contenga un clip de etiqueta de código de barras de control.

Mezcle 1 vial del control **CTM (-) C** vigorosamente durante 20 segundos mediante un agitador vórtex. Transfiera 1.000 µl del control **CTM (-) C** al tubo S de entrada 1 de la bandeja SK24. Vuelva a tapar este tubo S de entrada inmediatamente.

Mezcle 1 vial del control **HIV-1 L(+ )C, v2.0** vigorosamente durante 20 segundos mediante un agitador vórtex. Transfiera 1.000 µl del control **HIV-1 L(+ )C, v2.0** al tubo S de entrada 2 de la bandeja SK24. Vuelva a tapar este tubo S de entrada inmediatamente.

Mezcle 1 vial del control **HIV-1 H(+ )C, v2.0** vigorosamente durante 20 segundos mediante un agitador vórtex. Transfiera 1.000 µl del control **HIV-1 H(+ )C, v2.0** al tubo S de entrada 3 de la bandeja SK24. Vuelva a tapar este tubo S de entrada inmediatamente.

**Tabla 2**  
**Petición y carga de muestras de plasma seco en PSC**

<b>Muestra</b>	<b>Posición de petición en AMPLILINK</b>	<b>Posición en Eppendorf IsoRack</b>	<b>Posición en bandeja SK24</b>
Muestra	Tubo S de entrada	Tubo S de entrada	Tubo S de entrada
CTM(-)C	1	Vacía	1
HIV-1 L(+ )C, v2.0	2	Vacía	2
HIV-1 H(+ )C, v2.0	3	Vacía	3
Muestra de plasma seco en <b>PSC</b> + 1.100 µl de SPEX	4-24	4-24	4-24

E14. Después de la incubación, transfiera las muestras en el orden correcto a la bandeja SK24 que contiene los controles (paso E13) (para obtener más detalles, consulte la Tabla 2).

**Nota:** *compruebe que la posición de la muestra de plasma seco de la PSC en el tubo sigue siendo correcta (Ilustración 14) y ajústela con una punta de pipeta estéril en caso necesario. Si hay burbujas, elimínelas con una punta de pipeta estéril.*

E15. Cargue las bandejas de muestras llenas de tubos S de entrada en las posiciones de bandeja **F, G o H** del equipo COBAS® AmpliPrep.

#### **Parte F. Inicio de la serie en el equipo COBAS® AmpliPrep**

F1. Inicie el equipo COBAS® AmpliPrep mediante el programa AMPLILINK.

#### **Parte G. Finalización de la serie en el equipo COBAS® AmpliPrep y transferencia al analizador COBAS® TaqMan® o al analizador COBAS® TaqMan® 48 (únicamente para los flujos de trabajo 2 y 3 de la Tabla 1)**

G1. Compruebe si hay algún aviso o mensaje de error.

G2. Retire las muestras y los controles procesados del equipo COBAS® AmpliPrep, bien en las bandejas de muestras (para el analizador COBAS® TaqMan® sin Docking Station) o en bandejas de gradillas de tubos K (para el analizador COBAS® TaqMan® 48), dependiendo del flujo de trabajo. Encontrará más información en la Parte G.

G3. Elimine los residuos del equipo COBAS® AmpliPrep.

**Nota:** *las muestras y los controles procesados no deben exponerse a la luz tras finalizar su preparación.*

#### **Amplificación y detección**

##### **Configuración del analizador COBAS® TaqMan® o del analizador COBAS® TaqMan® 48**

La serie se debe iniciar en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48 durante los 120 minutos posteriores a la finalización de la preparación de las muestras y los controles.

**Nota:** *no congele ni almacene muestras o controles procesados a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.*

#### **Parte H. Carga de muestras procesadas**

H1. Dependiendo del flujo de trabajo, lleve a cabo los pasos apropiados para transferir los tubos K al analizador COBAS® TaqMan® o al analizador COBAS® TaqMan® 48:

*Flujo de trabajo 1:* Transferencia automatizada de la gradilla de tubos K, a través de la Docking Station, al analizador COBAS® TaqMan®. No se requiere intervención manual.

*Flujo de trabajo 2:* Transferencia manual de tubos K en bandejas de muestras al analizador COBAS® TaqMan®.

*Flujo de trabajo 3:* Transferencia manual de gradilla de tubos K en las bandejas de gradillas de tubos K al analizador COBAS® TaqMan® 48. Transferencia manual de las gradillas de tubos K al analizador COBAS® TaqMan® 48 mediante el transportador de gradillas de tubos K.

**Parte I. Inicio de la serie en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48**

- I1. Inicie el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48 usando una de las opciones que se ofrecen a continuación en función del flujo de trabajo utilizado:

*Flujo de trabajo 1:* No se requiere intervención.

*Flujo de trabajo 2:* Inicio automático del analizador COBAS® TaqMan® tras la introducción de las bandejas de muestras.

*Flujo de trabajo 3:* Llene la gradilla de tubos K con tubos K vacíos si hay menos de 6 tubos K en la gradilla de tubos K. El programa AMPLILINK guía el proceso de llenado. Abra la cubierta del termociclador, cargue la gradilla de tubos K en él y cierre la cubierta. Inicie la serie en el analizador COBAS® TaqMan® 48.

**Parte J. Finalización de la serie en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48**

- J1. Una vez completada la serie en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48, imprima el informe de resultados. Compruebe que se ha utilizado el archivo de definiciones de pruebas adecuado y revise si se han generado avisos o mensajes de error en el informe de resultados. Los resultados obtenidos para muestras con avisos y comentarios se interpretan tal como se describe en el apartado "Resultados". Una vez aceptados los datos, guárdelos en un archivo.
- J2. Retire los tubos K usados del analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48.

## RESULTADOS

El analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48 determina automáticamente la concentración de ARN del HIV-1 presente en las muestras y los controles. **La concentración de ARN del HIV-1 se expresa en cp/ml o UI/ml, según el archivo de definiciones de pruebas (TDF) utilizado. El factor de conversión entre cp/ml de ARN de HIV-1 y UI/ml de HIV-1 es de 0,6 cp/UI, valor obtenido utilizando el primer estándar internacional de la OMS para ARN de HIV-1 en técnicas basadas en ácidos nucleicos (NAT) (NIBSC 97/656)<sup>37</sup>. Para determinar este factor de conversión, se utilizó la prueba COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 y la prueba COBAS® TaqMan® HIV-1 para uso con el sistema High Pure.**

### El programa AMPLILINK:

- Determina el valor de ciclo umbral (Ct) correspondiente al ARN del HIV-1 y al ARN del estándar de cuantificación del HIV-1.
- Determina la concentración de ARN del HIV-1 según los valores de Ct calculados para ARN del HIV-1 y ARN del QS del HIV-1 y los coeficientes de calibración específicos del lote incluidos en los códigos de barras de los casetes.
- Determina si las cp/ml calculadas para **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** y **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** están dentro de los intervalos asignados.

### Validación de lotes: AMPLILINK versión 3.3 y versión 3.4 Series

Compruebe los posibles avisos y comentarios en la ventana de resultados del programa AMPLILINK o la impresión de resultados para asegurarse de que el lote es válido. Para peticiones de control, se realiza una comprobación para determinar si el valor en cp/ml o UI/ml correspondiente al control está dentro del intervalo especificado. Si el valor en cp/ml o UI/ml correspondiente al control está fuera del intervalo asignado, se genera un aviso para indicar que el control no ha superado la prueba.

El lote es válido si no hay ningún aviso para los controles [**HIV-1 L(+)**C**, v2.0**; **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** y **CTM (-) C**].

El lote no es válido si aparece cualquiera de los avisos siguientes para los controles del HIV-1:

#### Control negativo

Aviso	Resultado	Interpretación
NC_INVALID	Invalid	Un resultado no válido o un resultado "válido" que no fue negativo para el fragmento objetivo del HIV-1

#### Control positivo bajo del HIV-1, v2.0

Aviso	Resultado	Interpretación
LPCINVALID	Invalid	Resultado no válido o control fuera del intervalo

#### Control positivo alto del HIV-1, v2.0

Aviso	Resultado	Interpretación
HPCINVALID	Invalid	Resultado no válido o control fuera del intervalo

Si el lote no es válido, repita todo el lote incluyendo los pasos de preparación, amplificación y detección de las muestras y los controles.

### Interpretación de los resultados

Para lotes válidos, compruebe los posibles avisos o comentarios asociados a cada muestra en la impresión de los resultados. Interprete los resultados de la siguiente manera:

- Un lote válido puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos según los avisos y/o comentarios asociados a cada una de las muestras.

### Los resultados de las muestras se interpretan como se indica a continuación:

	Resultado del título	Interpretación
	Target Not Detected	El valor de Ct del HIV-1 está por encima del límite del ensayo o no se ha obtenido un valor de Ct para el HIV-1. Comuníquese los resultados como "ARN del HIV-1 no detectado".
Copias/ml	< 2,00E+01 cp/ml (Plasma)  < 738 cp/ml ( <b>PSC</b> )	Las cp/ml calculadas están por debajo del límite de detección del ensayo. Comuníquese los resultados como "ARN del HIV-1 detectado, menos de 20 cp/ml de ARN del HIV-1" para plasma y "ARN del HIV-1 detectado, menos de 738 cp/ml de ARN del HIV-1" para <b>PSC</b> .
	≥ 2,00E+01 cp/ml y ≤ 1,00E+07 cp/ml (Plasma)  ≥ 738 cp/ml y ≤ 1,00E+07 cp/ml ( <b>PSC</b> )	Los resultados calculados superiores o iguales a 20 cp/ml e inferiores o iguales a 1,00E+07 cp/ml se encuentran dentro del intervalo lineal del ensayo utilizado con plasma.  Los resultados calculados superiores o iguales a 738 cp/ml e inferiores o iguales a 1,00E+07 cp/ml se encuentran dentro del intervalo lineal del ensayo utilizado con la <b>PSC</b> .
	> 1,00E+07 cp/ml (Plasma y <b>PSC</b> )	Las cp/ml calculadas están por encima del intervalo del ensayo. Comuníquese los resultados como "más de 1,00E+07 cp/ml de ARN del HIV-1". Si se desea obtener un resultado cuantitativo, debe diluir la muestra original en una proporción 1:100 con plasma humano negativo para HIV-1 recogido en EDTA y repetir la prueba. Multiplique el resultado comunicado por el factor de dilución.
Unidades internacionales/ml	< 3,34E+01 UI/ml (Plasma)	Las UI/ml calculadas están por debajo del límite de detección del ensayo. Comuníquese los resultados como "ARN del HIV-1 detectado, menos de 33,4 UI/ml de ARN del HIV-1" para plasma.
	≥ 3,34E+01 UI/ml y ≤ 1,67E+07 UI/ml (Plasma)	Los resultados calculados superiores o iguales a 33,4 UI/ml e inferiores o iguales a 1,67E+07 UI/ml se encuentran dentro del intervalo lineal del ensayo utilizado con plasma.
	> 1,67E+07 UI/ml (Plasma)	Las UI/ml calculadas están por encima del intervalo del ensayo. Comuníquese los resultados como "más de 1,67E+07 UI/ml de ARN del HIV-1". Si se desea obtener un resultado cuantitativo, debe diluir la muestra original en una proporción 1:100 con plasma humano negativo para HIV-1 recogido en EDTA y repetir la prueba. Multiplique el resultado comunicado por el factor de dilución.

