Rx Only

cobas® CHIKV/DENV

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

Para diagnóstico in vitro

cobas® CHIKV/DENV – 480	P/N: 08042276190
cobas® CHIKV/DENV Control Kit	P/N: 08042136190
cobas® NHP Negative Control Kit	P/N: 07002220190
cobas omni MGP Reagent	P/N: 06997546190
cobas omni Specimen Diluent	P/N: 06997511190
cobas omni Lysis Reagent	P/N: 06997538190
cobas omni Wash Reagent	P/N: 06997503190

Tabla de contenido

Uso previsto 4

Resumen y explicación de la prueba 4

Reactivos y materiales 8

Reactivos y controles de **cobas**® CHIKV/DENV 8
Reactivos **cobas omni** para la preparación de muestras 10
Requisitos de almacenamiento y manipulación 12
Material adicional necesario 13
Instrumentos y software necesarios 13

Precauciones y requisitos de manipulación 14

Advertencias y precauciones 14
Manipulación de reactivos 15
Buenas prácticas de laboratorio 15

Recogida, transporte, almacenamiento y pooling de muestras 16

Muestras de donantes vivos 16

Instrucciones de uso 18

Pipeteo y pooling de muestras automatizado (opcional) 18
Notas sobre el procedimiento 18
Realización de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV 18

Resultados 19

Control de calidad y validez de los resultados 19
Interpretación de los resultados 19
Repetición de pruebas de muestras individuales 20
Limitaciones del procedimiento 20

Evaluación no clínica del rendimiento 21

Características clave de rendimiento - Muestras de donantes vivos 21
Límite de detección (LoD) 21
Reproducibilidad 24
Verificación del genotipo 26
Especificidad analítica 26

Correlación 29
Fallo de todo el sistema 29
Información adicional 30
Características principales de la prueba 30
Símbolos 31
Fabricante y distribuidores 33
Marcas registradas y patentes 33
Copyright 33
Bibliografía 34
Revisión del documento 36

Uso previsto

cobas® CHIKV/DENV para uso en los **cobas**® 6800/8800 Systems es una prueba cualitativa in vitro para la detección directa del ARN del virus chikungunya (CHIKV) y el ARN de los serotipos 1-4 del virus del dengue (DENV) en plasma humano.

Esta prueba se ha diseñado como cribado independiente de ARN del CHIKV o ARN del DENV en muestras de donantes o como cribado simultáneo de ARN del CHIKV y del DENV en plasma procedente de donantes de sangre individuales, incluyendo donantes de sangre total, componentes sanguíneos y otros donantes vivos. Esta prueba también se puede utilizar para cribar donantes de tejidos y órganos cuando las muestras se obtienen mientras el corazón del donante todavía late. El plasma de todos los donantes se puede cribar como muestras individuales. En el caso de las donaciones de sangre total y componentes sanguíneos, las muestras de plasma se pueden analizar individualmente o el plasma en pooles compuestos por alícuotas de muestras individuales.

Esta prueba no está diseñada para su uso con muestras de sangre del cordón umbilical.

Esta prueba no está diseñada para utilizarse como ayuda para el diagnóstico del CHIKV o el DENV.

Resumen y explicación de la prueba

Información de referencia

El DENV es un virus ARN (arbovirus) transmitido por artrópodos perteneciente a la familia Flaviviridae que incluye otros virus como el virus del Nilo Occidental (VNO), el virus de la fiebre amarilla y otros 70 virus.[1] Al igual que otros arbovirus, el DENV se mantiene en un ciclo enzoótico entre mosquitos que se alimentan de sangre (básicamente la especie *Aedes aegypti*) y huéspedes vertebrados susceptibles (humanos).[2,3] La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el DENV es endémico en más de 100 países, lo que implica que más de 2.500 millones personas en las zonas tropicales y subtropicales del planeta están en riesgo.[2] América Latina y el Caribe, incluido Puerto Rico, han registrado un aumento notable en la incidencia del DENV durante los últimos años, lo que ha disparado la preocupación por la propagación del *Ae. aegypti* (mosquito vector del DENV) y, como consecuencia, del DENV a los Estados Unidos.[4] La carga global del DENV durante la pandemia del año 2010 se estima en 390 millones de infecciones, 96 de los cuales respondían a infecciones sintomáticas por el DENV y 500.000 a casos de dengue grave.[5]

La mayoría de las infecciones clínicas por el DENV son casos de "fiebre del dengue", lo que la OMS define como fiebre asociada con un mínimo de 2 síntomas tales como escalofríos, dolor en los huesos (en ocasiones grave, por lo que el DENV también se conoce como "fiebre rompehuesos"), mialgia, artralgia, dolor ocular, sarpullidos y la aparición de moratones.[2] El "dengue grave" incluye también fiebre hemorrágica y síndrome de shock.[2] El DENV puede clasificarse según cuatro serotipos que a pesar de estar relacionados presentan diferencias inmunológicas: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. La infección por uno de los tipos del DENV genera inmunidad de por vida frente a dicho tipo de serotipo del DENV y una protección a corto plazo (≤ 2 meses) frente a la infección por los otros tres tipos del DENV.[6]

El DENV también puede transmitirse vía transfusión.[2,6,7] El primer caso documentado de transmisión del DENV vía transfusión se produjo en 2002 durante una epidemia local en Hong Kong; los análisis RT-PCR demostraron que tanto las muestras de donante como las de receptor eran positivas para el ARN del DENV-1.[8,9] Existen registros de múltiples casos de transmisiones del DENV asociadas a transfusiones en Singapur en el año 2007[10] y en Puerto Rico en el año 2007, incluido un caso de fiebre hemorrágica transmitida a través de una transfusión.[1,6] Durante la epidemia de 2012 de Brasil se transfundieron 42 donaciones positivas para ARN del DENV-4 a 35 receptores, lo que resultó en seis infecciones por DENV transmitidas vía transfusión.[11,12]

