

cobas® TaqScreen West Nile Virus Test for use on the cobas® s 201 system



PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

cobas® TaqScreen West Nile Virus Test	WNV	96 Tests	P/N: 04741722190
cobas® TaqScreen West Nile Virus Control Kit	WNV CTL	6 Sets	P/N: 04741749190
cobas® TaqScreen Wash Reagent	TS WR	5.1 L	P/N: 04404220190
cobas® TaqScreen Cadaveric Specimen Diluent Kit	CADV SPEC DIL	96 Tests	P/N: 05002125190

Además de los kits indicados más arriba, el usuario necesita el siguiente kit para analizar muestras cadavéricas con la prueba **cobas®** TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental:

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	1
Lista de tablas.....	2
USO PREVISTO.....	3
RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA.....	3
PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO.....	3
<i>Pooling y pipeteo automatizado de muestras con el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD.....</i>	4
<i>Preparación automática de las muestras con el equipo COBAS® AmpliPrep.....</i>	4
<i>Amplificación automatizada de ácido nucleico con el analizador COBAS® TaqMan®.....</i>	4
<i>Transcripción inversa y amplificación mediante PCR.....</i>	4
<i>Amplificación selectiva.....</i>	4
<i>Detección automatizada en tiempo real de productos de PCR mediante el analizador COBAS® TaqMan®.....</i>	5
<i>Detección de productos de PCR.....</i>	5
<i>Gestión automatizada de datos mediante el programa PDM.....</i>	5
MATERIALES SUMINISTRADOS POR ROCHE.....	6
OTROS MATERIALES NECESARIOS DE VENTA INDEPENDIENTE (POSIBILIDAD DE COMPRA A ROCHE).....	7
<i>Instrumentos y programas para el sistema cobas® s 201.....</i>	7
<i>Bandejas y material fungible.....</i>	7
REACTIVOS.....	8
REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN.....	11
PRECAUCIONES.....	12
PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	14
RECOGIDA, ALMACENAMIENTO Y POOLING DE MUESTRAS.....	14
<i>Muestras de donantes vivos.....</i>	14
<i>Muestras cadavéricas.....</i>	16
POOLING Y PIPETEO DE MUESTRAS.....	17
NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO.....	17
INSTRUCCIONES DE USO.....	18
CONTROL DE CALIDAD.....	21

RESULTADOS.....	22
<i>Pooling secundario</i>	22
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.....	23
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO.....	23
MUESTRAS DE DONANTES VIVOS.....	23
<i>Reproducibilidad</i>	23
<i>Sensibilidad analítica (estándares sanitarios de Canadá, linaje 1)</i>	25
<i>Sensibilidad analítica (estándar secundario de Roche para el VNO, linaje 1)</i>	26
<i>Sensibilidad analítica (panel del virus del Nilo Occidental del CBER/FDA, linaje 1)</i>	27
<i>Sensibilidad analítica (panel QWN701 de cualificación de ARN del virus del Nilo Occidental, linaje 2)</i>	28
<i>Especificidad analítica: posibles microorganismos de reacción cruzada e interferentes</i>	29
<i>Especificidad analítica: otros estados de enfermedad</i>	30
<i>Posibles sustancias interferentes</i>	30
<i>Sustancias causantes de interferencias endógenas</i>	30
<i>Sustancias causantes de interferencias exógenas</i>	30
MUESTRAS DE DONANTES CADAVERÍCOS.....	31
<i>Reproducibilidad</i>	31
<i>Especificidad</i>	32
<i>Sensibilidad analítica con muestras cadavéricas con el estándar secundario de Roche para el VNO</i> ... 32	
<i>Sensibilidad</i>	33
RENDIMIENTO CLÍNICO: MUESTRAS DE DONANTES VIVOS.....	34
<i>Sensibilidad clínica: pruebas de muestras positivas conocidas para el virus del Nilo Occidental</i>	34
<i>Especificidad clínica</i>	34
<i>Resultados de las pruebas de pooling</i>	35
<i>Resultados de las pruebas individuales</i>	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37

Lista de tablas

<i>Tabla 1: Prueba cobas[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental: resultados de reproducibilidad</i>	24
<i>Tabla 2: Resumen de sensibilidad analítica con el estándar sanitario de Canadá del virus del Nilo Occidental</i>	25
<i>Tabla 3: Resumen de sensibilidad analítica con el estándar secundario de Roche para el VNO</i>	26
<i>Tabla 4: Resumen de sensibilidad analítica con el panel del virus del Nilo Occidental del CBER/FDA</i>	27
<i>Tabla 5: Resumen de sensibilidad analítica con el panel QWN701 de cualificación de ARN del virus del Nilo Occidental, linaje 2</i>	28
<i>Tabla 6: Microorganismos analizados</i>	29
<i>Tabla 7: Resumen de reproducibilidad de muestras cadavéricas y de donantes vivos: resultados por lote del kit</i>	31
<i>Tabla 8: Resumen de reproducibilidad de muestras cadavéricas y de donantes vivos: resultados por par usuario-instrumento</i>	31
<i>Tabla 9: Resumen de las pruebas con la prueba cobas[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental para la especificidad de muestras cadavéricas y de donantes vivos</i>	32
<i>Tabla 10: Resumen de sensibilidad analítica con el estándar secundario de Roche para el VNO en muestras cadavéricas moderadamente hemolizadas</i>	33

Tabla 11: Resumen de sensibilidad analítica con el estándar secundario de Roche para el VNO en la matriz de muestras altamente hemolizadas.....	33
Tabla 12: Resumen de sensibilidad del VNO con muestras cadavéricas moderadamente hemolizadas (MH) y altamente hemolizadas (AH).....	34
Tabla 13: Sensibilidad clínica de muestras positivas conocidas para el virus del Nilo Occidental.....	34
Tabla 14: Especificidad clínica de la prueba cobas [®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental: pruebas de pooling.....	35
Tabla 15: Especificidad clínica de la prueba cobas [®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental: pruebas individuales.....	36

USO PREVISTO

La prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental, diseñada para su uso con el sistema **cobas**[®] s 201, es una prueba cualitativa *in vitro* para la detección del ARN del virus del Nilo Occidental (VNO) en plasma humano.

Esta prueba está diseñada como una prueba de cribado de donantes para detectar el ARN del VNO en muestras de plasma de donantes humanos individuales, incluyendo donantes de sangre entera y componentes sanguíneos y otros donantes vivos. Esta prueba también se puede utilizar en muestras de plasma para cribar donantes de órganos individuales cuando las muestras se obtienen mientras todavía late el corazón del donante y en muestras de sangre de donantes cadavéricos (a corazón parado). Esta prueba no está diseñada para su uso en muestras de sangre del cordón umbilical.

El plasma de todos los donantes se puede cribar como muestras individuales. En el caso de las donaciones de sangre entera y componentes sanguíneos, las muestras de plasma se pueden analizar en pools compuestos por un máximo de seis alícuotas iguales de muestras individuales. En el caso de los donantes cadavéricos de órganos y tejidos (a corazón parado), las muestras de plasma y suero solamente se pueden cribar como muestras individuales.

Esta prueba no está diseñada para utilizarse como ayuda para el diagnóstico.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El virus del Nilo Occidental es un miembro de la familia Flaviviridae, el género Flavivirus y el serocomplejo del virus de la encefalitis japonesa. Los virus de este complejo son arbovirus que pueden causar meningitis, encefalitis y meningoencefalitis. Otros miembros del grupo de la encefalitis japonesa son el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la encefalitis del Valle de Murray, el virus de Kunjin (que ahora se sabe que es una variante del VNO) y el virus de la encefalitis de St. Louis; éste último fue responsable de una epidemia de encefalitis en EE.UU. a mediados de los años 70^{1,2}.

La prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental es una prueba cualitativa que permite el cribado y la detección del ARN del VNO en donaciones de muestras individuales y en pool infectadas. La prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental utiliza una técnica genética de preparación de ácido nucleico en el equipo COBAS[®] AmpliPrep. El ARN del VNO se detecta mediante la amplificación automática por PCR en tiempo real en el analizador COBAS[®] TaqMan[®]. La prueba incorpora un control interno para supervisar el rendimiento en cada prueba individual además de la enzima AmpErase para reducir la posible contaminación a causa de material anteriormente amplificado (amplión).

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental que se utiliza en el sistema **cobas**[®] s 201 se basa en 4 procesos principales:

1. Pooling automatizado de muestras y pipeteo de controles con el pipeteador opcional Hamilton MICROLAB[®] STAR/STARlet IV D
2. Preparación automática de las muestras con el equipo COBAS[®] AmpliPrep
3. Amplificación automatizada de ácido nucleico y detección automatizada en tiempo real de productos de PCR mediante el analizador COBAS[®] TaqMan[®]
4. Gestión automática de los datos con el programa Pooling and Data Management (PDM)

Pooling y pipeteo automatizado de muestras con el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD

El pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD automatiza el pipeteo de pools y muestras de donantes individuales, la transferencia de alícuotas a placas de pocillos profundos (opcional) y el pipeteo de controles de las pruebas. El sistema **cobas[®] s 201** se utiliza para las pruebas de resolución de pools reactivos y para identificar cada una de las muestras reactivas. El sistema **cobas[®] s 201** está diseñado para procesar muestras en lotes. Un lote se define como un conjunto de muestras y controles que se pipetean, extraen, amplifican y detectan conjuntamente. Cuando finaliza el pipeteo de un lote en el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD, se transfiere toda la bandeja de muestras al equipo COBAS[®] AmpliPrep para realizar el siguiente paso del proceso.

Nota: para analizar las muestras cadavéricas, la muestra debe diluirse primero manualmente en una proporción de 1:5 con el diluyente para muestras cadavéricas cobas[®] TaqScreen (CADV SPEC DIL) antes de pipetearlas con el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD.

Preparación automática de las muestras con el equipo COBAS[®] AmpliPrep

Los ácidos nucleicos de las dianas y las moléculas de control interno (IC) de Armored RNA añadidas (utilizadas como control del proceso de preparación y amplificación/detección de las muestras) se procesan simultáneamente. La prueba **cobas[®] TaqScreen** para la detección del virus del Nilo Occidental contiene reactivos que deben utilizarse en los cinco pasos secuenciales en el equipo COBAS[®] AmpliPrep. La solución de proteasa digiere las proteínas para propiciar la lisis, inactivar las nucleasas y facilitar la liberación de ARN y ADN de las partículas víricas. La adición de reactivo de lisis a las muestras provoca una lisis vírica y la inactivación de las nucleasas mediante la desnaturalización de las proteínas. El ARN y el ADN se liberan y se protegen simultáneamente de las nucleasas. Los ácidos nucleicos liberados se unen a la superficie de sílice de las micropartículas magnéticas añadidas. Esto se produce principalmente a causa de la carga positiva neta en la superficie de las micropartículas magnéticas y la carga negativa de los ácidos nucleicos en la concentración de sal caotrópica junto con la fuerza iónica de la reacción de la lisis. El reactivo de lavado elimina las sustancias no unidas y las impurezas como, por ejemplo, las proteínas desnaturalizadas, los restos de células y potenciadores inhibidores de la PCR (hemoglobina, etc.) y reduce la concentración de sal. Los ácidos nucleicos purificados se liberan de las micropartículas magnéticas a una temperatura elevada mediante el tampón de elución.

Amplificación automatizada de ácido nucleico con el analizador COBAS[®] TaqMan[®]

Tras el aislamiento de los ácidos nucleicos purificados durante la preparación automatizada de las muestras, se utiliza la mezcla maestra de la prueba **cobas[®] TaqScreen (WNV MMX)** para la amplificación y detección del ARN del VNO y el ARN del IC. Una vez activada mediante la adición de acetato de manganeso, la WNV MMX permite la transcripción inversa, seguida de la amplificación por PCR de regiones muy conservadas de ARN del VNO y ARN del IC utilizando cebadores específicos. La detección simultánea del ADN amplificado se consigue mediante la generación de señales fluorescentes de la degradación 5'-nucleolítico del VNO y sondas específicas de IC también presentes en la WNV MMX. Se utilizan dos marcadores fluorescentes: un marcador etiqueta la sonda del IC y el segundo marca la sonda específica de la diana que permiten la identificación independiente del VNO y del IC.