**Nota: las muestras cuya concentración esté por encima del intervalo del ensayo y que generen un resultado no válido con el aviso "QS\_INVALID" no deberían notificarse como > 1,00E+07 cp/ml ni 1,67E+07 UI/ml. La muestra original debería diluirse con plasma humano negativo para HIV-1 recogido en EDTA con una concentración de 1:100 y debería repetirse la prueba. Multiplique el resultado comunicado por el factor de dilución.**

**Nota: resultado del título “Failed”. Interpretación: la muestra no se ha procesado correctamente durante su preparación en el equipo COBAS® AmpliPrep.**

**Nota: resultado del título “Invalid”. Interpretación: el resultado no es válido.**

## **CONTROL DE CALIDAD**

En cada lote de prueba se debe incluir un **CTM (-) C**, un **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** y un **HIV-1 H(+)**C**, v2.0**. El lote es válido si no hay ningún aviso para los controles [**HIV-1 L(+)**C**, v2.0**, **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** y **CTM (-) C**].

Compruebe la impresión de avisos y comentarios del lote para asegurarse de que el lote es válido.

### **Control negativo**

El control **CTM (-) C** debe arrojar un resultado “Target Not Detected”. Si el resultado obtenido para **CTM (-) C** está marcado como no válido, se considerará no válida la totalidad del lote. Repita todo el proceso (preparación, amplificación y detección de muestras y controles). Si el resultado obtenido para **CTM (-) C** es repetidamente no válido en múltiples lotes, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

### **Controles positivos**

El intervalo de título asignado a **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** y **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** es específico para cada lote de reactivos y está incluido en los códigos de barras de los casetes de reactivos para la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Los valores en cp del ARN del HIV-1 por ml obtenidos para **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** y **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** deben estar dentro de los respectivos intervalos de títulos asignados. Si uno o ambos controles positivos tienen el aviso de no válido, todo el lote será no válido. Repita todo el proceso (preparación, amplificación y detección de muestras y controles). Si el título de ARN del HIV-1 calculado de uno o ambos controles positivos está repetidamente fuera de los intervalos asignados en varios lotes, póngase en contacto con su oficina local de Roche para obtener asistencia técnica.

## **PRECAUCIONES DEL PROCEDIMIENTO**

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, resulta esencial aplicar una técnica adecuada de laboratorio para obtener un rendimiento correcto del ensayo.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Esta prueba se ha validado para su uso con plasma humano recogido en anticoagulante EDTA únicamente. La realización de la prueba en otros tipos de muestras puede dar lugar a resultados inexactos.
2. El rendimiento de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 no ha sido evaluado con muestras que contengan el grupo N del HIV-1 ni con muestras que contengan el HIV-2.
3. La obtención de resultados fiables depende de que los procedimientos de obtención, transporte y almacenamiento de las muestras, así como su procesamiento, sean adecuados.
4. La presencia de la enzima AmpErase en la mezcla maestra para la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 reduce el riesgo de contaminación del amplicón. No obstante, la contaminación procedente de controles y muestras clínicas positivas para HIV-1 solo puede evitarse mediante la aplicación de las prácticas de laboratorio recomendadas y la estricta adhesión a los procedimientos especificados en este boletín técnico.
5. El uso de este producto debe limitarse a personal con experiencia en el empleo de técnicas de PCR.
6. Este producto sólo puede ser usado con el equipo COBAS® AmpliPrep y los analizadores COBAS® TaqMan® o COBAS® TaqMan® 48.
7. Aunque es poco probable, las mutaciones en las regiones muy conservadas del genoma vírico cubierta por los cebadores y/o las sondas de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pueden causar una cuantificación a la baja del virus o incluso impedir su detección.
8. La detección del ARN del HIV-1 depende del número de partículas víricas presentes en la muestra y se puede ver afectada por los métodos de obtención de las mismas y factores propios del paciente (como la edad o la presencia de síntomas y/o la fase de infección). Si bien la especificidad clínica de la prueba es del 99,3% (IC del 95% = entre 98,2% y 99,8%), se han observado algunos resultados de falsos positivos con concentraciones bajas en sujetos negativos para el HIV.
9. 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.

## SUSTANCIAS INTERFERENTES

Se ha demostrado que los niveles elevados de triglicéridos (hasta 3.500 mg/dl), bilirrubina (hasta 28 mg/dl), albúmina (hasta 8.900 mg/dl), hemoglobina (hasta 900 mg/dl) y ADN humano (hasta 0,4 mg/dl) en las muestras, así como la presencia de enfermedades autoinmunes o sus respectivos marcadores como lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR) o anticuerpos antinucleares (ANA), no interfieren en la cuantificación del ARN del HIV-1 ni afectan a la especificidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. La evaluación se realizó de acuerdo con la directriz EP7-A2 del CLSI utilizando un lote de reactivos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Los siguientes compuestos farmacológicos analizados en concentraciones 3 veces superiores al nivel de plasma máximo (Cmax) han demostrado no interferir en la cuantificación de ARN del HIV-1 ni afectar a la especificidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0:

<b>Fármacos para el HIV:</b>	
<b>Inhibidores de la proteasa</b> Atazanavir Darunavir Fosamprenavir Lopinavir/Ritonavir Nelfinavir mesylate Ritonavir Saquinavir Tipranavir	<b>Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos</b> Abacavir sulfate Didanosina, ddl Emtricitabina Lamivudina, 3TC Stavudina, 4dT Tenofovir DF Zidovudina
<b>Inhibidor de la integrasa</b> Raltegravir	<b>Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos</b> Efavirenz Nevirapina
<b>Inhibidor de entrada</b> Maraviroc	<b>Inhibidor de fusión</b> Enfuvirtide
<b>Fármacos para el HBV y/o HCV:</b>	
<b>Análogo nucleotídico</b> Adefovir dipivoxil	<b>Análogos nucleósidos</b> Entecavir Telbivudina
<b>Moduladores del sistema inmunológico</b> Peginterferón $\alpha$ -2a Peginterferón $\alpha$ -2b Ribavirina	
<b>Compuestos para el tratamiento de los virus del herpes:</b>	
<b>Análogo nucleotídico</b> Aciclovir	<b>Derivado de nucleótido</b> Ganciclovir Valganciclovir HCl

## EVALUACION NO CLINICA DEL RENDIMIENTO

### Características clave de rendimiento para muestras de plasma conservado en EDTA

#### A. Límite de detección

El límite de detección de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 se determinó mediante el análisis del 2º estándar internacional de la OMS sobre el ARN del HIV-1, código NIBSC 97/650<sup>42</sup>, subtipo B del HIV-1, diluido en plasma humano con EDTA negativo para HIV-1. El límite de detección se determinó para tres lotes de reactivos. Para cada lote de reactivos se analizaron tres series de dilución. En total se analizaron aproximadamente 126 réplicas por nivel de concentración. La evaluación se realizó de acuerdo con la directriz EP17-A del CLSI.

La concentración de ARN del HIV-1 que se puede detectar con una tasa de positividad superior al 95%, según análisis PROBIT, es de 20 cp/ml o 33 UI/ml. Los resultados de los lotes individuales fueron de 17,7 cp/ml (intervalo de confianza del 95%: 13,7-26,9 cp/ml) para el lote 1; 17,0 cp/ml (intervalo de confianza del 95%: 14,0-22,6 cp/ml) para el lote 2 y 14,2 cp/ml (intervalo de confianza del 95%: 11,2-22,1 cp/ml) para el lote 3. Los resultados combinados para los tres lotes de reactivos se muestran en la Tabla 3. **Para determinar el factor de conversión entre UI/ml y cp/ml se utilizó la prueba COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 y la prueba COBAS® TaqMan® HIV-1 para uso con el sistema High Pure.**

**Tabla 3**  
**Límite de detección de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**

Entrada nominal (UI/ml de ARN del HIV-1)	Entrada nominal (cp/ml de ARN del HIV-1)	N.º de réplicas	N.º de positivos	Tasa de positividad
100	60	126	126	100%
67	40	186	185	99%
50	30	126	125	99%
<b>33</b>	<b>20</b>	<b>126</b>	<b>124</b>	<b>98%</b>
25	15	59	53	90%
17	10	126	108	86%
8	5	125	66	53%
0	0	126	0	0%
<b>Tasa de resultados positivos del 95% según PROBIT</b>		<b>27,5 UI/ml</b> (intervalo de confianza del 95%: 23,8-33,0 UI/ml) <b>16,5 cp/ml</b> (intervalo de confianza del 95%: 14,3-19,8 cp/ml)		

También se analizaron diluciones de sobrenadantes de cultivos celulares que representaban los subtipos A-H del grupo M del HIV-1 en plasma humano con EDTA negativo para HIV-1 con dos lotes de reactivos. Para cada aislado de subtipo del HIV-1 se analizaron varios niveles de concentración (títulos nominales entre 10 y 75 cp/ml) en 24 réplicas por lote de reactivo. La asignación de las concentraciones nominales al material en stock de cultivos celulares se realizó con la media de los títulos de la prueba COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, el ensayo VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 (bdNA) y del ensayo Abbott RealTime HIV-1. El análisis de tasa de resultados positivos muestra una positividad superior al 95% para todos los subtipos a 20 cp/ml o inferior. Los resultados combinados para los dos lotes de reactivos se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4**  
**Verificación del límite de detección**  
**de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**