La mayoría (entre un 53% y un 87%) de las infecciones por el DENV son asintomáticas, por lo que los sujetos acuden a donar sangre.[2] El cribado de donaciones de sangre para investigación realizado en Puerto Rico demostró una tasa del 0,03% al 0,31% durante las epidemias de los últimos años (2005, 2007, 2010, 2011 y 2012).[2] Un estudio realizado con 39.134 donaciones de sangre obtenidas durante la epidemia del DENV de 2012 en Brasil permitió detectar viremia del DENV-4 en un 0,51% de las donaciones de Rio de Janeiro y en un 0,80% de las donaciones de Recife.[11,12] Los modelos elaborados por los centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC) muestran una tendencia similar.[4] A pesar de que se están desarrollando vacunas, todavía no existe ninguna para la infección por el DENV y el tratamiento se basa en una terapia de apoyo.[5]

El CHIKV es un virus ARN (arbovirus) transmitido por artrópodos miembro de la familia Togaviridae. El mantenimiento del CHIKV se basa en un ciclo enzoótico entre mosquitos que se alimentan de sangre (*Ae. aegypti* y, desde 2005 como mínimo, *Ae. albopictus*) y humanos.[2] El CHIKV ("chikungunya" significa "el hombre que se dobla" en la lengua makonde de Tanzania y Mozambique) aparece con síntomas similares durante los mismos periodos endémicos del DENV, con la diferencia de que el CHIKV se caracteriza por dolores articulares severos y una artritis paralizante que puede llegar a impedir estar en pie a causa de la intensidad del dolor articular.[2,13] Aunque no es habitual, se han registrado muertes por CHIKV que suelen ser consecuencia de una encefalitis y otros tipos de encefalopatía, miocarditis, hepatitis o fallo multiorgánico.[14]

El CHIKV se detectó por primera vez en Tanzania en el año 1952 y durante varias décadas ha provocado epidemias esporádicas en África y Asia.[14] Se ha logrado identificar tres linajes diferenciados del CHIKV: el linaje África Occidental, el linaje ECSA (Este, Central y Suráfrica) y el linaje Asiático, derivado del virus ECSA.[14] El CHIKV parece haber resurgido desde el año 2000 en forma de epidemias más graves que las anteriores.[14] Tras un periodo de ausencia de 32 años en India, se produjo una gran epidemia del CHIKV que afectó a 13 estados durante los años 2006 y 2007.[14,15] Se registró una gran epidemia del CHIKV en India en los años 2006 y 2007. Otros países del Sureste asiático también han sufrido epidemias del CHIKV. Desde 2005, se han registrado 1,9 millones de infecciones por el CHIKV en India, Indonesia, Maldivas, Myanmar y Tailandia.[15] Desde julio de 2017, Paquistán y Kenia también están sufriendo constantes epidemias que se remontan a 2016.[15]

Desde finales de 2005 y hasta 2007 se produjo una fuerte epidemia del CHIKV en la isla Reunión y otras islas de la zona sudoeste del océano Índico, al este de África, episodio durante el que se registraron 300.000 casos clínicos en la isla Reunión (40% de la población de la isla), de los cuales un 75% resultaron sintomáticos.[2,16] Se descubrió una mutación que afectaba a la proteína de la envoltura vírica y que permitía la replicación viral en *Ae. albopictus* (una alternativa al *Ae. aegypti*, el vector anteriormente conocido del CHIKV) durante la epidemia de la isla Reunión. Dicha mutación provocó un aumento de la carga viral y la virulencia durante la epidemia registrada en la isla Reunión.[17] Desde entonces, el mosquito *Ae. albopictus* también actúa como mosquito vector en las epidemias de India, Norte de Italia y Caribe.[2,18,19] A pesar de que no se documentaron casos de infecciones por el CHIKV transmitidas por vía transfusional en los episodios de epidemia de 2005 a 2007 de la isla Reunión, se aplicaron medidas agresivas para mitigar el riesgo de una infección vía transfusión, para la que se estimó un riesgo de 1.500 por cada 100.000 donaciones (1,5%).[2,16]

En Europa se han detectado casos esporádicos de CHIKV. La primera epidemia local (197 casos) europea tuvo lugar en el noreste de Italia en 2007 y permitió confirmar la posibilidad de que el *Ae. albopictus* estuviera asociado a las epidemias europeas.[15] En el año 2014 se detectaron como mínimo 11 casos autóctonos de CHIKV en Montpellier (Francia) provocados por el mosquito tigre invasor (*Ae. albopictus*) en las proximidades de caso importado.[20]

Antes de 2013 se habían registrado epidemias del CHIKV en África, Asia, Europa y las islas de los océanos Pacífico e Índico, pero no se habían detectado casos de transmisión del CHIKV en el continente americano.[2,21] Sin embargo, hacía tiempo que se había identificado la posibilidad de epidemias del CHIKV ante la prevalencia de los vectores y su eficacia para transmitir los virus del dengue.[21] La primera infección por CHIKV adquirida localmente en el continente americano fue en St. Martin en diciembre de 2013.[21]