Transcripción inversa y amplificación mediante PCR

Las reacciones de transcripción inversa y amplificación se realizan con una enzima recombinante termoestable, la ADN polimerasa Z05. En presencia de manganeso (Mn²⁺), la ADN polimerasa Z05 exhibe actividades tanto de transcriptasa inversa como de polimerasa de ADN. Esto permite que la transcripción inversa y la amplificación por PCR se produzcan en la misma mezcla de reacción.

La amplificación mediante PCR se realiza con la ADN polimerasa Z05, que extiende los cebadores alineados a lo largo de las plantillas diana para producir un ADN bicatenario (amplión). Este proceso se repite durante varios ciclos, en cada uno de los cuales se dobla la cantidad de ADN amplión. La amplificación tiene lugar únicamente en la región de los genomas dianas entre los cebadores; no se amplifican los genomas completos.

Amplificación selectiva

La amplificación selectiva del ácido nucleico diana de la muestra se logra en la prueba **cobas[®] TaqScreen** para la detección del virus del Nilo Occidental mediante el uso de la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) y el trifosfato de desoxiuridina (dUTP). La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen desoxiuridina³, pero no del ADN que contiene desoxitimidina o del ARN con ribouridina^{4,5}. El ADN natural carece de desoxiuridina, que sin embargo está siempre presente en los

amplicones debido al empleo de trifosfato de desoxiuridina con trifosfato de timidina como uno de los dNTP del reactivo WNV MMX; por lo tanto, solamente el amplicón contiene desoxiuridina. La desoxiuridina permite que la enzima AmpErase pueda destruir el amplicón contaminante antes de la amplificación del ARN diana. Además, la enzima AmpErase destruye cualquier producto inespecífico que se pueda formar tras la activación inicial de WNV MMX por el manganeso. La enzima AmpErase, incluida en el reactivo WNV MMX, cataliza la escisión del ADN que contiene desoxiuridina en 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 amplicón se rompe en la posición de la desoxiuridina, por lo que el ADN ya no puede amplificarse. La enzima AmpErase continúa inactiva durante un periodo de tiempo prolongado una vez que se ha expuesto a temperaturas superiores a los 55 °C y, por lo tanto, no destruye el amplicón diana formado tras la PCR.

Detección automatizada en tiempo real de productos de PCR mediante el analizador COBAS® TaqMan®

Durante la amplificación por PCR, la elevada temperatura intermitente durante el ciclado desnaturaliza el amplicón diana y del IC para formar ADN monocatenario. Las sondas de oligonucleótidos específicas para la detección se hibridan con la cadena sencilla del ADN amplificado. Los procesos de amplificación, hibridación y detección se producen simultáneamente.

Detección de productos de PCR

La mezcla maestra de la prueba **cobas® TaqScreen (WNV MMX)** contiene sondas específicas para la detección del ácido nucleico del VNO o el IC. Cada sonda de detección se marca con dos marcadores fluorescentes, uno que actúa como marcador emisor y otro como marcador enmascarador. Un marcador emisor específico se asocia a la sonda específica para la diana y se mide en una longitud de onda definida. Un segundo marcador emisor se asocia a la sonda específica del IC y se mide en una longitud de onda diferente. En las dos sondas se utiliza un solo tipo de marcador enmascarador. Este sistema permite la detección de las dianas del VNO amplificadas a una longitud de onda y la detección simultánea del ácido nucleico del IC amplificado a otra longitud de onda.

Antes de comenzar la amplificación por PCR, las sondas están intactas y la fluorescencia del marcador emisor se suprime con el marcador enmascarador debido a la transferencia de energía de tipo Förster. Durante la amplificación por PCR, las sondas se hibridan con secuencias de ADN monocatenario específicas y se escinden por la actividad de la nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa Z05 en el momento en que se lleva a cabo la amplificación. Una vez que el marcador emisor y el marcador enmascarador se separan mediante esta escisión, se desenmascara la actividad fluorescente del marcador emisor. Con cada ciclo de PCR, se generan cantidades crecientes de sondas escindidas y la señal acumulada del marcador emisor aumenta concomitantemente.

La detección en tiempo real de los productos de PCR se consigue mediante la medición de la fluorescencia de los marcadores emisores liberados que representan las dianas del VNO y el IC independientemente^{6, 7}.

Gestión automatizada de datos mediante el programa PDM

El programa Roche PDM Data Manager permite al usuario revisar e informar de los resultados. Roche PDM Data Manager asigna los resultados a las pruebas indicando si son no reactivas, reactivas o no válidas. Además de recuperar y examinar los resultados de la PCR, el programa Roche PDM permite al usuario imprimir informes, buscar resultados, aceptar resultados de los donantes y, si se desea, enviar los resultados a un SIL.

MATERIALES SUMINISTRADOS POR ROCHE

Se necesitan los tres kits suministrados para la detección del ARN del VNO en muestras de plasma:

(1) Prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental, (2) kit de control **cobas**[®] TaqScreen para el virus del Nilo Occidental y (3) reactivo de lavado **cobas**[®] TaqScreen. Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.

cobas[®] TaqScreen West Nile Virus Test
(P/N: 04741722 190)

WNV

96 pruebas

WNV CS1

(Casete de reactivo de micropartículas magnéticas para VNO)

WNV CS2

(Casete de reactivos de lisis para VNO)

WNV CS3

(Casete de multireactivos para VNO)

WNV CS4

(Casete de reactivo específico para la prueba del VNO)

cobas[®] TaqScreen West Nile Virus Control Kit

Kit de control **cobas**[®] TaqScreen para el virus del Nilo Occidental
(P/N: 04741749 190)

WNV CTL

6 juegos

WNV (+) C

(Control positivo para VNO)

WNV (-) C

[Control negativo para VNO (plasma humano)]

cobas[®] TaqScreen Wash Reagent

Reactivo de lavado **cobas**[®] TaqScreen
(P/N: 04404220 190)

TS WR

5,1 l

TS WR

(Reactivo de lavado **cobas**[®] TaqScreen)

Nota: para la detección del ARN del VNO en muestras cadavéricas se necesita el siguiente kit además de los indicados anteriormente: kit de diluyente para muestras cadavéricas **cobas[®] TaqScreen.**

cobas[®] TaqScreen Cadaveric Specimen Diluent Kit

Kit de diluyente para muestras cadavéricas **cobas**[®] TaqScreen
(P/N: 05002125 190)

CADV SPEC DIL

96 pruebas

CADV SPEC DIL

(Diluyente para muestras cadavéricas **cobas**[®] TaqScreen)

OTROS MATERIALES NECESARIOS DE VENTA INDEPENDIENTE (POSIBILIDAD DE COMPRA A ROCHE)

Esta prueba se debe realizar en el sistema **cobas® s 201**. El sistema **cobas® s 201** debe instalarlo un representante de Servicio Técnico de Roche Diagnostics, sistema que debe utilizarse como una configuración completa de sistema. Los componentes individuales del sistema **cobas® s 201** no se pueden utilizar como dispositivos independientes ni deben sustituirse por otros componentes. El sistema **cobas® s 201** utiliza los componentes que se indican a continuación. Consulte la tarjeta de información del producto para obtener información detallada.

Instrumentos y programas para el sistema **cobas® s 201**

- Pipeteador Hamilton MICROLAB STAR y/o STARlet IVD (opcional), estación de trabajo y programa Pooling Manager
- Equipo COBAS® AmpliPrep
- Analizador COBAS® TaqMan®
- Ordenador para el programa AMPLILINK y programa
- Servidor Roche PDM Data Manager, estación de trabajo y programa Data Manager
- Manual del usuario del sistema **cobas® s 201**: configuración D
- Archivo de definiciones de pruebas para la detección del VNO para la prueba COBAS® TaqScreen para la detección del VNO

Bandejas y material fungible

- Bandejas de muestras (SK24) para COBAS® AmpliPrep (P/N: 28122172001)
- Bandejas de SPU de COBAS® AmpliPrep (P/N: 05471664001)
- Bandejas de reactivos para COBAS® AmpliPrep (P/N: 28122199001)
- Cubetas de reacción (SPU): (P/N: 03755525001)
- Tubos de entrada de muestra (tubos S) con clips de código de barras (P/N: 03137040001)
- Bandejas de puntas K (P/N: 03287343001)
- Caja de tubos K, 12 x 96 (P/N: 03137082001)
- Gradilla de tubos K para COBAS® TaqMan® (P/N: 28150397001)
- Puntas CO-RE de gran volumen (1.000 µl), filtro (P/N: 04639642001)
- Placas de pocillos profundos con etiquetas de código de barras (P/N: 04639634001)
- Tapas para placa de pocillos profundos (P/N: 04789288001)
- Transportador de muestras para 24 tubos de muestras (P/N: 04639502001)
- Transportador de muestras para 32 tubos de muestras (P/N: 04639529001)
- Bandeja de puntas (P/N: 04639545001)
- Bandeja de placa de pocillos profundos (P/N: 04639553001)
- Adaptador de bandejas SK24 (P/N: 04639600001)
- Aerosol desinfectante Microcide SQ™ o HAMILTON (P/N: 04592557001)
- Guantes desechables, sin polvo

REACTIVOS

cobas® TaqScreen West Nile Virus Test 96 pruebas (P/N: 04741722190)			
Componentes del kit	Composición del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia*
WNV CS1 MGP (Micropartículas magnéticas)	Micropartículas magnéticas 93 % de isopropanol**	2 x 48 pruebas 2 x 7,0 ml	<p>PELIGRO H225: Líquido y vapores muy inflamables. H319 Provoca irritación ocular grave. H336 Puede provocar somnolencia o vértigo. P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. P233 Mantener el recipiente herméticamente cerrado. P261 Evitar respirar la niebla o los vapores. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección/protección para los oídos. P303 + P361 + P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Enjuagar la piel con agua. P370 + P378 En caso de incendio: utilizar arena seca, polvo químico seco o espuma resistente al alcohol para la extinción. 67-63-0 Propan-2-ol</p>

cobas® TaqScreen West Nile Virus Test
96 pruebas (P/N: 04741722190)

Componentes del kit	Composición del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia*
<p>WNV CS2 LYS (Reactivo de lisis)</p>	<p>Citrato de sodio dihidratado 42,5 % de tiocianato de guanidina < 14 % de polidocanol 0,9 % de ditiotreitol</p>	<p>2 × 48 pruebas 2 × 78 ml</p>	 <p>PELIGRO H302 Nocivo en caso de ingestión. H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. H411 Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. EUH032 En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. EUH071 Corrosivo para las vías respiratorias. P273 Evitar su liberación al medio ambiente. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección/protección para los oídos. P303 + P361 + P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Enjuagar la piel con agua. P304 + P340 + P310 EN CASO DE INHALACIÓN: transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P305 + P351 + P338 + P310 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P391 Recoger los derrames. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol</p>
<p>WNV CS3 Pase (Solución de proteinasa)</p>	<p>Tampón TRIS < 0,05 % de EDTA Cloruro de calcio Acetato de calcio ≤ 7,8 % de proteinasa Glicerol</p>	<p>2 × 48 pruebas 2 × 3,8 ml</p>	<p>EUH210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad. EUH208: Contiene subtilisina de <i>Bacillus subtilis</i>. Puede provocar una reacción alérgica.</p>

cobas® TaqScreen West Nile Virus Test
96 pruebas (P/N: 04741722190)

Componentes del kit	Composición del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia*
WNV EB (Tampón de elución para VNO)	Tampón TRIS ≤ 0,002 % de ARN poli Ar (sintético) EDTA 0,09 % de azida sódica	2 × 7,0 ml	
WNV CS4 WNV MMX (Mezcla maestra para VNO)	Buffer Tricina Acetato de potasio Glicerol < 18 % de dimetilsulfóxido < 0,07 % de dATP, dCTP, dGTP y dUTP < 0,002 % de cebadores ascendente y descendente del VNO < 0,002 % de sonda con marcación fluorescente para VNO < 0,002 % de sonda con marcación fluorescente para el control interno < 0,002 % de aptámero oligonucleótido < 0,05 % de ADN polimerasa Z05 (microbiana) < 0,1 % de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) 0,08 % de azida sódica	2 × 48 pruebas 2 × 2,5 ml	No aplicable
WNV Mn²⁺ (Solución de manganeso para VNO)	< 0,6 % de acetato de manganeso Ácido acético glacial 0,09 % de azida sódica	2 × 19,8 ml	
WNV IC (Control interno para VNO)	Tampón TRIS ≤ 0,002 % de ARN poli Ar (sintético) EDTA 0,05 % de azida sódica < 0,001 % de ARN sintético no infeccioso de control interno encapsulado en proteína recubierta de bacteriófago MS2	2 × 3,6 ml	