Subtipo	Designación del aislado	Nivel de concentración más bajo Tasa de positividad $\geq$ 95% (cp/ml)
A	92UG029	10
A	4237A/98	20
B	92TH026	20
B	8E5/LAV	20
C	92BR025	20
C	3777A/97	11
D	92UG021	20
D	92UG035	11
CRF01_AE	92TH022	12
CRF01_AE	92TH009	14
F	93BR020	20
G	ARP173/RU570	13
H	HIV V1557	16

#### B. Precisión

La precisión de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 se determinó mediante el análisis de diluciones en serie de una muestra de sobrenadante de cultivos celulares de HIV-1 (subtipo B del HIV-1) en plasma humano con EDTA negativo para HIV-1. La asignación del título de la muestra de sobrenadante de cultivos celulares (concentración de stock) se realizó mediante un método que garantiza la trazabilidad de acuerdo con el 1<sup>er</sup> estándar internacional de la OMS para el ARN del HIV-1, código NIBSC 97/656<sup>36</sup>. Se analizaron tres lotes de reactivos y se llevaron a cabo 15 series por lote de reactivo, cada una de ellas con 6 niveles de dilución y 3 réplicas de cada nivel. Cada muestra se sometió a todo el procedimiento de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, incluyendo la preparación de la muestra, la amplificación y la detección. Por lo tanto, la precisión a la que se hace referencia en este documento engloba todas las fases del procedimiento de la prueba. Los resultados de cada lote de reactivo y de los tres lotes de reactivos combinados aparecen en la Tabla 5.

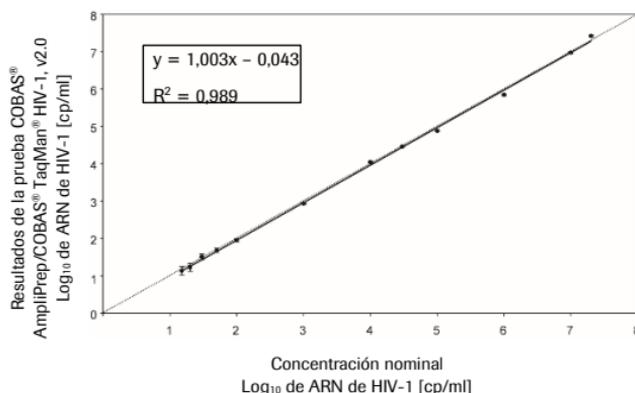
**Tabla 5**  
**Precisión de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**

Título (cp/ml)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Los tres lotes combinados	
	SD total en log	CV (%) total de log normal			
1,0E+02	0,19	0,16	0,17	0,17	41
1,0E+03	0,07	0,09	0,07	0,08	20
1,0E+04	0,07	0,07	0,06	0,07	16
1,0E+05	0,04	0,05	0,07	0,06	15
1,0E+06	0,10	0,09	0,10	0,10	25
1,0E+07	0,11	0,12	0,14	0,13	33

### C. Intervalo lineal

Se encontró que la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 ofrecía una respuesta lineal desde 20 ( $\log_{10} = 1,30$ ) cp/ml de ARN de HIV-1 hasta 1,0E+07 ( $\log_{10} = 7,00$ ) cp/ml de ARN de HIV-1. La evaluación se realizó de acuerdo con la directriz EP6-A del CLSI usando dos lotes de reactivos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, y diluciones seriadas de una muestra de sobrenadante de cultivo celular positivo para el ARN del HIV-1 de título elevado. Se analizaron dos lotes de reactivos y se llevaron a cabo 15 series por lote de reactivo, consistiendo cada una de ellas en 12 niveles de dilución y 3 réplicas en cada nivel. En la Ilustración 18 puede observar los resultados de un lote de reactivos.

**Ilustración 18**  
**Linealidad para la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**



### D. Inclusividad del grupo M del HIV-1

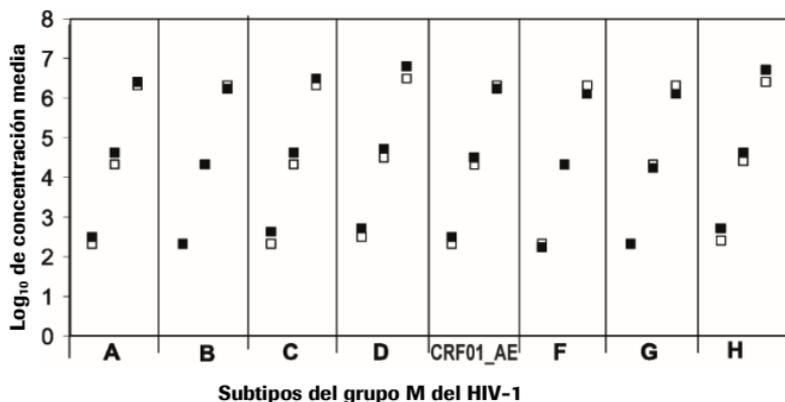
Se han propuesto ocho categorías para el grupo M del HIV-1 según la divergencia nucleotídica. Estos subtipos se denominan con letras en mayúsculas desde la A hasta la H<sup>11</sup>.

El rendimiento de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en subtipos del HIV-1 se evaluó mediante el análisis de material en stock de cultivos celulares representativos de cada uno de los subtipos de la A a la H del grupo M del HIV-1. La asignación de las concentraciones nominales al material de stock de cultivos celulares se realizó con la media de los títulos de la prueba COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, el ensayo VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 (bDNA) y del ensayo Abbott RealTime HIV-1. Cada material en stock de cultivos celulares se diluyó en concentraciones nominales de aproximadamente 2,00E+02, 2,00E+04 y 2,00E+06 cp/ml en plasma con EDTA. Las concentraciones se analizaron a continuación en 10 réplicas mediante la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 usando un lote de reactivo. Los títulos medios de  $\log_{10}$  de todas las concentraciones y subtipos se compararon con los respectivos títulos nominales de  $\log_{10}$ .

La evaluación de los 8 aislados de subtipos del HIV-1 por parte de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 demuestra resultados equivalentes para todos los representantes analizados de los subtipos del grupo M del HIV-1 (consulte la Ilustración 19). Los resultados de concentración media de  $\log_{10}$  para todos los subtipos se situaron en  $\pm 0,3 \log_{10}$  de la concentración de entrada asignada.

**Ilustración 19**  
**Prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**

□ Concentración nominal ■ Prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

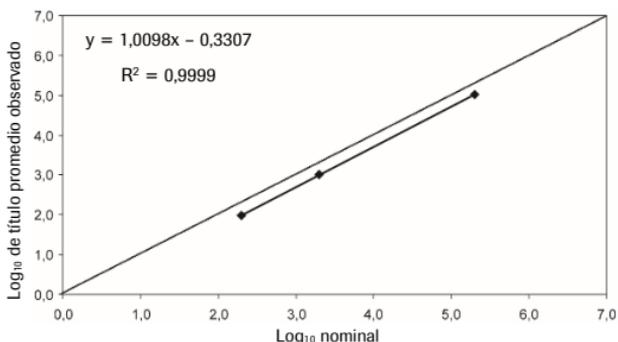


**E. Detección del grupo O del HIV-1**

Se analizaron diluciones de un sobrenadante de cultivo celular del grupo O del HIV-1 (aislado MVP5180) en plasma humano con EDTA junto con dos lotes de reactivos. Se analizaron varios niveles de concentración (títulos nominales entre 10 y 75 cp/ml) en 24 réplicas por lote de reactivo. La asignación de la concentración nominal al material en stock de cultivo celular *se realizó mediante el ensayo Abbott RealTime HIV-1*. El análisis de tasa de resultados positivos muestra una positividad superior al 95% a 20 cp/ml.

El material en stock de cultivo celular del grupo O del HIV-1 se diluyó en concentraciones nominales de aproximadamente 2,00E+02, 2,00E+03 y 2,00E+05 cp/ml en plasma con EDTA. Las concentraciones se analizaron a continuación en 10 réplicas mediante la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 usando un lote de reactivo. Los títulos medios de log<sub>10</sub> de todas las concentraciones fueron lineales y se encontraban a ± 0,3 log<sub>10</sub> del título nominal log<sub>10</sub> respectivo (consulte la Ilustración 20).

**Ilustración 20**  
**Prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**  
**Linealidad del subtipo O (MVP5180)**



Además, se analizaron 10 materiales de cultivo celular y una muestra de paciente diluida (11613) representando el grupo O del HIV-1 junto con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y el ensayo Abbott RealTime HIV-1. Las 11 muestras resultaron positivas con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 (consulte la Tabla 6). Para las 11 muestras, ambas pruebas arrojaron un título medio de  $\text{log}_{10}$  situado entre 0,1  $\text{log}_{10}$ .

**Tabla 6**  
**Reconocimiento de los aislados del grupo O del HIV-1**  
**por parte de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**

<b>Designación del aislado</b>	<b>Título de <math>\text{log}_{10}</math> Prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0</b>	<b>Título de <math>\text{log}_{10}</math> Ensayo Abbott RealTime HIV-1</b>
BBI PRD 301, BV-5050	3,09	2,42
BBI PRD 301, BV-5051	2,86	3,35
BBI PRD 301, BV-5003	3,00	2,71
BBI PRD 301, BV-5024	2,87	2,69
MVP5180	2,78	3,25
HIV-1 CA-9	3,31	3,08
BCF01	5,71	5,61
BCF02	5,16	5,39
BCF07	4,27	4,81
BCF011	5,57	5,26
11613	2,97	2,05
<b>Título medio de <math>\text{log}_{10}</math></b>	<b>3,78</b>	<b>3,69</b>

## F. Especificidad

La especificidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 se determinó con dos lotes de reactivos mediante el análisis de muestras de plasma con EDTA negativas al HIV-1 de donantes de sangre. De un total de 660 muestras individuales de plasma conservado en EDTA, todas las muestras obtuvieron resultados válidos y todos fueron negativos para el ARN del HIV-1 con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Según estos resultados, la especificidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 es del 100% (límite de confianza al 95% unilateral:  $\geq 99,6\%$ ).