El CHIKV sigue siendo un motivo de preocupación para América y el Caribe. En 2017, hasta el 14 de julio, la Organización Panamericana de la Salud (PAHO) informó de 58.806 posibles casos de transmisión autóctona del CHIKV (28.654 de los cuales están confirmados) en América del Sur, el Caribe y América del Norte, 13 de los cuales resultaron en muerte en Brasil.[22] La mayoría de los casos (52.724) corresponden a Brasil y el resto a Bolivia, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guinea Francesa, Guadalupe, Guatemala, Martinica, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Puerto Rico, San Bartolomé, St. Martin y Venezuela.[22]

Actualmente aumenta la preocupación por la propagación del CHIKV a los EE.UU. Antes de 2006, apenas se habían detectado casos de enfermedad por el CHIKV en turistas estadounidenses y no existía constancia de ningún caso adquirido en los EE.UU.[23] Entre 2006 y 2013, la media anual de personas con resultados positivos para una infección reciente por el CHIKV en Estados Unidos fue de 28 personas (rango de 5 a 65); todos ellos eran turistas de Estados Unidos que viajaban a áreas afectadas de Asia, África o el océano Índico o que venían de las mismas.[23] En 2014, ArboNET recibió aviso de 2.811 casos de enfermedad por el CHIKV en 47 estados del país (sin contar Alaska, Nebraska ni Wyoming), incluidos 12 casos de transmisión local en Florida.[23] El resto de los casos correspondían a viajeros que regresaban de áreas afectadas.[23] ArboNET recibió en 2014 un total de 4.710 notificaciones de casos de CHIKV en los territorios de EE.UU., incluido Puerto Rico, Islas Vírgenes de los Estados Unidos y Samoa Americana.[23]

En 2015, el CHIKV se definió como enfermedad de notificación obligatoria en los Estados Unidos. En 2015 se escalaron 679 casos de CHIKV a ArboNET procedentes de 44 estados de EE.UU. (todos los estados excepto Delaware, Luisiana, Nuevo México, Dakota del Sur, Virginia Occidental y Wyoming), todos ellos detectados en viajeros que regresaban de zonas afectadas.[24] Desde los territorios de EE.UU. (Puerto Rico e Islas Vírgenes de los Estados Unidos) se comunicaron 202 casos a ArboNET en 2015, de los cuales 202 era infecciones de transmisión local.[24] En 2016, el instituto ArboNET recibió comunicación de 175 casos de chikungunya procedentes de 37 estados de Estados Unidos (todos los estados excepto Alaska, Colorado, Idaho, Maine, Misisipí, Nevada, Dakota del Norte, Oklahoma, Oregón, Dakota del Sur, Vermont, Virginia Occidental y Wyoming).[25] Los 175 casos fueron de viajeros que regresaban de áreas afectadas y ninguno resultó de una infección por transmisión local.[25] En los territorios de los Estados Unidos se detectaron 171 casos de chikungunya en total (todos en Puerto Rico), 170 de los cuales se habían adquirido localmente y uno estaba relacionado con un viaje.[25] El descubrimiento del mosquito *Ae. aegypti* en el condado de Los Ángeles (Commerce y Pico Rivera) ha disparado la preocupación ante la propagación del CHIKV más allá de Florida.[26]

Motivos para el uso de las pruebas NAT

El DENV puede transmitirse por vía transfusional.[2,6,7] A pesar de que no se conocen casos de transmisión del CHIKV mediante transfusión, la posibilidad de que la infección por el CHIKV pueda transmitirse por vía transfusional se basa en este tipo de capacidad de transmisión que presentan otros arbovirus como el DENV.[2] La mayoría de las infecciones por el DENV (entre un 53% y un 87%) y muchas infecciones por el CHIKV (aproximadamente el 25%) son asintomáticas, por lo que los sujetos acuden a donar sangre.[2,6,7] El hecho de que los donantes infectados no desarrollen una enfermedad clínicamente importante o no presenten síntomas hace que preguntar a los donantes de sangre sobre síntomas recientes indicativos de una infección por CHIKV o DENV no resulte efectivo a la hora de identificar donantes infectados.

Explicación de la prueba

La prueba **cobas**® CHIKV/DENV es una prueba de PCR cualitativa para la detección y discriminación de ARN del CHIKV y del DENV que se ejecuta en el **cobas**® 6800 System y el **cobas**® 8800 System. La prueba **cobas**® CHIKV/DENV permite el cribado individual o simultáneo de ARN del CHIKV y del DENV mediante una sola prueba realizada con una donación individual o un pool de plasma de donaciones individuales.

Principios del procedimiento

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

Las muestras se pueden analizar de forma individual o bien en pooles de varias muestras. Si va a realizarse un pooling, se puede utilizar el **cobas p** 680 instrument o el software **cobas**® **Synergy** con el pipeteador Hamilton MICROLAB® STAR IVD (**cobas**® **Synergy** Core) en el paso preanalítico.

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

Para llevar a cabo la amplificación selectiva de los ácidos nucleicos del fragmento objetivo de la muestra del donante se utilizan cebadores que van en un sentido y en sentido contrario específicos del virus que se seleccionan de regiones altamente conservadas de los ácidos nucleicos víricos. Para los procesos de transcripción inversa y amplificación se utiliza una enzima ADN polimerasa termoestable. El reactivo de Master Mix incluye trifosfato de deoxiuridina (dUTP), en lugar de trifosfato desoxitimidina (dTTP), que se incorpora al ADN recién sintetizado (amplicón).[27-29] La enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa), que se incluye en la Master Mix para PCR cuando se calienta durante la primera ciclación térmica, destruye los amplicones contaminados de las series de PCR anteriores. Sin embargo, no se destruyen los amplicones nuevos porque la enzima AmpErase se inactiva cuando se expone a temperaturas superiores a los 55 °C.