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

** Sustancia peligrosa

cobas® TaqScreen West Nile Virus Control Kit
(Kit de control cobas® TaqScreen para el virus del Nilo Occidental)

(P/N: 04741749190)

WNV CTL

6 juegos

WNV (+) C

(Control positivo para VNO)

Buffer TRIS

≤ 0,002 % de ARN poli Ar (sintético)

EDTA

0,05 % de azida sódica

< 0,001 % de ARN sintético no infeccioso de VNO

encapsulado en proteína recubierta de bacteriófago MS2

6 × 1,1 ml

WNV (-) C

(Control negativo para VNO [plasma humano])

Plasma humano negativo, no reactivo según pruebas autorizadas para anticuerpos frente al HCV, anticuerpos frente al HIV-1/2 y HBsAg; ARN del VNO no detectable mediante métodos de PCR

0,1 % de conservante ProClin® 300

12 × 1,6 ml

cobas® TaqScreen Wash Reagent
(Reactivo de lavado cobas® TaqScreen)

(P/N: 04404220190)

TS WR

5,1 l

TS WR

(Reactivo de lavado cobas® TaqScreen)

Citrato de sodio dihidratado

0,1 % de conservante metilparabeno

cobas® TaqScreen Cadaveric Specimen Diluent Kit
(Kit de diluyente para muestras cadavéricas cobas® TaqScreen)

(P/N: 05002125190)

CADV SPEC DIL

96 pruebas

CADV SPEC DIL

(Diluyente para muestras cadavéricas cobas® TaqScreen)

EDTA

4 × 100 ml

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

- La temperatura ambiente debe oscilar entre 15 y 30 °C.
- No congele los reactivos ni los controles.
- Almacene los reactivos **WNV CS1**, **WNV CS2**, **WNV CS3** y **WNV CS4** a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C. Sin usar, estos reactivos se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada.
- Una vez en uso, los reactivos se mantienen estables durante 30 días si se conservan a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra antes.

- E. Los reactivos se pueden utilizar para un total de 6 series analíticas, hasta acumular un máximo de 40 horas en el equipo COBAS® AmpliPrep. Entre uso y uso, los reactivos deben almacenarse a una temperatura entre 2 y 8 °C. El programa AMPLILINK supervisa las horas de uso acumuladas de los casetes de reactivos en el equipo COBAS® AmpliPrep y bloquea los casetes para impedir que se utilicen cuando llegan a acumular 40 horas.
- F. Los reactivos se mantienen estables durante un total de 24 horas seguidas en el equipo COBAS® AmpliPrep. El programa AMPLILINK no supervisa el número de horas seguidas que los casetes de reactivos permanecen en el equipo, así como tampoco el número de series analíticas para las que se han utilizado los casetes. Es responsabilidad del usuario desechar los casetes de reactivos cuando se alcanzan 24 horas seguidas o se han realizado 6 series analíticas en el equipo.
- G. Almacene los controles **WNV (+) C** y **WNV (-) 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.
- H. Almacene el reactivo **TS WR** a una temperatura comprendida entre 15 y 30 °C. Sin abrir, **TS WR** se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abierto, este reactivo se mantiene estable durante 30 días a una temperatura entre 15 y 30 °C o hasta su fecha de caducidad, lo que ocurra antes.
- I. Almacene el diluyente **CADV SPEC DIL** a una temperatura comprendida entre 15 y 30 °C. El diluyente se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abierto, deben desecharse las partes sobrantes de diluyente que queden en el contenedor.

PRECAUCIONES

PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

- A. Las muestras pueden ser infecciosas. Adopte las precauciones generales cuando realice la prueba^{8,9}. Sólo el personal experto en el uso de la prueba **cobas**® TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental y formado en la manipulación de materiales infecciosos debería llevar a cabo este procedimiento. Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo del laboratorio usando una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5% en agua destilada o desionizada. A continuación, límpielas con un trapo impregnado de etanol al 70%.
- B. **PRECAUCIÓN: WNV (-) C contiene plasma humano derivado de sangre humana. El material original se ha analizado y no se ha considerado reactivo a la presencia de anticuerpos frente al HIV-1/2, al HCV y al HBsAg. El análisis del plasma humano negativo mediante métodos de PCR no muestra niveles detectables de ARN del VNO. Ningún método de prueba conocido puede garantizar totalmente que un producto derivado de la sangre humana no transmitirá agentes infecciosos. Todos los materiales procedentes de la sangre humana deben considerarse potencialmente infecciosos y manipularse teniendo en cuenta las precauciones generales.** En caso de que se produzca un derrame, desinfecte de inmediato con una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5% (lejía diluida) o siga los procedimientos apropiados del laboratorio.
- C. Adopte las precauciones rutinarias del laboratorio. No pipetee con la boca. No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo. Utilice guantes desechables, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule las muestras y los kit de reactivos. Lávese a conciencia las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit.
- D. **WNV EB, WNV MMX, WNV Mn²⁺, WNV IC y WNV (+) C** contienen azida sódica como conservante. No utilice tubos metálicos para transferir reactivos. Si las soluciones con azida sódica se desechan en un sistema de cañerías, es preciso diluirlas y dejar correr abundante agua. Estas precauciones son recomendables para evitar la acumulación de depósitos en los tubos metálicos en los que podrían producirse explosiones.
- E. **Se ha demostrado que la heparina inhibe la PCR. No utilice plasma con heparina en este procedimiento.**
- F. Se recomienda la utilización de pipetas estériles desechables y puntas de pipetas sin nucleasa. Podrían producirse falsos positivos si no se evita la contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación y el procesamiento de las mismas.
- G. Utilice sólo los consumibles suministrados o que se requieran expresamente para garantizar el óptimo rendimiento de la prueba.

- H. Manipule todos los materiales que contengan muestras o controles de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio para evitar la contaminación cruzada de las muestras o los controles.
- I. Antes de utilizarlos, revise cada casete de reactivo, tubo de control y reactivo de lavado para asegurarse de que no hay signos de fugas. No utilice el material si hay alguna evidencia de fuga.
- J. Elimine todos los materiales que hayan estado en contacto con las muestras y los reactivos de acuerdo con la reglamentación nacional, federal, estatal y local.
- K. No utilice la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental, el kit de control **cobas**[®] TaqScreen del virus del Nilo Occidental ni el reactivo de lavado **cobas**[®] TaqScreen ni el kit de diluyente para muestras cadavéricas **cobas**[®] TaqScreen con posterioridad a la fecha de caducidad. No intercambie, mezcle ni combine reactivos de distintos kits o lotes. No cargue lotes de reactivos mezclados en el equipo COBAS[®] AmpliPrep.
- L. Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.
- M. Evite el contacto de reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. **En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua para evitar quemaduras.** Si se producen salpicaduras de reactivos, diluya las manchas con agua antes de secarlas con un paño. **No permita que LYS, que contiene tiocianato de guanidina, entre en contacto con la solución de hipoclorito de sodio (lejía). Tales mezclas pueden producir gases de alta toxicidad.**
- N. Siga al pie de la letra los procedimientos y las directrices que se suministran para garantizar la correcta realización de la prueba. Cualquier variación de dichos procedimientos y directrices podría afectar al rendimiento óptimo de la prueba.
- O. Evite el uso de muestras de donantes vivos excesivamente hemolizadas.
- P. La contaminación con glóbulos rojos de las muestras de plasma (> 5%) puede inhibir la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental.
- Q. No utilice ningún componente que tenga dañada la etiqueta del código de barras en ninguna de las fases de la prueba.
- R. Durante el análisis de las muestras de donantes cadavéricos, las muestras cuyo color oscila entre el paja y el rosa se clasifican como moderadamente hemolizadas y aquellas cuyo color varía del rojo al rojo oscuro y el marrón se clasifican como muestras altamente hemolizadas.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- A. Equilibre los reactivos y los controles **cobas**[®] TaqScreen para el VNO a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de su uso.

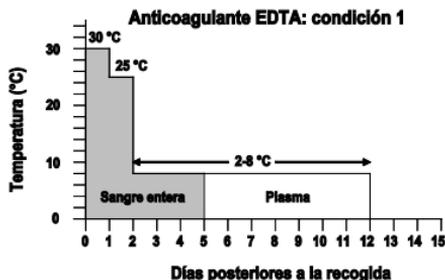
RECOGIDA, ALMACENAMIENTO Y POOLING DE MUESTRAS

Nota: manipule todas las muestras como si fueran agentes infecciosos.

Muestras de donantes vivos

- A. Las muestras de plasma recogidas con EDTA, tubos para preparación de plasma con EDTA BD, CPD, CPDA1, CP2D, ACDA y citrato de sodio al 4% pueden utilizarse con la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección de virus del Nilo Occidental. Siga las instrucciones del fabricante de los tubos de muestras. La estabilidad de las muestras se ve afectada por las temperaturas elevadas.
- B. La sangre recogida en anticoagulantes K2 EDTA y K3 EDTA puede almacenarse en una de las tres condiciones siguientes.

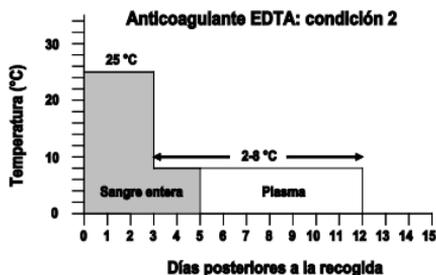
En la condición 1, la sangre puede almacenarse durante un máximo de 24 horas a una temperatura entre 2 y 30 °C, seguido de 24 horas a una temperatura entre 2 y 25 °C, a su vez seguido de 72 horas a una temperatura entre 2 y 8 °C antes de la separación del plasma. Si va a almacenar la sangre más de cinco días, separe el plasma de los glóbulos rojos mediante centrifugación a 800 - 1.600 x g durante 20 minutos. Después de la extracción, el plasma puede almacenarse a una temperatura entre 2 y 8 °C durante un período de siete días, seguido de 30 días a ≤ -20 °C.



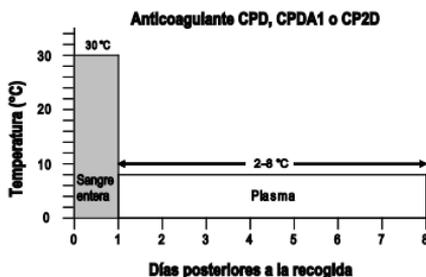
En la condición 2, la sangre puede almacenarse durante un máximo de 72 horas a una temperatura entre 2 y 25 °C, seguido de 48 horas a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C, antes de la separación del plasma. Si va a almacenar la sangre más de cinco días, separe el plasma de los glóbulos rojos mediante centrifugación a 800 - 1.600 x g durante 20 minutos. Después de la extracción, el plasma puede almacenarse a una temperatura entre 2 y 8 °C durante un período de siete días, seguido de 30 días a ≤ -20 °C.

En la condición 3, la sangre recogida en tubos para preparación de plasma con EDTA BD puede almacenarse durante un máximo de 24 horas a una temperatura entre 2 y 25 °C antes de la centrifugación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la centrifugación, los tubos para preparación de plasma con EDTA BD pueden almacenarse durante ocho días a una temperatura entre 2 y 8 °C.

El plasma conservado en K2 EDTA y K3 EDTA puede congelarse y descongelarse tres (3) veces como máximo. El ciclo de congelación/descongelación no se ha evaluado para los tubos para preparación de plasma con EDTA BD.



- C. La sangre recogida con anticoagulantes CPD, CPDA1 o CP2D puede almacenarse un máximo de 24 horas a una temperatura entre 2 y 30 °C antes de la separación del plasma. Si va a almacenar la sangre más de un día, separe el plasma de los glóbulos rojos mediante centrifugación a 800 - 1.600 x g durante 20 minutos. Después de la extracción, el plasma puede almacenarse a una temperatura entre 2-8 °C durante siete días, seguido de 30 días a ≤ -20 °C. Para almacenarlo durante períodos más largos, el plasma separado de los glóbulos rojos puede almacenarse a una temperatura de ≤ -70 °C durante un máximo de 30 meses. El plasma en CPD, CPDA1 y CP2D puede congelarse y descongelarse tres (3) veces como máximo.