## G. Especificidad analítica

La especificidad analítica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 se evaluó añadiendo microorganismos cultivados (virus, bacterias, levadura) o ADN (HTLV-2) en una concentración de entrada de  $5E+04$  partículas/ml a plasma humano con EDTA negativo para HIV-1 y a plasma humano con EDTA positivo para HIV-1 con  $1,5E+02$  cp/ml de HIV-1 (consulte la Tabla 7).

Ninguno de los microorganismos mostró una reacción cruzada con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Las muestras positivas al HIV-1 obtuvieron resultados de títulos entre  $\pm 0,5 \log_{10}$  de un control positivo del HIV-1.

**Tabla 7**  
**Muestras de especificidad analítica**

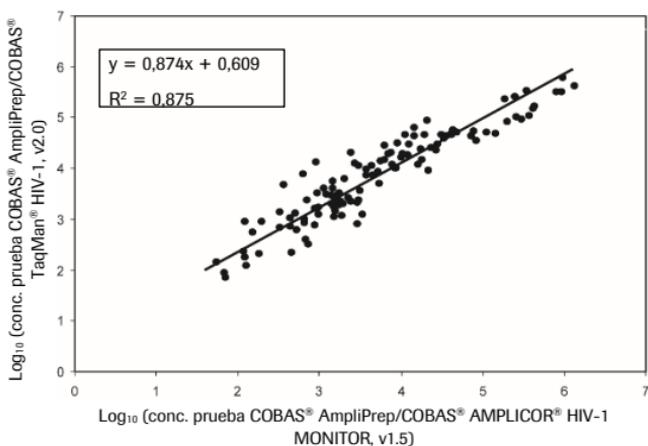
<b>Virus</b>	<b>Bacterias</b>
<i>Adenovirus tipo 5</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Citomegalovirus</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Virus de Epstein-Barr</i>	
<i>Virus del herpes humano tipo 6</i>	
<i>Virus del herpes simple tipo 1</i>	
<i>Virus del herpes simple tipo 2</i>	
<i>Virus linfotrópico de células T humanas tipo 1</i>	
<i>Virus linfotrópico de células T humanas tipo 2</i>	
<i>Influenza A</i>	
<i>Virus de la hepatitis A</i>	
<i>Virus de la hepatitis B</i>	
<i>Virus de la hepatitis C</i>	

## H. Correlación de métodos

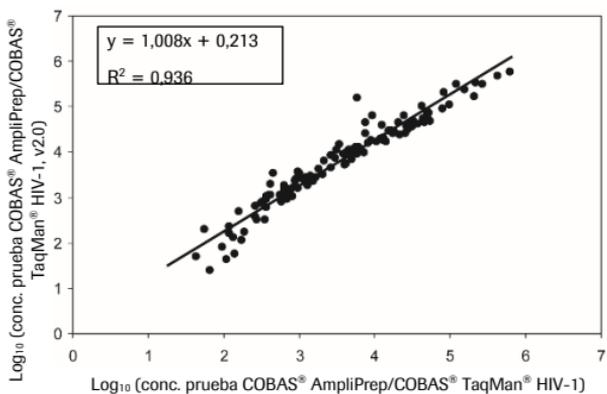
El rendimiento de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 se ha comparado con el de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, con el de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 y con el ensayo Abbott RealTime HIV-1 mediante el análisis de 92 muestras clínicas positivas al HIV-1 sin diluir y recogidas previamente y el análisis de 34 sobrenadantes de cultivos de células diluidos. Las muestras abarcaban los subtipos de la A a la H del grupo M del HIV-1 además de formas recombinantes circulantes del virus y fueron analizadas en dos laboratorios externos. Se analizaron un total de 126 muestras dentro del intervalo dinámico de la prueba

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 con las cuatro pruebas. Para el análisis de regresión de Deming sólo se consideraron los pares con títulos válidos dentro de los intervalos lineales de ambos ensayos (consulte la Ilustración 21 a la Ilustración 23).

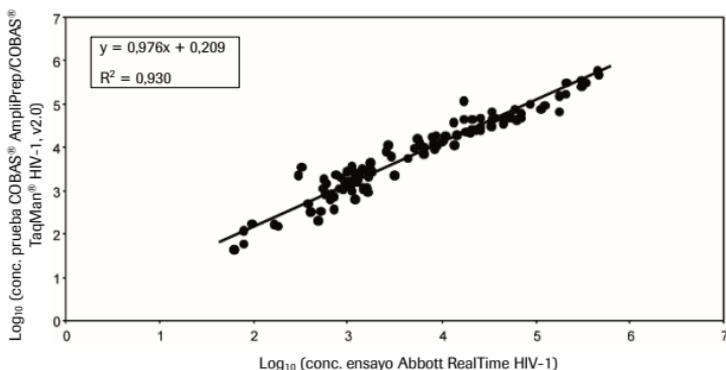
**Ilustración 21**  
**Correlación de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**



**Ilustración 22**  
**Correlación de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**



**Ilustración 23**  
**Correlación de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**



**I. Fallo de todo el sistema**

La tasa de fallo de todo el sistema para dos lotes del kit de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2 se determinó mediante el análisis de 113 réplicas para el lote 1 y de 114 réplicas para el lote 2 de plasma conservado en EDTA al que se añadió HIV-1 del grupo M subtipo B. Dichas muestras se analizaron con una concentración de fragmento objetivo de aproximadamente 3 x LoD. Los resultados combinados (lote 1 y 2) del estudio indican que una réplica obtuvo un resultado negativo para el fragmento objetivo del HIV-1, lo que representa una tasa de fallo de todo el sistema del 0,4%.

**Características clave de rendimiento para muestras de plasma seco de PSC**

**A. Límite de detección del plasma con la Plasma Separation Card**

El límite de detección del plasma de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en combinación con la **PSC** se determinó mediante el análisis de títulos de plasma asignados a diluciones en serie del sobrenadante del cultivo celular del grupo M del HIV-1 en sangre total humana negativa para HIV. Se analizaron paneles con cinco niveles de concentración más uno negativo con tres lotes de muestras de **PSC** y tres lotes de reactivos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, con múltiples series analíticas, días, operadores e instrumentos. Se centrifugó una parte del miembro del panel más alto y la asignación del título del plasma se realizó mediante el método de calibradores de referencia (CBM) a través de la prueba **cobas**® HIV-1 (en **cobas**® 6800/8800 Systems) con el tercer estándar internacional de la OMS para el grupo M, subtipo B, del HIV-1 para la preparación de los calibradores alto y bajo.

Los resultados para la **PSC** se muestran en la Tabla 8. El estudio demuestra que la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 en combinación con la **PSC** detectó ARN del HIV-1 en una concentración de 737,9 cp/ml según el análisis Probit con una tasa de positividad del 95%.

**Tabla 8**  
**Límite de detección de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**

Concentración del plasma asignada para HIV-1 grupo M (cp/ml)	Número de reactivos	Número de réplicas válidas	% de reactividad
1691,1	61	61	100%
1098,1	51	51	100%
2276,4	61	62	98,39%
845,6	59	60	98,33%
549,1	46	49	93,88%
1138,2	59	60	98,33%
563,7	54	60	90,00%
366	49	53	92,45%
758,8	56	61	91,80%
281,9	46	62	74,19%
183	36	49	73,47%
379,4	50	62	80,65%
140,9	38	63	60,32%
91,5	22	54	40,74%
189,7	37	63	58,73%
0	0	63	0,00%
0	0	54	0,00%
0	0	59	0,00%
<b>Tasa de resultados positivos del 95% según PROBIT</b>		737,9 cp/ml (intervalo de confianza del 95%: 614,3-938,5 cp/ml) 1.230 UI/ml (1.023,8-1.564,2 UI/ml)	

**Estimación del LoD en sangre total:**

No es posible determinar con exactitud los títulos correspondientes en sangre total de la misma muestra, dado que la sangre total no es un tipo de muestra adecuado para las pruebas de carga viral. Para la estimación del LoD, no se utilizaron los títulos de sangre total basados en la cantidad de ARN del HIV-1 añadida a las muestras de sangre total, ya que la cantidad de ARN añadido no se corresponde necesariamente con la cantidad de ARN en plasma. Incluso después de la centrifugación, el ARN puede permanecer en la capa leucocitaria o asociado a la fracción celular de la sangre total. Sin embargo, dado que existen otras tecnologías (como las muestras de sangre seca) que han utilizado los títulos de sangre total añadidos para realizar estimaciones del límite de detección en sangre total, se puede proporcionar una estimación del LoD de sangre total de **PSC** basada en un factor empírico que se presupone relacionado con el contenido medio de hematocrito (45%) de las muestras (Tabla 9).

Los valores del LoD en sangre total son estimaciones basadas en la relación:

Estimación del LoD en sangre total = LoD del plasma de **PSC**/1,8

**Tabla 9**  
**Estimación del LoD en sangre total**

LOD según análisis PROBIT (tasa de positividad del 95%)	439,0 cp/ml
Intervalo de confianza del 95%	366,1-557,6 cp/ml

## B. Precisión con la Plasma Separation Card

La precisión de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en combinación con la **PSC** se determinó mediante el análisis de diluciones en serie de una muestra positiva alta para HIV-1 (muestra de sobrenadante de cultivo celular positiva para el ARN del HIV-1 de título elevado) en sangre total conservada en EDTA negativa para el HIV. Se analizaron cinco niveles de dilución en 48 réplicas para cada nivel y volumen de procesamiento en dos lotes de **PSC** y dos lotes de reactivos para la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en dos sistemas CAP/CTM diferentes y con dos usuarios distintos durante 12 días. Cada muestra se analizó siguiendo el flujo de trabajo completo para la **PSC** y el procedimiento de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Los resultados de precisión mostrados en este documento engloban todos los aspectos del procedimiento de la prueba. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en combinación con la **PSC** mostró una elevada precisión para dos lotes de **PSC** y reactivos analizados en un intervalo de concentración de 7,38E+02 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml.