El reactivo de Master Mix de **cobas**® CHIKV/DENV contiene sondas de detección específicas para los ácidos nucleicos de CHIKV, DENV y el CI. Cada una de estas sondas de detección específicas para CHIKV, DENV y el CI se marca con uno de los tres marcadores fluorescentes que actúan como emisor. Además, cada sonda dispone de un cuarto marcador que actúa como silenciador. Los tres marcadores emisores se miden en longitudes de onda definidas, lo que permite la detección y discriminación simultáneas de los fragmentos objetivo amplificados de CHIKV, DENV y CI.[30,31] Cuando no se une a la secuencia objetivo, la señal fluorescente de las sondas intactas se elimina mediante el marcador silenciador. Durante el paso de amplificación de la PCR, la hibridación de las sondas con la plantilla específica de ADN monocatenario provoca la escisión de la actividad de la nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa, lo que produce la separación de los marcadores emisores y silenciadores y la emisión de una señal fluorescente. Con cada ciclo de PCR, se generan cantidades crecientes de sondas escindidas y la señal acumulada del marcador emisor aumenta concomitantemente. Como los tres marcadores emisores específicos se miden en longitudes de onda definidas, es posible detectar y discriminar simultáneamente los fragmentos objetivos del CHIKV, el DENV y el CI.

Reactivos y materiales

Reactivos y controles de cobas® CHIKV/DENV

Todos los reactivos y controles sin abrir deben almacenarse como se recomienda en la Tabla 1 a Tabla 4.

Tabla 1 cobas® CHIKV/DENV

cobas® CHIKV/DENV
Almacenar a 2-8 °C
Casete para 480 pruebas (P/N 08042276190)

Componentes del kit	Ingredientes del reactivo	Cantidad por kit 480 pruebas
Solución de proteinasa (PASE)	Buffer Tris, < 0,05% de EDTA, cloruro de calcio, acetato de calcio, 8% (p/v) de proteinasa EUH210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad. EUH208: Contiene subtilisina. Puede provocar una reacción alérgica.	38 ml
Control interno (CI)	Buffer Tris, < 0,05% de EDTA, < 0,001% de constructo de Armored RNA como control interno (ARN no infeccioso encapsulado en bacteriófago MS2), < 0,002% de ARN Poli rA (sintético), < 0,1% de azida sódica	38 ml
Buffer de elución (EB)	Tampón Tris, 0,2% de metil-4-hidroxibenzoato	38 ml
Reactivo 1 de Master Mix (MMX-R1)	Acetato de manganeso, hidróxido potásico, < 0,1% de azida sódica	14,5 ml
Reactivo 2 de Master Mix para CHIKV/DENV (CHIKV/DENV MMX-R2)	Buffer Tricina, acetato de potasio, glicerol, 18% de sulfóxido de dimetilo, < 0,1% de Tween 20, EDTA, < 0,14% de dATP, dGTP, dCTP, dUTPs, < 0,01% de cebadores ascendente y descendente de CHIKV y DENV, < 0,01% de cebadores que van en un sentido y en sentido contrario de control interno, < 0,01% de sondas marcadas con fluorescente para CHIKV, DENV y control interno, < 0,01% de aptámero oligonucleótido, < 0,01% de polimerasa de ADN Z05D, < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana), < 0,1% de azida sódica	17,5 ml

Tabla 2 **cobas**® CHIKV/DENV Control Kit

cobas® CHIKV/DENV Control Kit
Almacenar a 2-8 °C
(P/N: 08042136190)

Componentes del kit	Ingredientes del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia*
Control positivo para CHIKV/DENV (CHIKV-DENV (+) C)	< 0,001% de ARN (Armored) sintético de CHIKV y DENV encapsulado en proteína recubierta de bacteriófago MS2, plasma humano normal, ARN de CHIKV y ARN de DENV no detectables mediante métodos de PCR. 0,1% de conservante ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	 **ATENCIÓN** H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/ la niebla/los vapores/el aerosol. P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo. P280: Utilice guantes protectores. P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada. 55965-84-9, mezcla de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.º CE 247-500-7] y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.º CE 220-239-6] (3:1)

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

** Sustancia peligrosa

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

cobas® NHP Negative Control Kit
Almacenar a 2-8 °C
(P/N: 07002220190)

Componentes del kit	Ingredientes del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia*
Control negativo para plasma humano normal (NHP-NC)	Plasma humano normal, ARN de CHIKV y ARN de DENV no detectables mediante métodos de PCR. < 0,1% de conservante ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	 **ATENCIÓN** H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/ la niebla/los vapores/el aerosol. P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo. P280: Utilice guantes protectores. P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada. 55965-84-9, mezcla de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n. º CE 247-500-7] y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n. º CE 220-239-6] (3:1).

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

** Sustancia peligrosa

Reactivos cobas omni para la preparación de muestras

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

Reactivos	Ingredientes del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997546190)	Partículas de vidrio magnéticas, buffer Tris, 0,1% de metil-4 hidroxi-benzoato, < 0,1% de azida sódica	480 pruebas	No aplicable
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997511190)	Buffer Tris, 0,1% de metil-4 hidroxi-benzoato, < 0,1% de azida sódica	4 × 875 ml	No aplicable
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997538190)	42,56 % (p/p) de tiocianato de guanidina***, 5 % (p/v) de polidocanol***, 2 % (p/v) de ditiotreitol***, citrato de sodio dihidratado	4 × 875 ml	**PELIGRO** H302 + H332: Nocivo en caso de ingestión o inhalación. H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/ los vapores/el aerosol. P273: Evítese su liberación al medio ambiente. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. 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. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol
cobas omni Wash Reagent (WASH) Almacenar a 15-30 °C (P/N: 06997503190)	Citrato de sodio dihidratado, 0,1% de metil-4-hidroxibenzoato	4,2 l	No aplicable

* Estos reactivos no están incluidos en el kit de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV. Consulte el listado de material adicional necesario (Tabla 7).