- D. El plasma obtenido por aféresis con los anticoagulantes ACDA o citrato de sodio al 4% puede almacenarse a temperaturas comprendidas entre 2 y 30 °C durante un máximo de 24 horas desde el momento de la extracción. El plasma obtenido por aféresis puede almacenarse a ≤ -20 °C durante un máximo de 30 días. El plasma obtenido por aféresis con los anticoagulantes ACDA o citrato de sodio al 4% puede congelarse y descongelarse tres (3) veces como máximo.
- E. Las siguientes directrices sobre volumen de plasma se basan en el pipeteo de los tubos de donantes de 13 x 100 mm (de cristal o plástico) en el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD. Los volúmenes relacionados son para el plasma situado en la parte superior de los glóbulos rojos envasados y se aplican cuando se realiza la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección de virus del Nilo Occidental.

Tipo de pool	Volumen mínimo de plasma
Pool primario de 6*	3 ml
Pool primario de 1*	3 ml
Pool de repetición desde tubo	1,5 ml
Pool de resolución desde tubo	2 ml

*Incluye la creación de placas de pocillos profundos

- F. **No congele la sangre entera.**
- G. **Se ha demostrado que la heparina inhibe la PCR. No se recomienda el uso de muestras con heparina.**
- H. Las placas de pocillos profundos tapadas pueden almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C durante un máximo de siete días a partir de la fecha en la que se extrajo el plasma de los glóbulos rojos. Asimismo, las placas de pocillos profundos tapadas pueden almacenarse a ≤ -18 °C para períodos más largos.
- I. No se observó ningún efecto adverso en la prueba cuando las muestras de plasma se sometieron a tres (3) ciclos de congelación y descongelación.
- J. Antes de utilizarlas, atempe las muestras de donantes individuales o en pool hasta alcanzar la temperatura ambiente.
- K. Si se van a transportar las muestras, es recomendable envasarlas y etiquetarlas de acuerdo con la reglamentación federal e internacional relativa al transporte de muestras y agentes etiológicos¹⁰.
- L. **Podrían producirse falsos positivos si no se evita la contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación y el procesamiento de las mismas.**

Muestras cadavéricas

- A. Las muestras de sangre cadavéricas recogidas en tubos con anticoagulante EDTA o en tubos de suero pueden utilizarse con la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. Siga las instrucciones del fabricante de los tubos de muestras. La estabilidad de las muestras se ve afectada por las temperaturas elevadas.
- B. La sangre cadavérica recogida con anticoagulante EDTA puede almacenarse un máximo de 24 horas a una temperatura comprendida entre 2 y 25 °C antes de la separación del plasma. Si va a almacenar la sangre más de un día, separe el plasma de los glóbulos rojos mediante centrifugación a 800 - 1.600 x g durante 20 minutos. Después de la extracción, el plasma puede almacenarse a una temperatura entre 2 y 8 °C durante un período adicional de siete días, seguido de otros 30 días a ≤ -18 °C. El plasma EDTA cadavérico puede congelarse y descongelarse tres (3) veces como máximo.
- C. La sangre cadavérica recogida como suero puede almacenarse un máximo de 24 horas a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C (4 horas de las cuales puede mantenerse a 2-25 °C) antes de la separación del plasma. Si va a almacenar la sangre más de un día, separe el suero del coágulo mediante centrifugación a 800 - 1.600 x g durante 20 minutos. Después de la extracción, las muestras de suero pueden almacenarse a una temperatura de entre 2 y 8 °C durante tres días. Además, en el caso del suero separado del coágulo, las muestras cadavéricas moderadamente hemolizadas pueden almacenarse a una temperatura de ≤ -18 °C durante un máximo de 15 días, y las muestras de suero cadavéricas altamente hemolizadas, a ≤ -18 °C hasta 8 días. Las muestras de suero cadavéricas pueden congelarse y descongelarse tres (3) veces como máximo.
- D. Las muestras cadavéricas diluidas en una proporción de 1:5 con diluyente para muestras cadavéricas **cobas**[®] TaqScreen pueden almacenarse durante un máximo de 7 días a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C y, tras la mezcla (moviendo la pipeta hacia arriba y hacia abajo cuatro (4) veces en cada tubo), pueden analizarse con la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental.
- E. Si las muestras se van a transportar, es recomendable envasarlas y etiquetarlas de acuerdo con la reglamentación federal e internacional relativa al transporte de muestras y agentes etiológicos¹⁰.
- F. **Podrían producirse falsos positivos si no se evita la contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación y el procesamiento de las mismas.**

POOLING Y PIPETEO DE MUESTRAS

1. El sistema **cobas[®] s 201** utiliza el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD para realizar las actividades de pipeteo y pooling. El pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD lleva cabo la lectura de código de barras y las operaciones de pooling de las alícuotas iguales del volumen de muestra para formar un pool.
2. Cuando la prueba **cobas[®] TaqScreen** para la detección del virus del Nilo Occidental detecta pools reactivos, se utiliza el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD para pipetear las muestras individuales desde las placas de pocillos profundos o los tubos de muestras originales para realizar las pruebas de resolución.

NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

A. Equipo

1. Prepare el sistema **cobas[®] s 201** para utilizarlo de acuerdo con las instrucciones del *Manual del usuario del sistema cobas[®] s 201*.
2. Lleve a cabo el mantenimiento recomendado de los instrumentos para garantizar un funcionamiento adecuado.

B. Reactivos

1. La prueba **cobas[®] TaqScreen** para la detección del virus del Nilo Occidental, el kit de control **cobas[®] TaqScreen** para el virus del Nilo Occidental y el reactivo de lavado **cobas[®] TaqScreen** se deben equilibrar a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de su uso. Consulte el apartado *Requisitos de almacenamiento y manipulación* para conocer las condiciones de almacenamiento de los reactivos.
2. Cada kit de la prueba **cobas[®] TaqScreen** para la detección del virus del Nilo Occidental contiene suficiente material para procesar un total de 96 pruebas que se recomienda que se realicen en lotes formados por un máximo de 24 pruebas por bandeja SK24. Se debe procesar una réplica del control negativo [**WNV (-) C**] y una réplica del control positivo [**WNV (+) C**] con cada lote o bandeja SK24.
3. Cada kit del diluyente para muestras cadavéricas **cobas[®] TaqScreen** contiene suficiente material para procesar un total de 96 pruebas que se recomienda que se realicen en lotes formados por un máximo de 24 pruebas por bandeja SK24. Se debe procesar una réplica del control negativo [**WNV (-) C**] y una réplica del control positivo [**WNV (+) C**] con cada lote o bandeja SK24. El proceso de los controles es el mismo para el análisis de las muestras de donantes vivos y cadavéricos con la prueba **cobas[®] TaqScreen** para la detección del virus del Nilo Occidental.
4. Los controles son de un solo uso.
5. El sistema evitará el uso de reactivos que hayan excedido el número de horas permitidas en el equipo **COBAS[®] AmpliPrep** (más de 40 horas totales y de 30 días posteriores al primer uso), reactivos que hayan caducado o casetes mezclados procedentes de un juego de cuatro casetes que se haya utilizado con anterioridad en el sistema.

C. Procesamiento de las muestras

1. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras y de los controles.
2. Extrema la precaución para evitar la contaminación de las muestras y de [**WNV (-) C**] con controles positivos.

INSTRUCCIONES DE USO

El sistema **cobas® s 201** consta de cuatro procesos principales: pipeteo de muestras y controles con el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD, preparación de muestras en el equipo COBAS® AmpliPrep mediante la prueba **cobas® TaqScreen** para la detección del virus del Nilo Occidental, amplificación/detección en el analizador COBAS® TaqMan® y gestión de datos.

La configuración del sistema **cobas® s 201** permite utilizar hasta seis pipeteadores Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD, cinco estaciones de trabajo de Data Manager y diez ordenadores AMPLILINK. Cada ordenador AMPLILINK permite utilizar tres equipos COBAS® AmpliPrep y dos analizadores COBAS® TaqMan®. Consulte el *Manual del usuario del sistema cobas® s 201* para obtener información detallada sobre la configuración del sistema **cobas® s 201**.

Cada kit de la prueba **cobas® TaqScreen** para la detección del virus del Nilo Occidental contiene ocho casetes: dos casetes **WNV CS1** de micropartículas magnéticas, dos casetes **WNV CS2** de reactivo de lisis, dos casetes **WNV CS3** con proteasa y tampón de elución y dos casetes **WNV CS4** de IC, reactivo MMX y solución de manganeso. Este kit de la prueba se ha diseñado para su uso junto con el kit de control **cobas® TaqScreen** para el virus del Nilo Occidental y el reactivo de lavado **cobas® TaqScreen** y para el procesamiento de muestras cadavéricas con el kit de diluyente para muestras cadavéricas **cobas® TaqScreen**.

Nota: no abra los casetes.

Nota: no mezcle reactivos de diferentes lotes o de distintas botellas de un mismo lote.

Nota: no mezcle reactivos (incluyendo los casetes) de kits distintos. No cargue lotes de reactivos mezclados en el equipo COBAS® AmpliPrep.

Nota: no separe los tubos de controles de los adaptadores (el soporte de los tubos de control de plástico).

Nota: el programa PDM realiza el seguimiento de cada lote y hace que éstos se analicen en un único equipo COBAS® AmpliPrep y un analizador COBAS® TaqMan® vinculados al mismo ordenador AMPLILINK.

Nota: no distribuya los lotes entre más de un equipo COBAS® AmpliPrep o analizador COBAS® TaqMan®.

Lleve a cabo todas las tareas de mantenimiento tal y como se describe en el *Manual del usuario del sistema cobas® s 201*.

Consulte el *Manual del usuario del sistema cobas® s 201* para obtener información detallada. Para obtener un rendimiento correcto de la prueba es importante que el usuario siga las instrucciones del *Manual del usuario del sistema cobas® s 201*.

A. Pipeteo de controles y muestras con el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD

Nota: evite la contaminación de los guantes durante la preparación de las muestras y los controles.

Nota: invierta los controles un mínimo de 3 veces como se indica a continuación para mezclarlos, evitando la formación de burbujas.

- **Invertir una vez significa girar el control hacia abajo y hacia arriba de nuevo.**
- **Para cada inversión, mantenga el control durante 2 segundos como mínimo en cada orientación (es decir, gire el control hacia abajo y manténgalo así durante 2 segundos como mínimo. A continuación, vuelva a girar el control hacia arriba y manténgalo en esta posición durante 2 segundos como mínimo.)**

Nota: para el análisis de las muestras cadavéricas, las placas de pocillos profundos se desactivan durante la instalación del sistema cobas® s 201.

A1. Lleve a cabo los procedimientos de puesta en marcha en el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD y, a continuación, inicie el programa Roche PDM Pooling Wizard siguiendo las instrucciones que aparecen en pantalla.

- A2. Extremar la precaución para no dañar el código de barras identificador de los tubos de muestras y los adaptadores de los tubos de controles. En caso de daños, el sistema no podrá reconocer las muestras ni los controles.
- A3. Desensamblar los tubos de controles y cargar las muestras, el material fungible y los controles en el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD. Cuando las muestras, el material fungible y los controles se hayan cargado, el equipo transfiere los controles y las muestras a los tubos S. Las muestras y los controles se mantienen estables durante 5 horas en tubos abiertos y otras 5 horas en tubos S.
- A4. Para las muestras cadavéricas individuales, pipetear 2000 µl de **CADV SPEC DIL** en tubos debidamente etiquetados de 13 x 100 mm, añadir 500 µl de muestra cadavérica a cada uno de los tubos y mezclar cada muestra moviendo la pipeta hacia arriba y hacia abajo cuatro (4) veces. A continuación, introducir las muestras cadavéricas diluidas, el material fungible y los controles en el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD. Cuando las muestras cadavéricas diluidas, el material fungible y los controles se han terminado de cargar, el equipo transfiere los controles y las muestras diluidas a los tubos de muestras (tubos S). Las muestras cadavéricas diluidas y los controles VNO se mantienen estables durante 5 horas en los tubos abiertos.

Nota: para que el equipo realice una dilución 1:10 de [WNV (+) C], se deben cargar dos tubos de controles [WNV (-) C] por cada tubo de control [WNV (+) C] que se esté utilizando.