**Tabla 10**  
**Precisión intralaboratorio de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en combinación con la PSC**

Concentración medida (cp/ml)	Material de origen	SD agrupada
6,31E+06	Cultivo celular	0,08
1,05E+06	Cultivo celular	0,09
1,02E+05	Cultivo celular	0,12
1,05E+04	Cultivo celular	0,19
2,29E+03	Cultivo celular	0,25

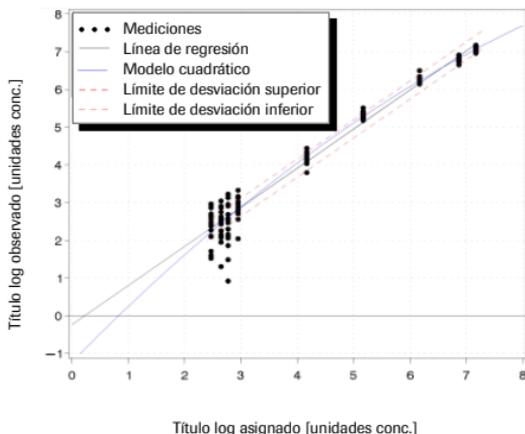
## C. Intervalo lineal con la Plasma Separation Card

El estudio de linealidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en combinación con la **PSC** se llevó a cabo con una serie de diluciones formadas por un panel 9 miembros con el que se cubría el intervalo lineal del grupo M, subtipo B, del HIV-1. Los miembros del panel se prepararon a partir de una muestra de sobrenadante de cultivos celulares positivos para ARN del HIV-1 de título elevado. La evaluación se realizó de acuerdo con la directriz EP06-AE del CLSI<sup>20</sup>. Se analizaron dos **PSC** y dos lotes de reactivos en dos sistemas CAP/CTM distintos, con tres usuarios diferentes y un total de 20 réplicas por nivel de concentración.

Se centrifugó una parte de un miembro del panel y la asignación del título del plasma se realizó mediante el método de calibradores de referencia (CBM) a través de la prueba **cobas®** HIV-1 (en **cobas®** 6800/8800 Systems) con el tercer estándar internacional de la OMS para el grupo M, subtipo B, del HIV-1 para la preparación de los calibradores alto y bajo.

En combinación con la **PSC**, la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 es lineal de 7,38E+02 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml y presenta una desviación absoluta respecto al mejor ajuste de la regresión no lineal inferior a  $\pm 0,16 \log_{10}$  con la **PSC** (consulte la Ilustración 24). En el intervalo lineal, la exactitud de la prueba estuvo comprendida entre  $\pm 0,3 \log_{10}$ .

**Ilustración 24**  
**Linealidad para la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**  
**en combinación con la Plasma Separation Card**



**D. Verificación del subtipo con la Plasma Separation Card**

Si bien el subtipo del HIV no debería afectar al rendimiento de la **PSC**, las muestras del HIV-1 cultivadas para los subtipos comunes del grupo M del HIV-1 (A, C y D) se diluyeron a un nivel de concentración en sangre total. La determinación de la precisión y exactitud se llevó a cabo con 12 réplicas para cada muestra. El análisis se realizó con 1 lote de **PSC** y 1 lote de reactivos para la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Se centrifugó cada muestra de sangre total y la asignación del título del plasma se realizó mediante el método de calibradores de referencia (CBM) a través de la prueba **cobas®** HIV-1 (en **cobas®** 6800/8800 Systems) con el tercer estándar internacional de la OMS para el grupo M, subtipo B, del HIV-1 para la preparación de los calibradores alto y bajo.

Los resultados se muestran en la Tabla 11. Estos resultados verifican que la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en combinación con la **PSC** detectó HIV para HIV-1M (A, C y D).

**Tabla 11**  
**Verificación de los subtipos A, C y D del grupo M del HIV-1**

Subtipo HIV-1 M	Número de réplicas válidas	Exactitud	Precisión	Equivalencia entre plasma y plasma de PSC
<b>Subtipo A</b>	12	-0,02	0,09	0,17
<b>Subtipo C</b>	12	0,13	0,16	0,06
<b>Subtipo D</b>	12	0,07	0,15	0,05

## **E. Especificidad con la Plasma Separation Card**

La especificidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en combinación con la **PSC** se determinó mediante el análisis de muestras de sangre total conservada en EDTA negativas para el HIV obtenidas de donantes individuales. Se analizaron 160 muestras de sangre total conservada en EDTA individuales con dos lotes de **PSC** y dos lotes de reactivos para la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Una muestra resultó positiva y 159 negativas para el ARN del HIV-1. En el panel de la prueba, la especificidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en combinación con la **PSC** fue del 99,4% (límite de confianza del 95%:  $\geq 97,07\%$ ).

## **F. Tasa de fallo de todo el sistema con la Plasma Separation Card**

La tasa de fallo de todo el sistema de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en combinación con la **PSC** se determinó mediante el análisis de 100 réplicas de sangre total conservada en EDTA a la que se añadió subtipo B del grupo M del HIV-1. Dichas muestras se analizaron con una concentración de fragmento objetivo de aproximadamente 3 x LoD. Los resultados del estudio indican que ninguna réplica obtuvo un resultado negativo para el fragmento objetivo del HIV-1, lo que representa una tasa de fallo de todo el sistema del 0%.

## **EVALUACIÓN CLÍNICA DEL RENDIMIENTO**

### **Características clave de rendimiento para muestras de plasma conservado en EDTA**

#### **Reproducibilidad**

Se evaluó la reproducibilidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en plasma conservado en EDTA mediante 2 flujos de trabajo diferentes (sistema del analizador COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® y sistema del analizador COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48). El estudio se realizó utilizando paneles creados a partir de cultivos de virus conocidos subtipo B del grupo M del HIV-1 bien caracterizados y de plasma conservado en EDTA negativo para ARN del HIV-1 y anticuerpos del HIV-1/2. El panel cubría el rango dinámico de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y los puntos clave de las decisiones médicas para los fines establecidos según las directrices del Departamento de salud y servicios humanos de 2008 para el uso de agentes antirretrovirales en adultos y adolescentes infectados por el HIV-1<sup>13</sup>. El estudio se diseñó para evaluar las variables clave que contribuyen a la variación de la precisión total, como el lote, el centro/equipo, el usuario, el día/la serie analítica y la variación dentro de una serie analítica. Se realizaron análisis adicionales para comparar las características de rendimiento y la variabilidad de la precisión comparativa entre los dos flujos de trabajo. Dos usuarios en cada uno de los 3 centros realizaron 5 días de pruebas con cada uno de los 3 lotes de kits de reactivos a partir de cada flujo de trabajo. Cada serie analítica consistía en un conjunto de controles (1 positivo alto, 1 positivo bajo y 1 negativo) y un panel de 7 miembros analizado por triplicado (21 resultados de muestras) en el equipo COBAS® AmpliPrep. Las muestras y controles preparados se amplificaron y detectaron en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48.

Se evaluó la reproducibilidad mediante un modelo de efectos aleatorios que incluye factores para (a) lote, (b) centro/equipo, (c) usuario anidado de un centro/equipo, (d) día/serie anidados de un lote, un centro/equipo y un usuario, y (e) componentes intraensayo para alícuotas, todo ello utilizando resultados de PROC MIXED y de  $\log_{10}$  transformados. Se calculó el porcentaje de variabilidad derivado de cada componente y el coeficiente de variación de la concentración de ARN del HIV-1  $\log_{10}$  transformado. Sólo se investigaron los datos del rango de la serie analítica (de 2,00E+01 a 1,00E+07 cp/ml).

La Tabla 12 muestra la variación de la precisión total y la desviación estándar de la precisión total obtenidas con el sistema del analizador COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®, según determinó el análisis de variación. En general, el componente intraensayo genera mayor variabilidad que otros componentes.

**Tabla 12**  
**Porcentaje atribuible de variación total, desviación estándar de la precisión total**  
**y CV de log normal de la concentración de ARN del HIV-1 ( $\log_{10}$  cp/ml)**  
**de pruebas del rango de la serie analítica**

Concentración de ARN del HIV-1 ( $\log_{10}$ cp/ml)			Contribución a la variación total (%)					Precisión total
Esperada	Observada (promedio)	N.º de pruebas válidas <sup>1</sup>	Lote	Centro/Equipo	Usuario	Día/Serie analítica	Intra-ensayo	Desviación estándar (% de CV de log normal)
1,699	1,832	270	5%	2%	0%	8%	85%	0,20 (48%)
2,602	2,676	275	6%	1%	0%	17%	77%	0,11 (25%)
3,000	3,067	274	16%	0%	4%	12%	69%	0,10 (24%)
3,699	3,822	273	20%	6%	0%	17%	57%	0,10 (23%)
4,699	4,746	273	27%	0%	0%	14%	59%	0,07 (17%)
5,699	5,644	274	33%	10%	0%	19%	38%	0,10 (23%)
6,699	6,751	259	27%	14%	0%	20%	39%	0,12 (27%)

Nota: los resultados del rango de la serie analítica van de 20 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml (de 1,30  $\log_{10}$  cp/ml a 7,00  $\log_{10}$  cp/ml), ambos incluidos.

<sup>1</sup> Número de pruebas del rango de la serie analítica

Los resultados obtenidos del flujo de trabajo del sistema COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 se resumen en la Tabla 13. En general, el componente intraensayo genera mayor variabilidad que otros componentes, a excepción del miembro del panel con el título más alto.