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

*** Sustancia peligrosa

Requisitos de almacenamiento y manipulación

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

Cuando los reactivos no están cargados en los **cobas**® 6800/8800 Systems, almacénelos a la temperatura correspondiente especificada en la Tabla 5.

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

Reactivo	Temperatura de almacenamiento
cobas® CHIKV/DENV - 480	2-8 °C
cobas® CHIKV/DENV Control Kit	2-8 °C
cobas® NHP Negative Control Kit	2-8 °C
cobas omni Lysis Reagent	2-8 °C
cobas omni MGP Reagent	2-8 °C
cobas omni Specimen Diluent	2-8 °C
cobas omni Wash Reagent	15-30 °C

Los reactivos cargados en los **cobas**® 6800/8800 Systems se almacenan a la temperatura correspondiente y el sistema controla su fecha de caducidad. El sistema solamente permite utilizar los reactivos cuando se cumplen todas las condiciones indicadas en la Tabla 6. El sistema evita automáticamente el uso de reactivos caducados. La Tabla 6 ayuda al usuario a entender las condiciones de manipulación de los reactivos de los **cobas**® 6800/8800 Systems.

Tabla 6 Condiciones de caducidad de los reactivos de los **cobas**® 6800/8800 Systems

Reactivo	Fecha de caducidad del kit	Estabilidad del kit abierto	Series en las que se puede utilizar el kit	Periodo de estabilidad (horas acumuladas de carga fuera de la nevera)
cobas® CHIKV/DENV – 480	No caducado	60 días desde el primer uso	Máx. 20 series	Máx. 20 horas
cobas® CHIKV/DENV Control Kit	No caducado	No aplicable	No aplicable	Máx. 10 horas
cobas® NHP Negative Control Kit	No caducado	No aplicable	No aplicable	Máx. 10 horas
cobas omni Lysis Reagent	No caducado	30 días desde la carga*	No aplicable	No aplicable
cobas omni MGP Reagent	No caducado	30 días desde la carga*	No aplicable	No aplicable
cobas omni Specimen Diluent	No caducado	30 días desde la carga*	No aplicable	No aplicable
cobas omni Wash Reagent	No caducado	30 días desde la carga*	No aplicable	No aplicable

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

Material adicional necesario

Tabla 7 Material y material fungible para uso en los **cobas**® 6800/8800 Systems

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

Instrumentos y software necesarios

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

Tabla 8 Instrumentos

cobas® **6800/8800 Systems**	**P/N**
cobas® 6800 System (opción móvil)	05524245001 y 06379672001
cobas® 6800 System (fijo)	05524245001 y 06379664001
cobas® 8800 System	05412722001
Módulo de suministro de muestras	06301037001
Opciones de pipeteo y pooling	**P/N**
cobas p 680 instrument	06570577001
cobas® **Synergy** Software Dongle	07788339001
Hamilton MICROLAB® STAR IVD	04640535001

Consulte el Manual de usuario de los **cobas**® 6800/8800 Systems y el Manual de usuario del **cobas p** 680 instrument o bien la Asistencia al usuario del software **cobas**® **Synergy** para obtener información adicional sobre los tubos primarios y secundarios compatibles con cada instrumento.

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

Precauciones y requisitos de manipulación

Advertencias y precauciones

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

- Para diagnóstico *in vitro* exclusivamente.
- Todas las muestras deben tratarse como si fueran infecciosas, utilizando los procedimientos de laboratorio recomendados descritos en la publicación Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories y en el documento M29-A4 del CLSI.[32,33] Este procedimiento solamente debería llevarlo a cabo personal experto en la manipulación de material biopeligroso y en el uso de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV, los **cobas**® 6800/8800 Systems y, opcionalmente, el **cobas p** 680 instrument o el pipeteador Hamilton MICROLAB® STAR IVD con el **cobas**® **Synergy** Core.
- Todos los materiales de origen humano 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% en agua destilada o desionizada (lejía doméstica diluida a 1:10) o siga los procedimientos apropiados del laboratorio.
- El **cobas**® CHIKV/DENV Control Kit y el **cobas**® NHP Negative Control Kit contienen plasma procedente de sangre humana. En el análisis del plasma humano normal con métodos de PCR tampoco se ha detectado ARN de CHIKV ni ARN de DENV. Ningún método de prueba conocido puede garantizar totalmente que un producto derivado de la sangre humana no transmita agentes infecciosos.
- No congele la sangre total.
- Se recomienda la utilización de pipetas estériles desechables y puntas de pipetas sin nucleasa. Utilice solo el material fungible suministrado o que se requiera expresamente para garantizar el óptimo rendimiento de la prueba.
- Puede solicitar Hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheets, SDS) al representante local de Roche.
- Siga al pie de la letra los procedimientos y las directrices que se suministran para garantizar la correcta realización de la prueba. Cualquier variación de dichos procedimientos y directrices podría afectar al rendimiento óptimo de la prueba.
- Podrían producirse falsos positivos si no se evita la contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación y el procesamiento de las mismas.