- A5. Cuando la serie analítica de pipeteo haya finalizado, revise las alarmas e imprima los informes de pooling. Revise los pools y las placas de pocillos profundos. Invalide los pools y/o pocillos si observa contaminación de glóbulos rojos o si los volúmenes no son consistentes.
- A6. Tape los tubos S y transfiera las bandejas SK24 al equipo COBAS® AmpliPrep para la extracción de ácido nucleico. Una vez transferidas al equipo COBAS® AmpliPrep, todas las dianas víricas y los controles permanecen estables durante 5 horas en los tubos S.
- A7. Tape y almacene las placas de pocillos profundos (si se crearon durante la serie analítica de pipeteo). Las placas de pocillos profundos se pueden almacenar un máximo de 7 días a temperaturas entre 2 y 8 °C o a temperaturas de ≤ -18 °C durante períodos más largos.
- A8. Retire y almacene los tubos de donantes. Consulte el apartado "Recogida, almacenamiento y pooling de muestras" para conocer las condiciones.
- A9. Retire y deseche los tubos de controles. (Los tubos de controles son de un solo uso.)

B. Preparación y carga de reactivos de la prueba cobas® TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental

Nota: extermar la precaución para no dañar las etiquetas de los casetes. El lector de código de barras del equipo COBAS® AmpliPrep lee automáticamente la etiqueta del código de barras de cada casete cuando las bandejas de reactivos se cargan en el equipo.

- B1. Equilibre los reactivos a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos antes de procesar la primera muestra. No es necesaria ninguna otra preparación de los reactivos.
- B2. Antes de comenzar, hay que cargar un número suficiente de casetes para alojar el número total de muestras que se procesará durante el funcionamiento continuo del equipo COBAS® AmpliPrep. Cada casete contiene reactivos para 48 pruebas. Consulte el *Manual de usuario del sistema cobas® s 201* para obtener información relacionada con la carga de reactivos para un funcionamiento continuo.
- B3. Introduzca el casete **WNV CS1** en la bandeja de reactivos de forma que el código de barras del casete quede alineado con el código de barras de la bandeja situado en la parte derecha de la misma. Los casetes **WNV CS1** deben cargarse juntos en una bandeja de reactivos independiente del resto de los casetes.
- B4. Cargue la bandeja de reactivos que contiene el casete **WNV CS1** en la posición A, introduciéndola hasta el tope de entrada del equipo COBAS® AmpliPrep, y, a continuación, espere a que el LED de la bandeja de reactivos se ilumine de color verde antes de introducirla hasta la parte trasera del equipo para ajustarla correctamente. No cargue lotes de reactivos mezclados en el equipo.
- B5. Introduzca un juego de casetes **WNV CS2**, **WNV CS3** y **WNV CS4** por cada casete **WNV CS1** en las bandejas de reactivos, asegurándose de que los códigos de barras de los casetes están alineados con el código de barras de la bandeja situado en la parte derecha de la misma.

- B6. Cargue las bandejas de reactivos en la posición B, C, D o E, introduciéndolas hasta el tope de entrada del equipo COBAS® AmpliPrep, y, a continuación, espere a que el LED se ilumine en verde antes de introducir las hacia la parte trasera del equipo para ajustarlas correctamente.
- B7. Las lámparas LED que aparecen en la barra de estado del equipo COBAS® AmpliPrep se iluminan en verde cuando todos los componentes necesarios del kit están cargados y son reconocidos por el sistema.

C. Extracción de ácidos nucleicos de las muestras y los controles pipeteados

Nota: lleve a cabo los siguientes pasos en una superficie limpia de la mesa de trabajo.

- C1. Quite el envoltorio del paquete de la cubeta de reacción (SPU) sin alterar la cinta ni la cubierta de plástico.
- C2. Con la pestaña larga de la bandeja de SPU mirando hacia el usuario, introduzca el paquete de la SPU en el lado derecho de la bandeja de SPU.
- C3. Retire la cinta y la cubierta de plástico de las SPU colocadas en la bandeja. Asegúrese de que las SPU están introducidas, niveladas y bien ajustadas en la bandeja. Una SPU elevada podría provocar una avería en el equipo. No presione la punta de muestras de la SPU.
- C4. Coloque las bandejas de SPU cargadas en las posiciones J, K o L del equipo COBAS® AmpliPrep hasta que la bandeja esté totalmente introducida y sea reconocida. El equipo almacenará un máximo de 72 SPU. Cargue como mínimo el número de SPU que se requiere para la serie analítica o introduzca más si es necesario.
- C5. Quite el envoltorio de celofán de las bandejas de tubos K y puntas K con precaución para no inclinar las bandejas. Asegúrese de que todas están bien asentadas.
- C6. Cargue como mínimo el número necesario de bandejas de tubos K y puntas K en las posiciones M, N, O o P del equipo COBAS® AmpliPrep.
- C7. Cargue las bandejas SK24 que contienen las muestras y los controles pipeteados con el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD en las posiciones F, G o H del equipo COBAS® AmpliPrep. Deslicelas hasta que queden bien encajadas. Compruebe el estado del sistema en la ventana "Sample" para asegurarse de que se han reconocido todas las muestras de las bandejas.
- C8. Compruebe el programa AMPLILINK para asegurarse de que se han cargado los reactivos y el material fungible adecuados para la preparación de muestras que se desea.
- C9. Pulse la opción "Start" en la estación de trabajo del programa AMPLILINK para comenzar el procedimiento de preparación de las muestras en el equipo COBAS® AmpliPrep.
- C10. Se realizará el seguimiento de las puntas K y los tubos K que no se hayan utilizado dentro del equipo COBAS® AmpliPrep para la siguiente serie analítica, si no se han descargado.

D. Amplificación y detección

Nota: la mezcla maestra de trabajo junto con las muestras procesadas contenidas en la bandeja SK24 posee una estabilidad limitada. El analizador COBAS® TaqMan® debe estar preparado para aceptar las muestras en cuanto el equipo COBAS® AmpliPrep haya terminado el procedimiento de preparación de las muestras.

- D1. Transfiera la bandeja SK24 con las muestras procesadas al analizador COBAS® TaqMan®. El analizador COBAS® TaqMan® iniciará automáticamente las tareas de amplificación y detección. La serie en el analizador COBAS® TaqMan® debe iniciarse en el plazo de 1 hora después de haber finalizado la preparación de las muestras en dicha bandeja SK24. Las bandejas SK24 parcialmente cargadas que no se hayan transferido en el plazo de 1 hora sí que pueden generar un lote válido. El programa AMPLILINK controla el tiempo permitido entre la adición de la mezcla maestra y el inicio de la amplificación/detección de cada muestra e invalida toda la bandeja si la primera muestra procesada supera el límite de tiempo.
- D2. Cuando finaliza la amplificación y detección en el analizador COBAS® TaqMan®, las muestras analizadas se transfieren automáticamente al depósito de residuos.

D3. Los resultados de la estación de trabajo del programa AMPLILINK se aceptan automáticamente.

D4. Los resultados se transfieren automáticamente al programa PDM.

E. Revisión y validación de los resultados

E1. Inicie la estación de trabajo de Roche PDM.

E2. Recupere los lotes no revisados de la pestaña "Review Batches" de la estación de trabajo de Data Manager.

E3. Revise las alarmas. Para ello, resalte un lote y haga clic en "Next".

E4. Revise los resultados de los controles que aparecen en la pestaña "Controls Review". Consulte el apartado "Control de calidad" para conocer los criterios de validez de los controles.

E5. Revise el resultado del pool en la pestaña "Pools Review" del lote seleccionado. El usuario puede invalidar manualmente los pools no reactivos si así lo precisa. Hay que volver a analizar las muestras de donantes que haya en un pool no válido.

E6. Revise y valide los donantes en la pestaña "Donor Review" del lote seleccionado.

E7. Imprima los informes y envíelos al SIL (sistema de información del laboratorio), si corresponde.

CONTROL DE CALIDAD

1. Con cada lote se debe procesar una réplica del control negativo [**WNV (-) C**] y una réplica del control positivo [**WNV (+) C**].

2. Estado del lote: cuando los controles del lote son válidos, se les asigna el estado "Complete, Valid". Si alguno de los controles del lote resulta no válido, todo el lote se considerará no válido. El programa PDM invalida automáticamente los resultados de acuerdo con los errores de los controles.

a. Control negativo

Para que el control negativo [**WNV (-) C**] sea válido, el resultado debe interpretarse como no reactivo y el control interno asociado debe ser válido. Si el control interno no es válido, el resultado del control negativo se interpreta como no válido. Si el resultado del control negativo se interpreta como no válido, el lote entero no será válido y tendrá que repetirse.

b. Control positivo

Para que el control positivo [**WNV (+) C**] sea válido, el resultado debe interpretarse como reactivo y el control interno asociado debe ser válido. Si el control interno no es válido, el resultado del control positivo se interpreta como no válido. Si el resultado del control positivo se interpreta como no válido, el lote entero no será válido y tendrá que repetirse.

3. Control interno de las muestras de donantes

a. Para que una muestra de donante arroje un resultado válido no reactivo (-), el control interno asociado debe ser válido; de lo contrario, el resultado no reactivo será no válido y tendrá que volverse a analizar la muestra de donante.

b. Para que una muestra de donante tenga un resultado válido reactivo, el control interno asociado puede ser tanto válido como no válido.

RESULTADOS

1. Los resultados de las muestras serán válidos sólo si el lote que las contiene es válido. Consulte el apartado *Control de calidad* para conocer los criterios de aceptación. Se miden dos parámetros para cada muestra: uno para la diana de VNO y el otro para el control interno.
2. El programa PDM informa de los resultados de donantes finales de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental de la forma siguiente:

Estado	Significado
Completed Non-Reactive	El donante no es reactivo al VNO.
Completed Reactive	El donante es reactivo al VNO.
Completed Unresolved	El límite de tiempo de viabilidad ha caducado antes de que al donante se le asignara un estado reactivo o no reactivo. No se pueden realizar más análisis en el sistema para este donante. (Consulte el <i>Manual del usuario del sistema cobas</i> [®] s 201 para obtener una descripción del límite de tiempo de viabilidad.)

Pooling secundario

Debe realizarse una prueba de repetición de los tubos de donante con un resultado de pool o individual inválido. Cuando las pruebas forman parte de un pool y el sistema **cobas**[®] s 201 informa que ese pool es reactivo, los donantes asociados al pool reciben una solicitud de pool para un pooling secundario y se utiliza el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD para pipetear las muestras de donantes individuales de las placas de pocillos profundos o de los tubos de muestras originales. La prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental se utiliza para identificar la muestra reactiva individual utilizando los mismos métodos (testados en muestra individual) que para las muestras en un pool.

Si una o más de las muestras individuales de un pool es reactiva, las muestras reactivas se indican como "Completed Reactive" y el resto de muestras negativas asociadas al pool positivo inicial se indican como "Completed, Non-reactive". Si todas las muestras de donantes individuales de ese pool son negativas, las muestras del pool se informan todas como "Completed, Non-reactive".

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. La prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental se ha evaluado para ser utilizada sólo en combinación con el kit de control **cobas**[®] TaqScreen para el virus del Nilo Occidental, el reactivo de lavado **cobas**[®] TaqScreen y el sistema **cobas**[®] s 201.
2. Para el análisis de muestras cadavéricas, la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental se ha evaluado para ser utilizada sólo en combinación con el kit de diluyente para muestras cadavéricas **cobas**[®], el kit de control **cobas**[®] TaqScreen para el virus del Nilo Occidental, el reactivo de lavado **cobas**[®] TaqScreen y el sistema **cobas**[®] s 201.
3. Se ha demostrado que la heparina inhibe la PCR. No utilice plasma con heparina en este procedimiento.
4. La obtención de resultados fiables depende de que los procedimientos de obtención y transporte de muestras sean adecuados.
5. La detección del ARN del VNO 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) o la fase de infección y el tamaño del pool.
6. Para la preparación automatizada de los pools de plasma sólo se ha validado el pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD para utilizarlo con la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. Siga las instrucciones del hardware y las precauciones de seguridad que se describen en el *Manual del usuario del sistema cobas*[®] s 201 y en el Manual del usuario del pipeteador Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD.
7. Los miembros del serocomplejo de la encefalitis japonesa (virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis del Valle de Murray, virus de la encefalitis de St. Louis y virus de Kunjin) también pueden ser reactivos con la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental.
8. Aunque es poco probable, las mutaciones en la región muy conservada del genoma vírico cubierta por los cebadores y/o la sonda de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental pueden causar errores en la detección de un virus.
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. Los usuarios deberán adherirse a las políticas y los procedimientos específicos.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

MUESTRAS DE DONANTES VIVOS

Reproducibilidad

La reproducibilidad de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental con el sistema **cobas**[®] s 201 se estableció mediante el análisis de paneles ciegos aleatorios de 21 miembros compuestos por seis muestras de plasma negativo, seis muestras de plasma positivo en concentraciones de 0,49x el límite de detección (LOD) de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental y tres muestras de plasma positivo en concentraciones de 2,5x, 5x y 10x el LOD. Las pruebas se realizaron en 3 ubicaciones con 1 usuario en cada una de ellas utilizando 3 lotes de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental y 1 sistema **cobas**[®] s 201. En cada ubicación se analizaron 4 paneles con los controles positivos y los controles negativos asociados al día durante 5 días, para un total de 180 pruebas de cada miembro del panel. Todos los datos de reproducibilidad válidos fueron evaluados mediante el cálculo del porcentaje de resultados reactivos para cada nivel del panel. Los datos se analizaron por lote de kit, ubicación/usuario, día/serie analítica y de forma global (Tabla 1). Este estudio ha demostrado el rendimiento constante de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental entre lotes de kits y ubicaciones/usuarios y días/series analíticas.