**Tabla 13**  
**Porcentaje atribuible de variación total, desviación estándar de la precisión total**  
**y CV de log normal de la concentración de ARN del HIV-1 ( $\log_{10}$  cp/ml)**  
**de pruebas del rango de la serie analítica**

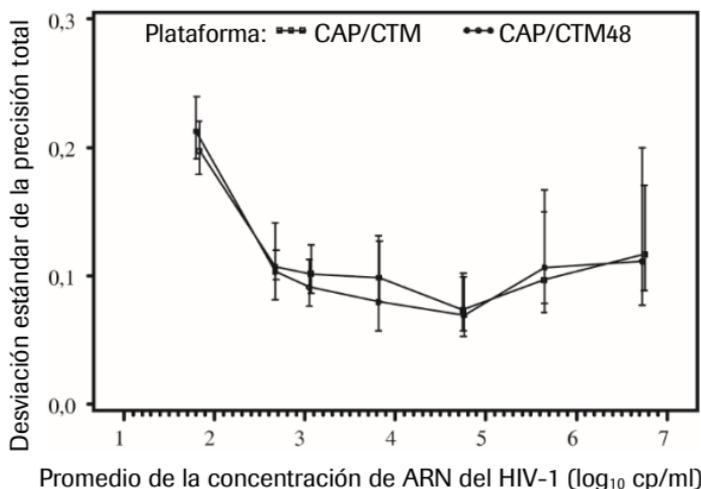
Concentración de ARN del HIV-1 ( $\log_{10}$ cp/ml)			Contribución a la variación total (%)					Precisión total
Esperada	Observada (promedio)	N.º de pruebas válidas <sup>1</sup>	Lote	Centro/Equipo	Usuario	Día/Serie analítica	Intra-ensayo	Desviación estándar (% de CV de log normal)
1,699	1,804	266	7%	2%	0%	2%	89%	0,21 (52%)
2,602	2,672	273	26%	0%	2%	5%	68%	0,10 (24%)
3,000	3,048	272	17%	0%	0%	6%	77%	0,09 (21%)
3,699	3,814	271	39%	0%	2%	13%	46%	0,08 (19%)
4,699	4,756	272	30%	0%	0%	10%	61%	0,07 (16%)
5,699	5,647	272	35%	0%	6%	16%	43%	0,11 (25%)
6,699	6,727	269	45%	0%	4%	13%	38%	0,11 (26%)

Nota: los resultados del rango de la serie analítica van de 20 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml (de 1,30  $\log_{10}$  cp/ml a 7,00  $\log_{10}$  cp/ml), ambos incluidos.

<sup>1</sup> Número de pruebas del rango de la serie analítica

Los resultados de la Ilustración 25 muestran el gráfico de la desviación estándar de la precisión total con los correspondientes intervalos de confianza aproximados del 95% y el promedio de las concentraciones de ARN del HIV-1 de  $\log_{10}$ . Estos resultados indican un rendimiento de precisión comparable entre las configuraciones del sistema COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (CAP/CTM) y el sistema COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 (CAP/CTM48).

**Ilustración 25**  
**Desviación estándar de la precisión total (IC aproximado del 95%)**



**Nota:** el IC aproximado del 95% correspondiente a la desviación estándar de la precisión total se calculó tomando la raíz cuadrada de los límites de IC del 95% de la variación de la precisión total.

## Sensibilidad y especificidad clínicas y comparación de métodos

### Metodología

El principal objetivo de este estudio era evaluar la especificidad y sensibilidad clínicas de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en muestras de sujetos negativos para el HIV y positivos para el HIV-1. Se analizaron ambas muestras, tanto la nueva (nunca congelada) como la congelada de plasma con EDTA, en cada una de las evaluaciones. Los objetivos secundarios consistían en comparar los resultados y evaluar la concordancia de porcentaje de positivos y la concordancia de porcentaje de negativos de los resultados de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 con los resultados obtenidos en las pruebas aprobadas por la FDA, la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 y la prueba COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5.

Se evaluó la especificidad clínica con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 mediante el análisis de 148 muestras nuevas (nunca congeladas) y 418 muestras congeladas extraídas de donantes de sangre negativos para los anticuerpos del HIV-1/2. Se evaluó la sensibilidad clínica de la prueba con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 mediante el análisis de 117 muestras nuevas y 301 muestras congeladas en plasma con EDTA extraído de sujetos infectados por el HIV-1 (las muestras congeladas se distribuyeron de aleatoriamente entre los centros de pruebas mediante la categoría de recuento celular CD4). Se compararon los resultados obtenidos con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 con los resultados obtenidos con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 y la prueba COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5. Las pruebas se realizaron en 3 centros de pruebas, con 1 sistema COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® por centro. Se utilizaron 3 lotes de reactivos de COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

### Métodos estadísticos

Se analizaron muestras nuevas y congeladas de sujetos negativos para el HIV y positivos para el HIV-1 con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 y la prueba COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5. Los sujetos negativos para el HIV eran evaluables para análisis estadísticos de la especificidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 si generaban resultados válidos en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0. Los sujetos positivos para el HIV-1 eran evaluables para análisis estadísticos de la sensibilidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 si generaban resultados válidos en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y presentaban resultados válidos en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 dentro del rango lineal del ensayo.

Se calculó la especificidad clínica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 como el porcentaje de sujetos negativos para el HIV evaluables con resultados "Target Not Detected" mediante la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. También se proporcionó el intervalo de confianza (IC) exacto del 95% asociado. Se calculó la sensibilidad clínica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 como el porcentaje de sujetos positivos para el HIV-1 evaluables con carga viral de HIV-1 detectable mediante la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. También se proporcionó el intervalo de confianza (IC) exacto del 95% asociado. La comparación de métodos evaluó los resultados de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 individualmente con ambas plataformas comparativas (prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 y prueba COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5). Se calcularon las concordancias de porcentajes de positivos y negativos entre la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y cada una de las plataformas comparativas. Se compararon las muestras pareadas de sujetos positivos para el HIV-1 que obtuvieron resultados dentro del rango lineal de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 mediante gráficos de dispersión. El análisis de dichas muestras se realizó mediante la regresión de Deming.

## Resultados

Se incluyeron un total de 566 muestras de pacientes negativos para el HIV y 418 muestras de pacientes positivos para el HIV-1 evaluables en análisis de especificidad y sensibilidad clínicas. Aproximadamente el 75% de las muestras de pacientes eran congeladas, mientras que el 25% eran nuevas. La distribución específica de cada plataforma se resume en la Tabla 14.

**Tabla 14**  
**Sujetos negativos y positivos para el HIV-1 evaluables por tipo de muestra**

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Muestras negativas para el HIV</b>	<b>Muestras positivas para el HIV-1</b>
<b>Nuevas</b>	148 (26,1%)	117 (28,0%)
<b>Congeladas</b>	418 (73,9%)	301 (72,0%)
<b>Total</b>	566	418

Las características demográficas de las 418 muestras positivas para el HIV-1 evaluables se resumen en la Tabla 15. Los recuentos celulares CD4 de los sujetos se distribuyeron de forma casi uniforme en las categorías de recuento celular CD4 (< 200, 200-500, > 500 células/ $\mu$ l). La mayoría de los sujetos eran hombres (74,2%) de edades comprendidas entre los 30 y los 49 años (72,5%). La distribución étnica es comparable a la que se observa en la población de HIV-1 de los Estados Unidos<sup>32</sup>.

**Tabla 15**  
**Características demográficas de los sujetos positivos para el HIV-1 evaluables**

<b>Característica demográfica</b>	<b>Categoría</b>	<b>Sujetos positivos para el HIV-1</b>
<b>Global</b>	Total	418
<b>Recuento celular CD4 (células/<math>\mu</math>l)</b>	< 200	130 (31,1%)
	200-500	152 (36,4%)
	> 500	136 (32,5%)
<b>Tipo de muestra</b>	Nuevas	117 (28,0%)
	Congeladas	301 (72,0%)
<b>Sexo</b>	Hombres	310 (74,2%)
	Mujeres	108 (25,8%)
<b>Edad (años)</b>	18-29	23 (5,5%)
	30-39	100 (23,9%)
	40-49	203 (48,6%)
	50-59	74 (17,7%)
	$\geq$ 60	18 (4,3%)
<b>Etnia</b>	Caucásicos	129 (30,9%)
	Hispanos	46 (11,0%)
	Negros	223 (53,3%)
	Asiáticos/Isleños del Pacífico	3 (0,7%)
	Otros	17 (4,1%)
<b>Con tratamiento antirretroviral</b>	Sí	240 (57,4%)
	No	178 (42,6%)

La especificidad clínica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 (Tabla 16) fue del 99,3% (562/566; IC del 95% = entre 98,2% y 99,8%), con 4 muestras clasificadas como falsos positivos. Tres de estas muestras generaron resultados < 20 cp/ml, por debajo del LLoQ del ensayo. La muestra restante de las 566 analizadas se encontraba dentro del rango lineal, pero con un título muy bajo (28,8 cp/ml). La especificidad clínica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 fue similar tanto para las muestras nuevas (99,3% [147/148; IC del 95% = entre 96,3% y 100%]) como para las muestras congeladas (99,3% [415/418; IC del 95% = entre 97,9% y 99,9%]).

**Tabla 16**  
**Especificidad clínica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**

Grupo de sujetos	Prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0		N total	Especificidad clínica (IC del 95% exacto)
	Positiva	Negativa		
<b>Negativo para HIV</b>	4 (0,7%)	562 (99,3%)	566	99,3% (98,2%, 99,8%)

Se definió la sensibilidad clínica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 como el porcentaje de sujetos positivos para el HIV-1 evaluables con un resultado positivo en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. La sensibilidad clínica se resume en la Tabla 17. La sensibilidad clínica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 fue del 100% (418/418; IC del 95% = entre 99,1% y 100%). Ningún sujeto obtuvo un resultado de falso negativo en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Se analizó la sensibilidad clínica en una población de pacientes con HIV que reflejaba la propia población de los Estados Unidos con respecto al género, la edad, la etnia y la exposición al tratamiento antirretroviral<sup>29</sup>. La prueba obtuvo un resultado del 100% de sensibilidad clínica, independientemente de los datos demográficos mencionados anteriormente, el recuento celular CD4 o el tipo de muestra (nuevas y congeladas).

**Tabla 17**  
**Sensibilidad clínica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**

Grupo de sujetos	Prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0		N total	Sensibilidad clínica (IC del 95% exacto)
	Positiva	Negativa		
<b>Positivo para HIV-1</b>	418 (100,0%)	0 (0,0%)	418	100,0% (99,1%, 100,0%)

### Comparación de métodos clínicos

Prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

La Tabla 18 recoge la comparación de los resultados de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 de los 950 sujetos elegibles para el análisis. El porcentaje de concordancia de positivos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 con respecto a la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 fue del 99,5% (427/429; IC del 95% = entre 98,3% y 99,9%). El porcentaje de concordancia de negativos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 con respecto a la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 fue del 98,1% (511/521; IC del 95% = entre 96,5% y 99,1%). Había 10 muestras con resultados positivos en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y resultados negativos en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1. Tres muestras presentaban títulos por debajo del LLoQ de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, probablemente como reflejo del aumento de la sensibilidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Tres muestras eran resultados de falsos positivos en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, realizada con sujetos negativos para el HIV identificados en el análisis de especificidad clínica que, de nuevo, se situaban por debajo del LLoQ. Cuatro muestras presentaban títulos que oscilaban entre 24,9 cp/ml y 158 cp/ml y que probablemente reflejaban la conocida variabilidad asociada a la baja cuantificación de los títulos.