Manipulación de reactivos

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

Buenas prácticas de laboratorio

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

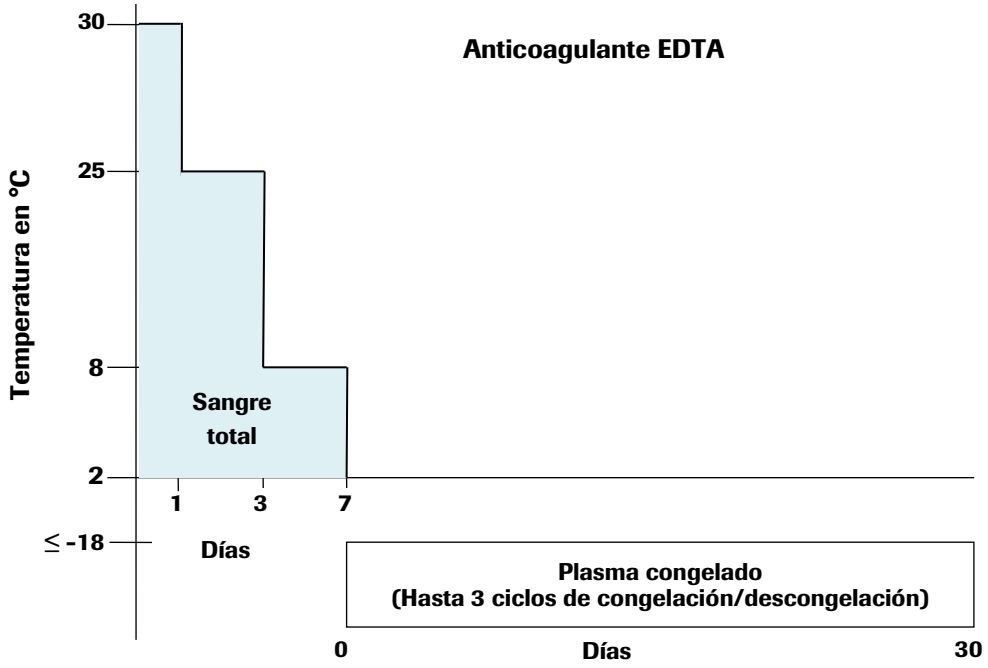
Recogida, transporte, almacenamiento y pooling de muestras

Nota: manipule todas las muestras y los controles como si pudieran transmitir agentes infecciosos.
Almacene todas las muestras de donantes a las temperaturas especificadas.
La estabilidad de las muestras se ve afectada por las temperaturas elevadas.

Muestras de donantes vivos

- Puede utilizarse plasma recogido en anticoagulante EDTA, CPD, CPDA1 y CP2D para la prueba **cobas**® CHIKV/DENV. Siga las instrucciones del fabricante de los tubos/las bolsas de recogida de muestras para conocer los procesos de manipulación y centrifugación.
- La sangre recogida en anticoagulante EDTA puede almacenarse hasta 7 días en las siguientes condiciones:
    - Las muestras deben centrifugarse en el plazo de 72 horas desde el momento de la extracción.
    - Para un almacenamiento superior a 8 °C, las muestras pueden almacenarse durante 72 horas a una temperatura máxima de 25 °C y hasta los 30 °C durante 24 de las 72 horas.
- En casos distintos a los anteriores, las muestras se almacenan a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C. Asimismo, el plasma separado de las células se puede almacenar hasta 30 días a una temperatura ≤ –18 °C con tres ciclos de congelación/descongelación. Consulte la Ilustración 1.

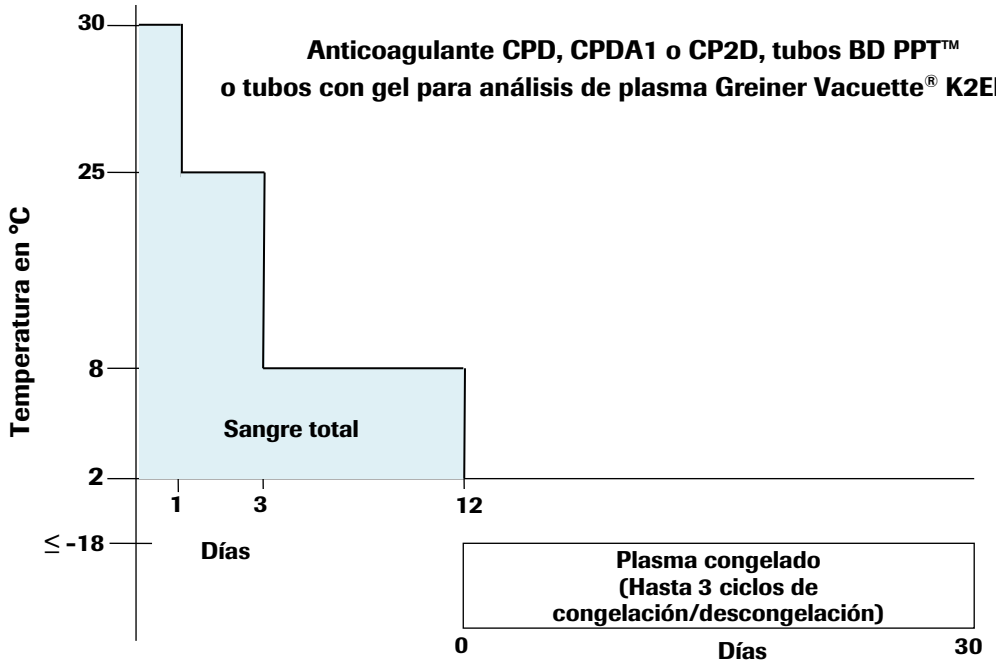
Ilustración 1 Condiciones de almacenamiento de muestras de donantes vivos recogidas en EDTA



- La sangre recogida en anticoagulante CPD, CPDA1 o CP2D, los tubos para preparación de plasma con EDTA Becton-Dickinson (BD PPT™) o los tubos con gel para análisis de plasma Greiner Vacuette® K2EDTA pueden almacenarse durante un máximo de 12 días en las condiciones siguientes:
    - Las muestras deben centrifugarse en el plazo de 72 horas desde el momento de la extracción.
    - Para un almacenamiento superior a 8 °C, las muestras pueden almacenarse durante 72 horas a una temperatura máxima de 25 °C y hasta los 30 °C durante 24 de las 72 horas.