Tabla 1:
Prueba cobas® TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental:
resultados de reproducibilidad

Concentración	Lote del kit	Porcentaje de resultados negativos por lote del kit	Ubicación/ Usuario	Porcentaje de resultados negativos por ubicación/usuario	Día/ Serie analítica*	Porcentaje de resultados negativos por día/serie analítica	Porcentaje global (CI del 95%)**
Entre lotes		Entre ubicaciones		Entre ensayos		Total	
Negativo	A	100,0 (359/359)	1	100,0 (360/360)	1	100,0 (209/209)	100,0 (1077/1077) (99,7; 100,0)
	B	100,0 (359/359)	2	100,0 (359/359)	2	100,0 (198/198)	
	C	100,0 (359/359)	3	100,0 (358/358)	3	100,0 (209/209)	
					4	100,0 (192/192)	
					5	100,0 (203/203)	
					6	100,0 (66/66)	
Concentración	Lote del kit	Porcentaje de resultados reactivos por lote del kit	Ubicación/ Usuario	Porcentaje de resultados reactivos por ubicación/ usuario	Día/ Serie analítica*	Porcentaje de resultados reactivos por día/serie analítica	Porcentaje global (CI del 95%)**
Entre lotes		Entre ubicaciones		Entre ensayos		Total	
0,49x LOD	A	73,9 (264/357)	1	75,5 (271/359)	1	71,5 (148/207)	73,4 (791/1077) (70,7; 76,1)
	B	72,2 (260/360)	2	74,7 (269/360)	2	68,2 (135/198)	
	C	74,2 (267/360)	3	70,1 (251/358)	3	74,6 (156/209)	
					4	78,1 (150/192)	
					5	74,6 (153/205)	
					6	74,2 (49/66)	
2,5x LOD	A	99,4 (179/180)	1	100,0 (180/180)	1	100,0 (105/105)	99,8 (538/539) (99,0; 100,0)
	B	100,0 (179/179)	2	100,0 (179/179)	2	100,0 (98/98)	
	C	100,0 (180/180)	3	99,4 (179/180)	3	100,0 (105/105)	
					4	100,0 (96/96)	
					5	99,0 (101/102)	
					6	100,0 (33/33)	
5,0x LOD	A	99,4 (178/179)	1	100,0 (180/180)	1	99,0 (103/104)	99,8 (537/538) (99,0; 100,0)
	B	100,0 (179/179)	2	100,0 (179/179)	2	100,0 (99/99)	
	C	100,0 (180/180)	3	99,4 (178/179)	3	100,0 (104/104)	
					4	100,0 (96/96)	
					5	100,0 (102/102)	
					6	100,0 (33/33)	
10,0x LOD	A	100,0 (179/179)	1	100,0 (180/180)	1	100,0 (105/105)	100,0 (539/539) (99,3; 100,0)
	B	100,0 (180/180)	2	100,0 (179/179)	2	100,0 (98/98)	
	C	100,0 (180/180)	3	100,0 (180/180)	3	100,0 (105/105)	
					4	100,0 (96/96)	
					5	100,0 (102/102)	
					6	100,0 (33/33)	

* Hubo un 6º día porque se repitieron los lotes no válidos del 1º al 5º día.

** CI del 95% = intervalo de confianza binomial exacto del 95%

Sensibilidad analítica (estándares sanitarios de Canadá, linaje 1)

El límite de detección (LOD) de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental se evaluó mediante el estándar sanitario de referencia de Canadá del virus del Nilo Occidental¹¹ (Infectious Diseases, Canadian Blood Services, 1800 Alta Vista, Ottawa, Ontario, K1G 4J5). Los paneles se prepararon mediante dilución del estándar en plasma humano normal negativo al virus. Cada dilución se analizó mediante tres lotes diferentes de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. Se analizó un total de 30 réplicas por lote del kit para un total de 90 réplicas por concentración. Con los datos combinados de todas las réplicas analizadas se determinó el límite de detección según la tasa de positividad con el límite inferior del intervalo de confianza (unilateral) al 95%; también se usó el análisis PROBIT para estimar el LOD al 95% y los intervalos de confianza fiducial bilateral al 95% para el panel (Tabla 2). El LOD estimado al 95% mediante el estándar sanitario de Canadá, linaje 1, fue de 40,3 copias/ml.

Tabla 2:
Resumen de sensibilidad analítica con el estándar sanitario de Canadá del virus del Nilo Occidental

Entrada nominal (copias/ml)	Número de reactivos	Número de pruebas individuales	% de reactivos	Límite inferior del intervalo de confianza (unilateral) al 95%
0	0	89*	0	N/A
5	10	90	11,1	6,2%
10	43	90	47,8	38,7%
20	70	90	77,8	69,4%
25	74	90	82,2	74,3%
30	76	90	84,4	76,8%
35	85	90	94,4	88,7%
50	89	90	98,9	94,8%
Análisis PROBIT	Tasa de detección (%)	Concentración (copias/ml)	Límite inferior del intervalo de confianza del 95% (copias/ml)	Límite superior del intervalo de confianza del 95% (copias/ml)
	95	40,3	35,1	47,8

* Una réplica no fue válida.

Sensibilidad analítica (estándar secundario de Roche para el VNO, linaje 1)

El límite de detección (LOD) de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental se evaluó mediante el estándar secundario de Roche para el VNO (stock del virus del Nilo Occidental de Zeptomatrix, NY 2001-6263, Lote nº 302142, calibrado según el estándar sanitario de referencia de Canadá del virus del Nilo Occidental). Los paneles se prepararon mediante dilución del estándar en plasma humano normal negativo al virus. Cada dilución se analizó mediante tres lotes diferentes de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. Se analizó un total de 64 réplicas por lote del kit para un total de 192 réplicas por concentración. Con los datos combinados de todas las réplicas analizadas se determinó el límite de detección según la tasa de positividad con el límite inferior del intervalo de confianza (unilateral) al 95%; también se usó el análisis PROBIT para estimar el LOD al 95% y los intervalos de confianza fiducial bilateral al 95% para el panel (Tabla 3). El LOD del 95% estimado mediante el estándar secundario de Roche para el VNO, linaje 1, fue de 36,9 copias/ml.

Tabla 3:
Resumen de sensibilidad analítica con el estándar secundario de Roche para el VNO

Entrada nominal (copias/ml)	Número de reactivos	Número de pruebas individuales	% de reactivos	Límite inferior del intervalo de confianza (unilateral) al 95%
0	0	192	0	N/A
5	68	192	35,4	29,7%
10	110	191*	57,6	51,4%
20	153	192	79,7	74,3%
25	173	192	90,1	85,8%
30	182	192	94,8	91,3%
35	183	192	95,3	92,0%
50	187	192	97,4	94,6%
Análisis PROBIT	Tasa de detección (%)	Concentración (copias/ml)	Límite inferior del intervalo de confianza del 95% (copias/ml)	Límite superior del intervalo de confianza del 95% (copias/ml)
	95	36,9	32,7	42,6

* Una réplica no fue válida.

Sensibilidad analítica (panel del virus del Nilo Occidental del CBER/FDA, linaje 1)

El límite de detección (LOD) de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para el virus del Nilo Occidental se evaluó mediante el panel del virus del Nilo Occidental del CBER/FDA. El panel consta de 14 miembros derivados de un aislado del virus del Nilo Occidental humano, linaje 1 (Hu2002) y un aislado del virus del Nilo Occidental de flamenco, linaje 1 (NY99) (producido para CBER por BBI Diagnostics, 375 West Street, West Bridgewater, MA 02379). Cada miembro del panel se analizó por duplicado con tres lotes diferentes de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental (Tabla 4).

Tabla 4:
Resumen de sensibilidad analítica con el panel del virus del Nilo Occidental del CBER/FDA

ID de miembro	Aislado de linaje 1	Entrada nominal (copias/ml)	Reactivo (%)
CBER/FDA – 03	Hu2002	0	0% (0/6)
CBER/FDA – 05	NY99	0	0% (0/6)
CBER/FDA – 09	Hu2002	5	50% (3/6)
CBER/FDA – 10	NY99	5	83% (5/6)
CBER/FDA – 12	Hu2002	10	50% (3/6)
CBER/FDA – 02	NY99	10	33% (2/6)
CBER/FDA – 04	Hu2002	50	100% (6/6)
CBER/FDA – 13	NY99	50	100% (6/6)
CBER/FDA – 07	Hu2002	100	100% (6/6)
CBER/FDA – 01	NY99	100	100% (5/5)*
CBER/FDA – 14	Hu2002	500	100% (6/6)
CBER/FDA – 11	NY99	500	100% (6/6)
CBER/FDA – 08	Hu2002	1000	100% (6/6)
CBER/FDA – 06	NY99	1000	100% (6/6)

* Una réplica no fue válida.

Sensibilidad analítica (panel QWN701 de cualificación de ARN del virus del Nilo Occidental, linaje 2)

El límite de detección (LOD) de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental se evaluó mediante el panel QWN701 de cualificación de ARN del virus del Nilo Occidental, linaje 2 (stock del virus del Nilo Occidental, linaje 2^{12,13}, Uganda, BBI Diagnostics, 375 West Street, West Bridgewater, MA 02379). El proveedor calibró el stock del virus mediante un ensayo de RT/PCR basado en tecnología TaqMan^{®14}. Los paneles se prepararon mediante dilución de los estándares en plasma humano normal negativo al virus. Cada dilución se analizó mediante tres lotes diferentes de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. Se analizó un total de 30 réplicas por lote del kit para un total de 90 réplicas por concentración. Con los datos combinados de todas las réplicas analizadas se determinó el límite de detección según la tasa de positividad con el límite inferior del intervalo de confianza (unilateral) al 95%; también se usó el análisis PROBIT para estimar el LOD al 95% y los intervalos de confianza fiducial bilateral al 95% para el panel (Tabla 5). El LOD estimado al 95% mediante el panel QWN701 de cualificación de ARN del virus del Nilo Occidental, linaje 2, fue de 3,8 copias/ml.

Tabla 5:
Resumen de sensibilidad analítica con el panel QWN701 de cualificación de ARN del virus del Nilo Occidental, linaje 2

Entrada nominal (copias/ml)	Número de reactivos	Número de pruebas individuales	% de reactivos	Límite inferior del intervalo de confianza (unilateral) al 95%
0,00	0	90	0	N/A
0,25	22	90	24	17,2%
0,50	29	90	32	24,1%
1,00	48	90	53	44,1%
1,50	68	90	76	67,0%
3,00	85	90	94	88,7%
5,00	90	90	100	96,7%
Análisis PROBIT	Tasa de detección (%)	Concentración (copias/ml)	Límite inferior del intervalo de confianza del 95% (copias/ml)	Límite superior del intervalo de confianza del 95% (copias/ml)
	95	3,8	2,3	11,1

Especificidad analítica: posibles microorganismos de reacción cruzada e interferentes

La especificidad analítica de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental se evaluó mediante el análisis de un panel de 52 microorganismos, incluyendo 47 aislados víricos, 4 cepas bacterianas y 1 aislado de levadura (Tabla 6). Los microorganismos se añadieron a plasma humano normal negativo al virus y se analizaron con y sin virus del Nilo Occidental añadido a una concentración de 3x el límite de detección de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. Salvo en el caso de los 4 aislados de la familia del virus de la encefalitis japonesa (virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis del Valle de Murray, virus de la encefalitis de St. Louis y virus de Kunjin), la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental tuvo resultados no reactivos para todas las muestras de microorganismos sin virus del Nilo Occidental añadido y se obtuvieron resultados reactivos para todas las muestras de microorganismos con virus del Nilo Occidental añadido. Los 4 aislados de la familia del virus de la encefalitis japonesa fueron reactivos en las 8 réplicas de la prueba. Cabía esperar dichos resultados debido a que estos virus comparten homología de secuencia de nucleótidos con el virus del Nilo Occidental y con los cebadores y las sondas que se emplean en la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental.