**Tabla 18**  
**Comparación de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**  
**y la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1**

Prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0	Prueba CAP/CTM HIV-1		Total
	Positiva	Negativas	
<b>Positiva</b>	427	10	437
<b>Negativas</b>	2	511	513
<b>Total</b>	429	521	950
<b>Porcentaje de concordancia de positivos (IC del 95% exacto)</b>	99,5% (98,3%, 99,9%)		
<b>Porcentaje de concordancia de negativos (IC del 95% exacto)</b>		98,1% (96,5%, 99,1%)	

IC = intervalo de confianza; prueba CAP/CTM HIV-1= prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1; prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0 = prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Nota: en esta tabla de resumen se han incluido los sujetos negativos para el HIV y positivos para el HIV-1 que obtuvieron resultados válidos tanto con la prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0 como con la prueba CAP/CTM HIV-1.

Un total de 417 muestras pareadas positivas para el HIV-1 generaron resultados dentro del rango lineal de ambos ensayos y fueron evaluables para el análisis de comparación de métodos. En la Tabla 19 se muestra el promedio de diferencia de las muestras pareadas y el IC del 95% para la discriminación entre la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1. La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 genera títulos superiores a los de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, excepto en el rango superior ( $> 5 \log_{10}$  cp/ml) y el rango inferior ( $< 2 \log_{10}$  cp/ml), donde genera títulos que son inferiores (consulte la Tabla 19). Se estima que la discriminación sistemática global es de  $0,2591 \log_{10}$  cp/ml.

**Tabla 19**  
**Promedio de diferencia de las muestras pareadas e IC del 95%**  
**para la discriminación entre la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**  
**y la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1**

Número de muestras positivas para el HIV-1 pareadas dentro del rango lineal de ambos ensayos = 417		
Promedio de diferencia ( $\log_{10}$ cp/ml)	Error estándar	IC del 95%
0,2591	0,0122	(0,235, 0,283)

IC = intervalo de confianza; prueba CAP/CTM HIV-1= prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1; prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0 = prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Nota: en esta tabla de resumen se han incluido los sujetos positivos para el HIV-1 que obtuvieron resultados válidos dentro del rango lineal de cada ensayo tanto con la prueba CAP/CTM HIV-1 como con la prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0.

En la Tabla 20 se indican los resultados del análisis de la regresión de Deming realizado entre la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® para muestras pareadas positivas para el HIV-1 dentro del rango lineal de ambos ensayos. Dichos resultados se muestran en un gráfico en la Ilustración 26 (donde la línea discontinua indica una concordancia perfecta entre los dos métodos de pruebas, es decir,  $y = x$ ).

**Tabla 20**  
**Estimaciones de parámetros del análisis de la regresión de Deming realizado**  
**entre la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**  
**y la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1**

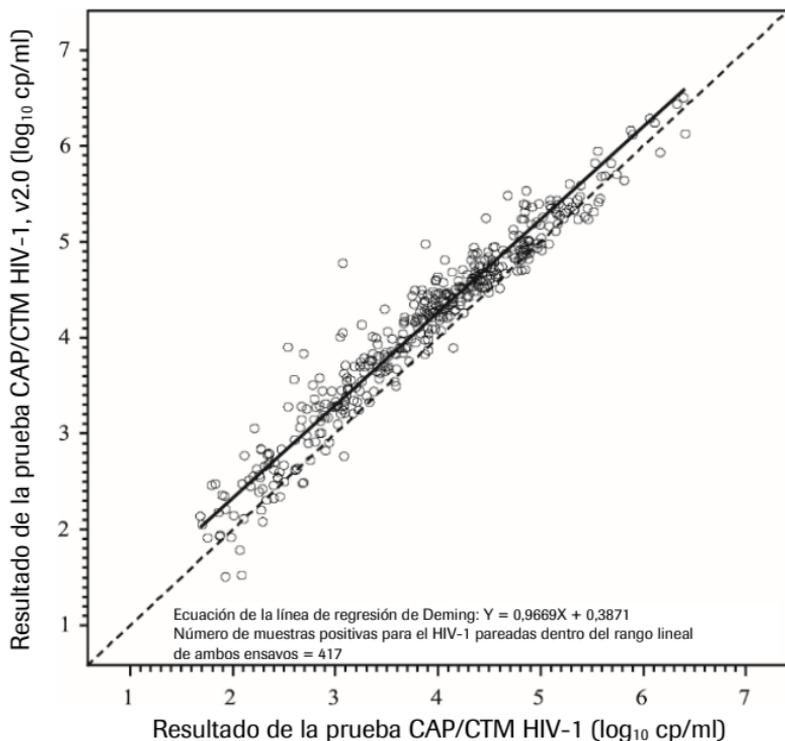
<b>Número de muestras positivas para el HIV-1 pareadas dentro del rango lineal de ambos ensayos = 417</b>				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación de parámetro <math>\log_{10}</math> cp/ml</b>	<b>Error estándar</b>	<b>IC del 95%</b>	<b><math>r^2</math></b>
Punto de intersección	0,3871	0,0488	(0,291, 0,483)	0,9375
Pendiente	0,9669	0,0122	(0,943, 0,991)	

IC = intervalo de confianza; prueba CAP/CTM HIV-1 = prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1; prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0 = prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Nota: en esta tabla de resumen se han incluido los sujetos positivos para el HIV-1 que obtuvieron resultados válidos dentro del rango lineal de cada ensayo tanto con la prueba CAP/CTM HIV-1 como con la prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0.

### Ilustración 26

Análisis de la regresión de Deming realizado entre la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1



En la Tabla 21 se muestra la comparación de los resultados de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y la prueba CA HIV-1 MONITOR, v1.5 para 991 sujetos elegibles para el análisis. El porcentaje de concordancia de positivos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 con respecto a la prueba COBAS® AMPLICOR (CA) HIV-1 MONITOR, v1.5 fue del 100% (419/419; IC del 95% = entre 99,1% y 100%). El porcentaje de concordancia de negativos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 con respecto a la prueba COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 fue del 97,4% (557/572; IC del 95% = entre 95,7% y 98,5%). De los 15 sujetos con resultados positivos para la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 y negativos para la prueba COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5, se obtuvieron 4 resultados falsos positivos para la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 de pacientes negativos para el HIV identificados en el análisis de especificidad clínica y con un valor inferior al LLoQ. De los once sujetos positivos para el HIV-1 según los resultados de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, se obtuvieron resultados con valores comprendidos por debajo del LLoQ hasta las 223 cp/ml y resultados negativos para COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5.

**Tabla 21**  
**Comparación de la prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0**  
**y la prueba COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5**

Prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0	Prueba CA HIV-1 MONITOR, v1.5		Total
	Positiva	Negativas	
<b>Positiva</b>	419	15	434
<b>Negativas</b>	0	557	557
<b>Total</b>	419	572	991
<b>Porcentaje de concordancia de positivos (IC del 95% exacto)</b>	100,0% (99,1%, 100,0%)		
<b>Porcentaje de concordancia de negativos (IC del 95% exacto)</b>		97,4% (95,7%, 98,5%)	

IC = intervalo de confianza; prueba CAP/CTM HIV-1= prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1; prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0 = prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Nota: en esta tabla de resumen se han incluido los sujetos negativos para el HIV y positivos para el HIV-1 que obtuvieron resultados válidos tanto con la prueba CAP/CTM HIV-1, v2.0 como con la prueba CA HIV-1 MONITOR, v1.5.

## Conclusión

### Plasma conservado en EDTA

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 muestra altos niveles de concordancia con la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 en los análisis cuantitativos ( $r^2 = 0,9375$ ) y en los análisis de concordancia (porcentaje de concordancia de positivos = 99,5%; porcentaje de concordancia de negativos = 98,1%). Por lo general, ofrece una cuantificación de las muestras clínicas 0,2591  $\log_{10}$  cp/ml superior a la de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, con una cuantificación menor en el rango superior ( $> 5 \log_{10}$  cp/ml) y en el rango inferior ( $< 2 \log_{10}$  cp/ml).

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 también muestra altos niveles de concordancia con la prueba COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 en los análisis de concordancia (porcentaje de concordancia de positivos = 100,0%; porcentaje de concordancia de negativos = 97,4%).

Estos resultados de pruebas evidencian la utilidad de la prueba para el uso previsto de valorar la progresión de la enfermedad y realizar el seguimiento del tratamiento antirretroviral en pacientes infectados por el HIV-1.

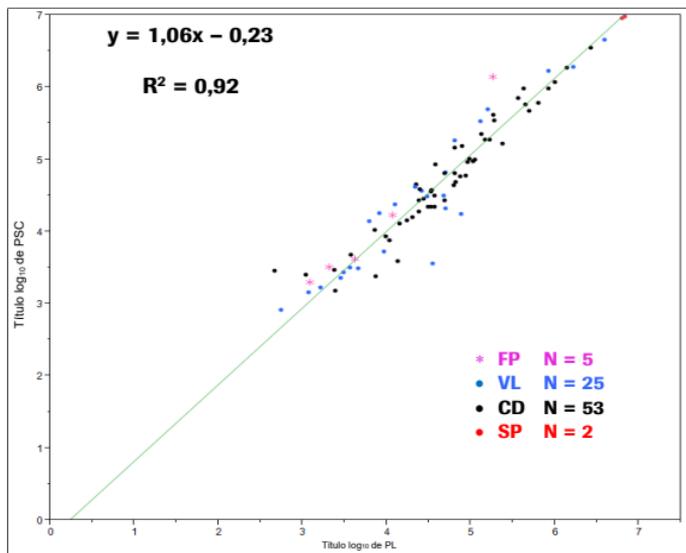
### Características clave de rendimiento para muestras de plasma seco de PSC

#### Rendimiento de las muestras de plasma seco procedentes de una PSC en comparación con las muestras de plasma en EDTA

El rendimiento de las muestras de plasma seco procedentes de una **PSC** se comparó con las muestras de plasma conservado en EDTA centrifugadas mediante el análisis de 325 muestras procedentes de pacientes infectados por el HIV-1 y 2 muestras de sangre total negativa para el HIV a las que se añadió sobrenadantes de cultivos celulares. Se analizaron 85 muestras que obtuvieron un título cuantificable tanto para plasma como para **PSC**. Las muestras comprendían muestras de HIV-1 M (FP = recogida prospectiva mediante venopunción y de sangre capilar, VL = análisis de carga viral de rutina, CD = recuento de células CD4+ de muestras sobrantes, SP = muestras adicionadas) y se analizó una réplica de cada una (**PSC** y plasma) en un centro externo. Los títulos inferiores al intervalo de cuantificación se excluyeron del análisis. Se realizó una regresión de Deming con los títulos log-transformados.