- En casos distintos a los anteriores, las muestras se almacenan a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C. Asimismo, el plasma separado de las células se puede almacenar hasta 30 días a una temperatura ≤ –18 °C con tres ciclos de congelación/descongelación. Consulte la Ilustración 2.

Ilustración 2 Condiciones de almacenamiento de muestras de donantes vivos recogidas en CPD, CPDA1, CP2D, tubos BD PPT™ y tubos con gel para análisis de plasma Greiner Vacuette® K2EDTA



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

Instrucciones de uso

Pipeteo y pooling de muestras automatizado (opcional)

Tanto el **cobas p** 680 instrument como el **cobas**® **Synergy** Core se pueden utilizar como componente opcional de los **cobas**® 6800/8800 Systems para el pipeteo y el pooling automatizados de alícuotas de varias muestras primarias en un pool de muestras. Si desea obtener más información, consulte el Manual de usuario del **cobas p** 680 instrument o la Asistencia al usuario del software **cobas**® **Synergy**.

Notas sobre el procedimiento

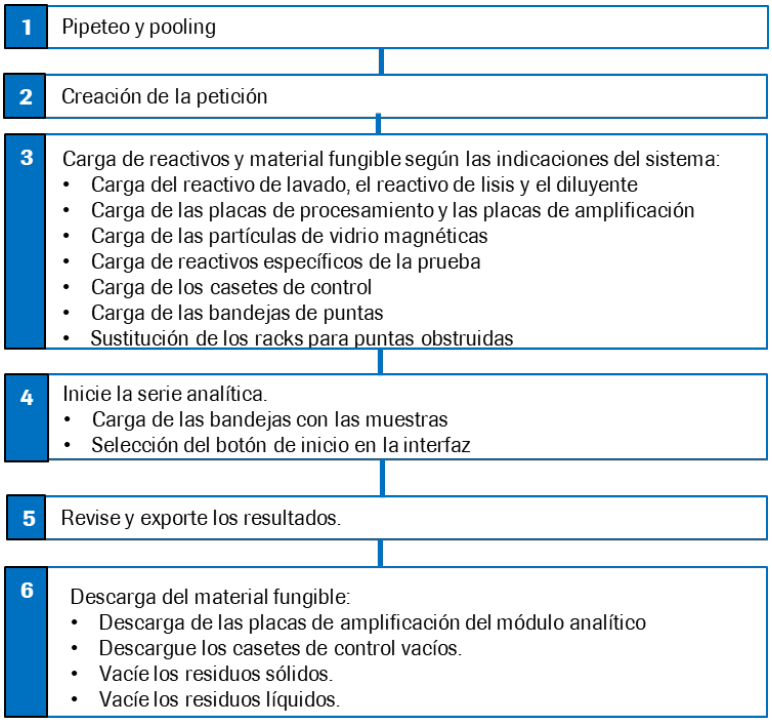
- No utilice los reactivos de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV, el **cobas**® CHIKV/DENV Control Kit, el **cobas**® NHP Negative Control Kit o los reactivos **cobas omni** después de la fecha de caducidad.
- No reutilice los consumibles. Es de un solo uso.
- Consulte el Manual de usuario de los **cobas**® 6800/8800 Systems para obtener información sobre el correcto mantenimiento de los instrumentos.

Realización de la prueba cobas® CHIKV/DENV

El procedimiento de la prueba se describe con detalle en el Manual de usuario de los **cobas**® 6800/8800 Systems; consulte el Manual de usuario del **cobas p** 680 instrument o la Asistencia al usuario del software **cobas**® **Synergy** según corresponda para obtener información detallada sobre los procedimientos de pooling opcionales.

En la Ilustración 3 se resume el procedimiento.

Ilustración 3 Procedimiento de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV



Resultados

Los **cobas**® 6800/8800 Systems detectan y diferencian automáticamente el ARN del CHIKV y el ARN del DENV para muestras y controles.

Control de calidad y validez de los resultados

- En cada serie se procesa un control negativo, [(–) C], y un control positivo, [CHIKV-DENV (+) C].
- Compruebe los avisos y los resultados asociados tanto en el software **cobas**® 6800/8800 como en el informe para garantizar la validez de la serie.
- La serie se considera válida cuando no hay avisos para ninguno de los dos controles.

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

Avisos de controles

Tabla 9 Avisos de controles para los controles negativo y positivo

Control negativo	Aviso	Resultado	Interpretación
(–) C	Q02	Invalid	Toda la serie se considera inválida si el resultado del (–) C no es válido.
Control positivo	**Aviso**	**Resultado**	**Interpretación**
CHIKV-DENV (+) C	Q02	Invalid	Toda la serie se considera no válida si el resultado del CHIKV-DENV (+) C no es válido.

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

Interpretación de los resultados

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

- Una serie válida puede incluir resultados de muestras de donantes tanto válidos como inválidos, según los avisos obtenidos para cada muestra.
- Los resultados de las muestras se consideran válidos solamente si los respectivos controles positivo y negativo de la serie correspondiente también son válidos.