Tabla 6:
Microorganismos analizados

Adenovirus tipo 2	Virus de la hepatitis C, genotipo 6	HIV-1 subtipo A
Adenovirus tipo 3	Células MJ (G11) productoras de HTLV-I	HIV-1 subtipo B
Adenovirus tipo 7	Células MJ (C5/MJ) productoras de HTLV-I	HIV-1 subtipo C
<i>Candida albicans</i>	Células (MoT) productoras de HTLV-II	HIV-1 subtipo D
Citomegalovirus Davis	Genoma completo del HTLV-II (DeltaH6H11)	HIV-1 subtipo E
Citomegalovirus Towne	Virus del herpes simple tipo I, F	HIV-1 subtipo F
Virus de Epstein-Barr RAJ1	Virus del herpes simple tipo I, HF	HIV-1 subtipo G
Virus de Epstein-Barr P3	Virus del herpes simple tipo I, Maclntyre	HIV-1 subtipo H
Virus de la hepatitis A (PA 21)	Virus del herpes simple tipo II, G	HIV-2
Virus de la hepatitis B, genotipo A	Virus del herpes simple tipo II, MS	<i>Pneumocystis carinii</i> D&D
Virus de la hepatitis B, genotipo B	Virus del papiloma humano tipo 11	<i>Propionibacterium acnes</i>
Virus de la hepatitis C, genotipo 1a	Virus del papiloma humano tipo 18	<i>Staphylococcus aureus</i>
Virus de la hepatitis C, genotipo 1b	Virus del papiloma humano tipo 6B	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Virus de la hepatitis C, genotipo 2a	Virus de la gripe A (A/New Jersey/8/76)	Virus de la encefalitis japonesa
Virus de la hepatitis C, genotipo 2b	Virus de la gripe B (B/Hong Kong/5/72)	Virus de la encefalitis del Valle Murray
Virus de la hepatitis C, genotipo 3	Virus de la varicela zóster, cepa Ellen	Virus de la encefalitis de Saint Louis
Virus de la hepatitis C, genotipo 4	Virus de la varicela zóster, cepa Oka	Virus de Kunjin
Virus de la hepatitis C, genotipo 5		

Especificidad analítica: otros estados de enfermedad

Se analizaron muestras de plasma de 10 - 20 pacientes de cada una de las siguientes categorías de enfermedad (infección por citomegalovirus, infección del virus de la hepatitis A, infección del virus de la hepatitis B, infección del virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) e infección por el virus de Epstein Barr) con y sin VNO añadido a una concentración de 3x el límite de detección de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. La prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental tuvo resultados no reactivos para todas las muestras de estados de enfermedad sin añadir VNO y resultados reactivos para todas las muestras de estados de enfermedad cuando se añadió VNO. Estos estados de enfermedad no influyeron en la sensibilidad o especificidad de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental.

Posibles sustancias interferentes

Sustancias causantes de interferencias endógenas

Se analizaron muestras de plasma con niveles anómalamente elevados de triglicéridos (hasta 2487 mg/dl), hemoglobina (hasta 516 mg/dl), bilirrubina (hasta 23,5 mg/dl) o albúmina (hasta 6.900 mg/dl) con y sin virus del Nilo Occidental añadido a una concentración de 3x el límite de detección de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. Estas sustancias endógenas no influyeron en la sensibilidad o especificidad de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental.

Se analizaron muestras de plasma con enfermedades autoinmunitarias definidas (anticuerpos antinucleares positivos, factor reumatoide positivo y lupus eritematoso sistémico) con y sin virus del Nilo Occidental añadido a una concentración de 3x el límite de detección de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. Estas sustancias endógenas no influyeron en la sensibilidad o especificidad de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental.

Se analizaron muestras de plasma con glóbulos rojos añadidos a niveles anómalamente elevados (hasta el 10% v/v) con y sin virus del Nilo Occidental añadido a una concentración de 3x el límite de detección de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. El plasma con glóbulos rojos añadidos al 10% (v/v) sí influyó en la sensibilidad o especificidad de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental.

Sustancias causantes de interferencias exógenas

Se analizaron muestras de plasma con concentraciones muy elevadas de acetaminofeno (1.324 µmol/l), ácido acetilsalicílico (3,62 µmol/l), atorvastatina (600 Eq/l), fluoxetina (11,2 µmol/l), loratadina (0,78 µmol/l), nadolol (3,88 µmol/l), naproxeno (2.170 µmol/l), paroxetina (3,04 µmol/l), sertralina (1,96 µmol/l), ácido ascórbico (284 µmol/l), ibuprofeno (2.425 µmol/l) y fenilefrina HCl (327,5 µmol/l) con y sin virus del Nilo Occidental añadido a una concentración de 3x el límite de detección de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. Estas sustancias exógenas no influyeron en la sensibilidad o especificidad de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental.

MUESTRAS DE DONANTES CADAVÉRICOS

Reproducibilidad

Se añadieron veinte muestras de plasma de donantes vivos conservadas en EDTA y 20 muestras de plasma cadavéricas individuales conservadas en EDTA con una diana vírica del VNO utilizando un estándar secundario del VNO de Roche hasta conseguir una concentración final de 3x el límite de detección (LOD), según sea necesario para el nivel de hemólisis presente en cada muestra. Las muestras cadavéricas se diluyeron manualmente con diluyente para muestras cadavéricas **cobas[®] TaqScreen** en una proporción 1:5 y se analizaron mediante el procedimiento de análisis para muestras cadavéricas. Cada una de las 20 muestras de donantes vivos y cadavéricos se analizó de manera individual por parte de 2 operadores con tres lotes de kit de la prueba **cobas[®] TaqScreen** para la detección del virus del Nilo Occidental. Se asignó un usuario a cada sistema **cobas[®] s 201** para crear dos pares usuario-instrumento.

Se analizaron todos los datos de reproducibilidad válidos comparando las tasas de reacción del VNO añadido a las muestras de donantes vivos y cadavéricos de tres lotes de kit distintos (tabla 7) y de dos pares usuario-instrumento (tabla 8). Los resultados se evaluaron utilizando la prueba exacta de Fisher unilateral para determinar la importancia de las diferencias existentes en las tasas de reacción de las muestras de donantes vivos y cadavéricos.

Tabla 7:
Resumen de reproducibilidad de muestras cadavéricas y de donantes vivos:
resultados por lote del kit

Diana vírica	Tipo de donante	Lote n° 1	Lote n° 2	Lote n° 3	valor p de muestras de donantes vivos vs. muestras cadavéricas
WNV	Cadavérico	40 / 40 (100%)	39 / 39* (100%)	40 / 40 (100%)	1,0
	Vivo	39 / 39* (100%)	39 / 39* (100%)	40 / 40 (100%)	
Valor p unilateral de muestras de donantes vivos vs. cadavéricos por lote de reactivo		1,0	1,0	1,0	

* Una réplica no fue válida.

Nota: los valores p de la prueba exacta de Fisher superiores a 0,05 no revisten importancia estadística.

Tabla 8:
Resumen de reproducibilidad de muestras cadavéricas y de donantes vivos:
resultados por par usuario-instrumento

Diana vírica	Tipo de donante	Usuario-Instrumento n.º 1	Usuario-Instrumento n.º 2	valor p de muestras de donantes vivos vs. muestras cadavéricas
WNV	Cadavérico	60 / 60 (100%)	59 / 59* (100%)	1,0
	Vivo	59 / 59* (100%)	59 / 59* (100%)	
Valor p unilateral de muestras de donantes vivos vs. cadavéricos por par usuario-instrumento		1,0	1,0	

* Una réplica no fue válida.

Nota: los valores p de la prueba exacta de Fisher superiores a 0,05 no revisten importancia estadística.

Especificidad

Se dividieron setenta muestras de plasma individuales de donantes vivos conservadas en EDTA y setenta y una muestras de plasma individuales cadavéricas conservadas en EDTA con un resultado negativo para el ARN del VNO en tres grupos y cada grupo de muestras se analizó con uno de los tres lotes de los kits de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. Las muestras de plasma cadavéricas conservadas en EDTA se dividieron en tres grupos de 25, 21 y 25 muestras y se diluyeron manualmente con diluyente para muestras cadavéricas **cobas**[®] TaqScreen en una proporción 1:5 y se analizaron mediante el procedimiento de análisis para muestras cadavéricas. Las muestras de plasma de donantes vivos conservadas en EDTA se dividieron en tres grupos de 25, 20 y 25 muestras y se diluyeron manualmente en una proporción de 1:6 con un pool de plasma conservado en EDTA negativo para el ARN del VNO antes del análisis a fin de simular los pools de seis procedimientos de análisis recomendados para la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental.

En cuanto a las muestras cadavéricas, se obtuvieron sesenta y nueve resultados válidos con tres lotes de kit. Los sesenta y nueve resultados dieron un resultado negativo de la reactividad al ARN del VNO, lo que supone una especificidad del 100%. En cuanto a las muestras de donantes vivos, se obtuvieron setenta resultados válidos con los tres mismos lotes de kit. Una de las muestras dio un resultado reactivo tras el análisis inicial, pero al realizar el análisis por segunda vez, se obtuvo un resultado no reactivo para el ARN del VNO. La tabla 9 que aparece a continuación presenta un resumen de los resultados de especificidad de esta prueba.

Tabla 9:
Resumen de las pruebas con la prueba cobas[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental para la especificidad de muestras cadavéricas y de donantes vivos

Lote de reactivos	Muestras de donantes cadavéricos			Muestras de donantes vivos (dilución 1:6)		
	Número de resultados válidos	Número de resultados no reactivos	Número de resultados reactivos	Número de resultados válidos	Número de resultados no reactivos	Número de resultados reactivos
Lote nº 1	23	23	0	25	25	0
Lote nº 2	21	21	0	20	20	0
Lote nº 3	25	25	0	25	24	1**
Total	69*	69	0	70	69	1
Especificidad	100%			98,6%		

*Excluye los resultados no válidos iniciales.

** Resultados no reactivos con repetición de análisis por duplicado.

Sensibilidad analítica con muestras cadavéricas con el estándar secundario de Roche para el VNO

El límite de detección (LOD) de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para el virus del Nilo Occidental en muestras de plasma cadavéricas conservadas en EDTA se evaluó mediante el estándar secundario de Roche para el VNO (stock del virus del Nilo Occidental de Zeptomatrix, NY 2001-6263, Lote nº 302142, calibrado según el estándar sanitario de referencia de Canadá del virus del Nilo Occidental). Los paneles moderadamente hemolizados se prepararon mediante dilución del estándar en un pool de plasma cadavérico conservado en EDTA negativo al virus formado por muestras cadavéricas individuales clasificadas en la categoría de muestras moderadamente hemolizadas (con un color que varía del paja al rosa). La matriz de muestras altamente hemolizadas era una matriz artificial compuesta por sangre entera lisada antigua mezclada con plasma conservado en EDTA para representar una muestra clínica altamente hemolizada (entre rojo y rojo oscuro o marrón). Antes de preparar los paneles de dilución se comprobó que la matriz de muestras altamente hemolizadas fuera negativa al ARN del VNO. Se utilizaron dos lotes del kit de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental en el análisis de los paneles moderadamente hemolizados y un lote del kit de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para el virus del Nilo Occidental en el análisis de los paneles altamente hemolizados. Para cada matriz, con los datos combinados de todas las réplicas analizadas se determinó el límite de detección según la tasa de positividad con el límite inferior del intervalo de confianza (unilateral) al 95%; también se usó el análisis PROBIT para estimar el LOD al 95% y los intervalos de confianza fiducial bilateral al 95% para el panel (Tablas 10 y 11). El LOD estimado al 95% obtenido mediante el análisis PROBIT utilizando el estándar secundario de Roche para el VNO en muestras cadavéricas moderadamente hemolizadas fue de 117,4 copias/ml y, para la matriz de muestras altamente hemolizadas, fue de 365,1 copias/ml.