En la Ilustración 27 se muestran los resultados de la regresión de Deming. Los símbolos \* y • de la Ilustración 27 muestran determinaciones únicas.

**Ilustración 27**  
**Regresión de Deming**



**Tabla 22**  
**Resumen de resultados de la equivalencia de matriz**

Equivalencia de matriz (tipo de plasma)	Número de muestras con título válido	Análisis de Bland Altman		Análisis de regresión de Deming		
		Diferencia de log <sub>10</sub> medio	IC del 95% [inferior/superior]	Pendiente	Punto de intersección	R cuadrado
PSC y plasma líquido	85	0,05	[-0,01; 0,11]	1,06	-0,23	0,92

## BIBLIOGRAFÍA

1. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
2. Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., Gallo, R.C. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**:497-500.
3. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., Markham, P.D. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-503.
4. Curran, J.W., Jaffe, H.W., Hardy, A.M., Morgan, W.M., Selik, R.M., Dondero, T.J. 1988. Epidemiology of HIV Infection and AIDS in the United States. *Science* **239**:610-616.
5. Gaines, H., von Sydow, M.A., von Stedingk, L.V. 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* **4**:995-999.
6. Tindall, B., and Cooper, D.A. 1991. Primary HIV-1 infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* **5**:1-14.
7. Daar, E.S., Moudgil, T, Meyer, R.D., Ho, D.D. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *New England Journal of Medicine* **324**:961-964.
8. Clark, S.J., Saag, M.S., Decker, W.D. 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine* **324**:954-960.
9. Albert J., Abrahamsson B., Nagy K, Aurelius E., Gaines H., Nystrom G., Fenyo E.M. 1990. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* **4**:107-112.
10. Horsburgh, C.R. Jr., Ou, C.Y., Jason, J., Holmberg, S.D., Longini, I.M. Jr., Schable, C., Mayer, K.H., Lifson, A.R., Schochetman, G., Ward, J.W, et al. 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* **16**:637-640.
11. Schnittman, S.M., Psallidopoulos, M.C., Lane, H.C., Thompson, L., Baseler, M., Massari, F., Fox, C.H., Salzman, N.P., Fauci, A.S. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**:305-308. Erratum in: *Science* 1989 245, preceding 694.
12. Schnittman, S.M., Greenhouse, J.J., Psallidopoulos, M.C., Baseler, M., Salzman, N.P., Fauci, A.S., Lane, H.C. 1990. Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Annals of Internal Medicine* **113**:438-443.
13. Pantaleo, G., Graziosi, C., Fauci, A.S. 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *New England Journal of Medicine* **328**:327-335.
14. Piatak, M. Jr., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Lifson, J.D. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**:1749-1754.
15. Fauci, A.S., Schnittman, S.M., Poli, G., Koenig, S., Pantaleo, G. 1991. NIH conference: immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Annals of Internal Medicine* **114**:678-693.

16. Coffin, J.M. 1995. HIV-1 population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**:483-489.
17. Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-126.
18. Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emini, E.A., Deutsch, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., Hahn, B.H., et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**:117-122.
19. O'Brien, W.A., Hartigan, P.M., Martin, D., Esinhardt, J., Hill, A., Benoit, S., Rubin, M., Simberkoff, M.S., Hamilton, J.D. 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *New England Journal of Medicine* **334**:426-431.
20. Welles, S.L., Jackson, J.B., Yen-Lieberman, B., Demeter, L., Japour, A.J., Smeaton, L.M., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., D'Aquila, R.T., Reichelderfer, P.A., Richman, D.D., Reichman, R., Fischl, M., Dolin, R., Coombs, R.W., Kahn, J.O., McLaren, C., Todd, J., Kwok, S., Crumpacker, C.S. 1996. Prognostic value of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1) RNA levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no zidovudine therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116A/116B/117 Team. *Journal of Infectious Diseases* **174**:696-703.
21. Coombs, R.W., Welles, S.L., Hooper, C., Reichelderfer, P.S., D'Aquila, R.T., Japour, A.J., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., Richman, D.D., Kwok, S., Todd, J., Jackson, J.B., DeGruttola, V., Crumpacker, C.S., Kahn, J. 1996. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups. *Journal of Infectious Diseases* **174**:704-712.
22. Hammer, S., Crumpacker, C., D'Aquila, R., Jackson, B., Lathey, J., Livnat, D., Reichelderfer, P. 1993. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *Journal of Clinical Microbiology* **31**:2557-2564.
23. Schochetman, G., George, J.R., ed. AIDS testing: a comprehensive guide to technical, medical, social, legal and management issues. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1994.
24. Mulder, J., McKinney, N., Christopherson, C., Sninsky, J., Greenfield, L., Kwok, S. 1994. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Application to acute retroviral infection. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:292-300.
25. Dewar, R.L., Highbarger, H.C., Sarmiento, M.D., Todd, J.A., Vasudevachari, M.B., Davey, R.T. Jr., Kovacs, J.A., Salzman, N.P., Lane, H.C., Urdea, M.S. 1994. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *Journal of Infectious Diseases* **170**:1172-1179.
26. van Gemen, B., Kievits, T., Schukkink, R., van Strijp, D., Malek, L.T., Sooknanan, R., Huisman, H.G., Lens, P. 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection. *Journal of Virological Methods* **43**:177-187.
27. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection – Recommendations for a public health approach. World Health Organization HIV/AIDS Programme, Geneva. 2016.
28. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**:1350-1354.

29. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
30. Mullis, K.B., Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335-350.
31. Q. Meng, C. Wong, A. Rangachari, S. Tamatsukuri, M. Sasaki, E. Fiss, L. Cheng, T. Ramankutty, D. Clarke, H. Yawata, Y. Sakakura, T. Hirose, and C. Impraim. 2001. Automated Multiplex Assay System for Simultaneous Detection of Hepatitis B Virus DNA, Hepatitis C Virus RNA, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. *Journal of Clinical Microbiology* **39** (8):2937-2945.
32. Smith, E.S., Li, A.K., Wang, A.M., Gelfand, D.H., Myers, T.M. 2003. Amplification of RNA: High-Temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-Activated Thermostable DNA Polymerase. In *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Dieffenbach C.W. and Dveksler G.S., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 211-219.
33. Kwok, S., Sninsky, J.J. 1993. PCR detection of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA sequences. In: *Diagnostic Molecular Biology: Principles and Applications*. eds. Persing, D.H., Smith, T.F., Smith, F.C., et al. ASM, Washington, D.C.
34. Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
35. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. **10**:413-417.
36. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.
37. Holmes, H., Davis, C., Heath, A., Hewlett, I. and Lelie, N. 2001. An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques. *Journal of Virological Methods* **92**:141-150.
38. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
39. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Wayne, PA:CLSI, 2005.
40. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.
41. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, and Korber B: HIV-1 Nomenclature proposal: A reference guide to HIV-1 classification. In: *Human Retroviruses and AIDS 1999: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences* (Kuiken C, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, Mellors JW, Mullins JI, Sodroski J, and Wolinsky S, eds.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1999, pp. 492-505.
42. Davis, C., Berry, N., Heath, A. and Holmes, H. 2008. An international collaborative study to establish a replacement World Health Organization International Standard for human immunodeficiency virus 1 RNA nucleic acid assays. *Vox Sanguinis* **95**: 218-225.

## Información de revisión del documento

Doc Rev. 19.0  
01/2022

Se ha actualizado la referencia a Metódica ms\_09411763190 de la **PSC** para reflejar la nueva tarjeta M/N de la **PSC**.

Se han actualizado las ilustraciones 8 y 9 para hacerlas compatibles con la metódica ms\_09411763190 de la **PSC**.

Se ha incluido el símbolo Rx Only en la primera página.

Se ha incluido el apartado **Asistencia técnica**.

Se ha incluido la declaración "Fabricado en".

Se han eliminado las direcciones del distribuidor.

Se ha incluido la dirección del importador.

Se ha actualizado el apartado **Marcas registradas y patentes**.

Se ha actualizado la página de símbolos armonizados.

Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.

## Asistencia técnica

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



Roche Molecular Systems, Inc.  
1080 US Highway 202 South  
Branchburg, NJ 08876 USA  
[www.roche.com](http://www.roche.com)

Fabricado en los EE. UU.



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, Germany

## **Marcas registradas y patentes**

Este producto está cubierto por una o más patentes de EE. UU. con n.º 8097717, 8192958 y 6727067, y por las patentes equivalentes extranjeras.

COBAS, COBAS P, AMPERASE, AMPLICOR, AMPLIPREP, AMPLILINK y TAQMAN son marcas comerciales de Roche.

La marca comercial "Armored RNA<sup>®</sup>" es propiedad de Asuragen, Inc. y Cenetron Diagnostics, Ltd.

ProClin<sup>®</sup> es una marca comercial registrada de Rohm and Haas Company.

THERMOMIXER<sup>®</sup> es una marca registrada de Eppendorf AG, Hamburgo (Alemania).

El resto de nombres de productos y marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios.

La tecnología de prevención de contaminación cruzada de la enzima AmpErase<sup>®</sup> está protegida por la patente estadounidense 7,687,247 propiedad de Life Technologies y con licencia para Roche Molecular Systems, Inc.

Algunos componentes de este producto están cubiertos por una o varias patentes de EE. UU. y por sus equivalentes internacionales propiedad de Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc. y con licencia para Roche Molecular Systems, Inc. y F. Hoffman-La Roche Ltd.

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

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.

01/2022

05328268001-19

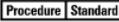
Doc Rev. 19.0



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Str. 116  
68305 Mannheim  
Germany



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

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