Tabla 10:
Resumen de sensibilidad analítica con el estándar secundario de Roche para el VNO en muestras cadavéricas moderadamente hemolizadas

Entrada nominal (copias/ml)	Número de reactivos	Número de pruebas individuales	% de reactivos	Límite inferior de confianza (unilateral) al 95%
40	28	43	65,1	51,5%
90	38	44	86,4	74,9%
120	64	66	97,0	90,8%
140	64	66	97,0	90,8%
160	65	66	98,5	93,0%
200	65	66	98,5	93,0%
Análisis PROBIT	Tasa de detección (%)	Concentración (copias/ml)	Límite inferior del intervalo de confianza del 95% (copias/ml)	Límite superior intervalo de confianza del 95% (copias/ml)
	95	117,4	97,8	150,7

Tabla 11:
Resumen de sensibilidad analítica con el estándar secundario de Roche para el VNO en la matriz de muestras altamente hemolizadas

Entrada nominal (copias/ml)	Número de reactivos	Número de pruebas individuales	% de reactivos	Límite inferior de confianza (unilateral) al 95%
200	39	44	88,6	77,6%
330	43	44	97,7	89,7%
400	43	44	97,7	89,7%
425	43	43*	100,0	93,3%
450	43	44	97,7	89,7%
525	43	44	97,7	89,7%
Análisis PROBIT	Tasa de detección (%)	Concentración (copias/ml)	Límite inferior del intervalo de confianza del 95% (copias/ml)	Límite superior intervalo de confianza del 95% (copias/ml)
	95	365,1	285,6	873,0

* Una réplica no fue válida.

Sensibilidad

Se dividieron sesenta muestras de plasma cadavéricas conservadas en EDTA seleccionadas aleatoriamente y no reactivas al ARN del VNO y clasificadas según el nivel de hemólisis [muestra moderadamente hemolizada (de color paja a rosa) o muestra altamente hemolizada (de color rojo a rojo oscuro o marrón)] y se repartieron de manera uniforme en 5 grupos de 12 muestras por grupo. Se añadieron muestras de cada grupo con diana vírica VNO utilizando un aislado clínico distinto para cada grupo hasta obtener una concentración final de aproximadamente 570 copias/ml (3 x 190 copias/ml) para las muestras cadavéricas moderadamente hemolizadas y de aproximadamente 990 copias/ml (3 x 330 copias/ml) para las muestras cadavéricas altamente hemolizadas. Las muestras añadidas con ARN del VNO se analizaron inmediatamente después de la introducción o un mes después, durante el cual las muestras se almacenaron a ≤ -80 °C. En todos los casos, cada muestra se diluyó manualmente en una proporción 1:5 con el diluyente para muestras cadavéricas **cobas**[®] TaqScreen antes de realizar el análisis. Cuatro de las doce muestras de cada grupo se analizaron con un lote del kit de reactivos y en el estudio se utilizaron tres lotes de kits de reactivos, con un total de 20 muestras analizadas por lote de kit de reactivo. La tasa de reacción de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental fue del 100% [CI al 95%: 94 - 100%] para todas las muestras cadavéricas analizadas en el estudio. En la tabla 12 se presenta un resumen de los resultados de sensibilidad de esta prueba.

Tabla 12:
Resumen de sensibilidad del VNO con muestras cadavéricas moderadamente hemolizadas (MH) y altamente hemolizadas (AH)

Lote del kit	Tipo de muestra cadavérica	WNV
Lote nº 1	MH	14/14
	AH	6/6
Lote nº 2	MH	13/13
	AH	7/7
Lote nº 3	MH	16/16
	AH	4/4
Total	MH + AH	60/60
Sensibilidad	100% [CI del 95%: 94,0 - 100%]	

RENDIMIENTO CLÍNICO: MUESTRAS DE DONANTES VIVOS

Sensibilidad clínica: pruebas de muestras positivas conocidas para el virus del Nilo Occidental

Se evaluó la sensibilidad clínica de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental mediante el análisis de 315 muestras clínicas individuales positivas para el virus del Nilo Occidental. Se determinó que las muestras eran positivas para ARN del virus del Nilo Occidental mediante uno de los tres métodos de pruebas de ácidos nucleicos. El estudio se realizó en 3 laboratorios de pruebas de forma que en cada uno se analizaron aproximadamente 100 muestras, sin diluir y con una dilución 1:6, y se utilizaron tres lotes diferentes de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental.

La sensibilidad de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental con muestras sin diluir en este estudio fue del 100% (CI del 95% de 98,8-100,0) y, con muestras con una dilución 1:6, del 97,5% (CI del 95% de 95,1-98,9) (tabla 13). Las ocho (8) muestras no reactivas con una dilución 1:6 procedían de muestras sin diluir con cargas víricas menores de 100 copias/ml según el ensayo de PCR cuantitativa del VNO del National Genetics Institute.

Tabla 13:
Sensibilidad clínica de muestras positivas conocidas para el virus del Nilo Occidental

	Número de muestras analizadas	Número de muestras reactivas	Número de muestras no reactivas	Sensibilidad (%)	Sensibilidad (CI del 95%)	
					Límite inferior	Límite superior
Sin diluir	314*	314	0	100	98,8	100,0
Dilución 1:6	315	307	8	97,5	95,1	98,9

* Una muestra sin diluir fue no válida.

Especificidad clínica

La especificidad clínica de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental fue evaluada mediante el análisis de donaciones de sangre entera seleccionadas aleatoriamente en seis laboratorios externos. Se analizaron muestras individuales y muestras en un pool que constaban de seis unidades. En el estudio se utilizaron tres lotes diferentes de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. La especificidad clínica de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental se calculó como porcentaje (intervalo de confianza [CI] binomial exacto bilateral del 95%) de donantes no infectados por el VNO cuyos resultados fueron no reactivos para la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental. El número de donantes evaluables era 86.935 en las pruebas de pooling y 10.375 en las pruebas individuales.

Resultados de las pruebas de pooling

En la tabla 14 se muestra el cálculo de la especificidad clínica de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental en los 86.935 donantes evaluables de las pruebas de pooling. La especificidad clínica de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental para las pruebas de pooling fue del 100% (86.935/86.935; CI del 95% = de 99,996% a 100,000%) en este estudio.

Tabla 14:
Especificidad clínica de la prueba **cobas[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental: pruebas de pooling**

Criterio de valoración para el VNO*	Estado de donante para el VNO**				Total
	Positivo	Supuesto positivo***	Negativo	Desconocido****	
Reactivo al VNO	0 (n/a)	0 (n/a)	0 (0,000%)	0 (n/a)	0
No reactivo al VNO	0 (n/a)	0 (n/a)	86.935 (100,000%)	0 (n/a)	86.935
Total	0	0	86.935	0	86.935
Especificidad clínica (CI del 95%)			100,000% (99,996%, 100,000%)		

* El criterio de valoración para el VNO se extrajo del resultado válido de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental procedente del análisis de la donación inicial mediante el algoritmo de pruebas de pooling.

** El estado de donante para el VNO se asignó mediante un algoritmo informático basado en los patrones de reactividad de la prueba de la donación inicial y de las donaciones de seguimiento (si las hubiera).

*** Se asignó un estado de donante para el VNO "Supuesto positivo" mediante un algoritmo informático a los donantes sin donación del estudio de seguimiento con un resultado reactivo en la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental para la donación inicial y al menos con 1 resultado reactivo/positivo en la fuente de plasma alternativa, NAT alternativa o IgM para la donación inicial.

**** Los donantes con el estado de donante para el VNO "Desconocido" habrían presentado resultados insuficientes en la prueba para asignarles un estado de donante para el VNO.

La especificidad del pool de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental para las donaciones iniciales fue del 99,986% (14.387/14.389; CL del 95% = de 99,950% a 99,998%). Dos pools de 6 fueron reactivos a la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental, pero ambos contenían muestras no reactivas a la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental en el nivel de muestra individual. Se observó una tasa de invalidez del 2,3% debido al control interno o a errores del equipo para los resultados de muestras en un pool.

Resultados de las pruebas individuales

En la tabla 15 se muestra el cálculo de la especificidad clínica de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental en los 10.375 donantes evaluables de las pruebas individuales. La especificidad clínica de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental en las pruebas individuales fue del 100% (10.375/10.375; CL del 95% = de 99,964% a 100,000%) en este estudio. Se observó una tasa de invalidez del 1,1% debido al control interno o a errores del equipo para los resultados de muestras individuales.

Tabla 15:
Especificidad clínica de la prueba cobas[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental: pruebas individuales

Criterio de valoración para el VNO*	Estado de donante para el VNO**				Total
	Positivo	Supuesto positivo***	Negativo	Desconocido****	
Reactivo al VNO	0 (n/a)	0 (n/a)	0 (0,000%)	0 (n/a)	0
No reactivo al VNO	0 (n/a)	0 (n/a)	10.375 (100,000%)	0 (n/a)	10.375
Total	0	0	10.375	0	10.375
Especificidad clínica (CI del 95%)			100,000% (99,964%, 100,000%)		

* El criterio de valoración para el VNO se extrajo del resultado válido de la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental procedente del análisis de la donación inicial mediante el algoritmo de pruebas de pooling.

** El estado de donante para el VNO se asignó mediante un algoritmo informático basado en los patrones de reactividad de la prueba de la donación inicial y de las donaciones de seguimiento (si las hubiera).

*** Se asignó un estado de donante para el VNO "Supuesto positivo" mediante un algoritmo informático a los donantes sin donación del estudio de seguimiento con un resultado reactivo en la prueba **cobas**[®] TaqScreen para la detección del virus del Nilo Occidental para la donación inicial y al menos con 1 resultado reactivo/positivo en la fuente de plasma alternativa, NAT alternativa o IgM para la donación inicial.

**** Los donantes con el estado de donante para el VNO "Desconocido" habrían presentado resultados insuficientes en la prueba para asignarles un estado de donante para el VNO.

BIBLIOGRAFÍA

1. Petersen L.R., Marfin, A.A. A primer for the clinician, *Ann Intern Med* 2002; **137**:173-179.
2. Kramer, L.D., Bernard, K.A. West Nile Virus in the western hemisphere, *Curr Opin Infect Dis* 2001; **14**(5):519-525.
3. 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.
4. Savva, R., McAuley-Hecht, K., Brown, T., Pearl, L. 1995. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature* **373**:487-493.
5. Mol, C. D., Arvai, A. S., Slupphaug, G., Kavli, B., Alseth, I., Krokan, H. E., Tainer, J. A. 1995. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell* **80**:869-878
6. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. **10**:413-417.
7. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.
8. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. (eds.). 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
9. 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.
10. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.
11. Saldanha, J., Shead, S., Heath, A., Drebot, M., and the West Nile Virus Collaborative Group. 2005. Collaborative study to evaluate a working reagent for West Nile virus RNA detection by nucleic acid testing. *Transfusion* **45**:97-102.
12. Briese, T., Rambaut, A., Pathmajeyan, M., Bishara, J., Weinberger, M., Pitlik, S., Lipkin, W.I. 2002. Phylogenetic analysis of human isolate from the 2000 Israel West Nile virus epidemic. *Emerging Infectious Diseases* **8**(5):528-531.
13. Hayes, C.G., West Nile Virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **951**:25-37.
14. Ji, J., Chen, X., Manak, M., 2001. TaqMan® Probe Assay for the Detection of West Nile Virus, 16th Annual San Diego Conference New Technologies for Molecular Diagnostics. *Clinical Chem.* 2001; **47**:2078-2085. (Poster 11).

Revisión del documento

Información de revisión del documento	
Doc Rev. 8.0 12/2023	<p>Se ha actualizado la información sobre peligros.</p> <p>Se ha actualizado la página de símbolos armonizados.</p> <p>Se ha actualizado el apartado Marcas registradas y patentes, incluido el enlace.</p> <p>Se ha incluido la declaración "Fabricado en".</p> <p>Se ha actualizado el apartado Asistencia técnica.</p> <p>Se ha añadido la dirección web de Roche www.roche.com.</p> <p>Se ha añadido el símbolo Rx Only y el símbolo IVD.</p> <p>Se ha eliminado el número de referencia de material y los números de versión encima del símbolo EC REP para evitar información redundante.</p> <p>Se ha actualizado la marca cobas[®].</p> <p>Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.</p>

Asistencia técnica

Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con su afiliada local:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Fabricante e importador



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

Rx Only

Licencia de EE.UU. n° 1636

Fabricado en los EE. UU.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marcas registradas y patentes

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

Copyright

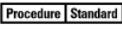
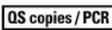
©2023 Roche Molecular Systems, Inc.



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.

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