Para cada muestra se miden simultáneamente tres parámetros: CHIKV, DENV y el control interno. El software informa de los resultados finales de las muestras obtenidos con la prueba **cobas**® CHIKV/DENV. Además de los resultados globales, el software **cobas**® 6800/8800 también muestra los resultados individuales para cada fragmento objetivo, que deberían interpretarse como se indica a continuación:

Tabla 10 Resultados de fragmento objetivo para la interpretación de los resultados de fragmento objetivo individuales

Resultados de fragmento objetivo	Interpretación
CHIKV Non-Reactive	No se ha detectado ninguna señal del fragmento objetivo para CHIKV y se ha detectado señal del CI.
CHIKV Reactive	Se ha detectado señal del fragmento objetivo para el CHIKV y la señal del CI puede haberse detectado o no.
DENV Non-Reactive	No se ha detectado ninguna señal del fragmento objetivo para DENV y se ha detectado señal del CI.
DENV Reactive	Se ha detectado señal del fragmento objetivo para el DENV y la señal del CI puede haberse detectado o no.
Invalid	No se ha detectado señal del fragmento objetivo ni del control interno.

Repetición de pruebas de muestras individuales

Es necesario repetir las pruebas para los tubos de muestra cuyo resultado final no es válido para uno de los fragmentos objetivo, independientemente de los resultados finales del otro fragmento objetivo.

Limitaciones del procedimiento

- La prueba **cobas**® CHIKV/DENV se ha evaluado para ser utilizada únicamente en combinación con el **cobas**® CHIKV/DENV Control Kit, el **cobas**® NHP Negative Control Kit, el **cobas omni** MGP Reagent, el **cobas omni** Lysis Reagent, el **cobas omni** Specimen Diluent y el **cobas omni** Wash Reagent exclusivamente en los **cobas**® 6800/8800 Systems.
- La obtención de resultados fiables depende de que los procedimientos de recogida, almacenamiento y manipulación de muestras sean adecuados.
- No utilice plasma heparinizado con esta prueba porque se ha demostrado que la heparina inhibe la PCR.
- La detección del ARN del CHIKV y del ARN del DENV depende del número de partículas víricas presentes en la muestra y se puede ver afectada por los métodos de obtención de la misma, el almacenamiento y la manipulación, factores propios del paciente (como la edad o la presencia de síntomas) o la fase de infección y el tamaño del pool.
- Aunque es poco probable, las mutaciones en regiones muy conservadas de un genoma vírico cubiertas por la prueba **cobas**® CHIKV/DENV pueden afectar la unión de cebadores y/o sondas y causar errores en la detección de la presencia del virus.
- Debido a las diferencias específicas entre tecnologías, se recomienda a los usuarios que realicen estudios de correlación en el laboratorio para determinar las diferencias tecnológicas antes de cambiar de una a otra. Los usuarios deberán adherirse a las políticas y los procedimientos específicos.

Evaluación no clínica del rendimiento

Características clave de rendimiento – Muestras de donantes vivos

Límite de detección (LoD)

Estándar secundario de Roche

El límite de detección de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV se ha determinado a partir de los siguientes estándares:

- Estándar Secundario de Roche para DENV serotipo 1 (DENV-1)
- Estándar Secundario de Roche para DENV serotipo 2 (DENV-2)
- Estándar Secundario de Roche para DENV serotipo 3 (DENV-3)
- Estándar Secundario de Roche para DENV serotipo 4 (DENV-4)
- Estándar Secundario de Roche para CHIKV genotipo asiático (CHIKV-Asian)
- Estándar Secundario de Roche para CHIKV genotipo Este, Central y Suráfrica (CHIKV-ECSA)
- Armored ARN para CHIKV genotipo África Occidental (CHIKV-WA)

Los estándares secundarios de Roche para DENV son sobrenadantes de cultivos virales inactivados por calor cuyos títulos pueden encontrarse en el primer panel de referencia internacional para los tipos de virus 1 a 4 del dengue (DENV-1 BB, DENV-2 AA, DENV-3 CC y DENV-4 BB) para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

Todavía no existen estándares internacionales disponibles para el CHIKV. Los estándares de Roche para CHIKV (CHIKV-Asian, CHIKV- ECSA), los sobrenadantes de cultivos virales inactivados por calor y el Armored RNA (CHIKV-WA) pueden encontrarse en el reactivo de referencia para ARN del CHIKV del CBER (CHIKV-RR).[34]

Respecto a los estándares secundarios de Roche para DENV-1 y CHIKV-Asian, se prepararon 3 series de diluciones independientes coformuladas con ambos estándares víricos con plasma humano normal conservado en EDTA negativo al virus (CHIKV y DENV). Cada serie de dilución se analizó con tres lotes distintos de kits de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV, con aproximadamente 63 réplicas por lote, lo que supone un total aproximado de 189 réplicas por concentración.

Respecto a los estándares secundarios de Roche para DENV-2, DENV-3, DENV-4, CHIKV-ECSA y Armored RNA para CHIKV-WA, se prepararon 3 series independientes de cada estándar vírico coformuladas para los miembros DENV-2 y CHIKV-ECSA y formuladas individualmente para DENV-3, DENV-4 y CHIKV-WA con plasma humano normal conservado en EDTA negativo al virus (CHIKV y DENV). Cada serie de dilución se analizó con tres lotes distintos de kits de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV, con aproximadamente 42 réplicas por lote, lo que supone un total aproximado de 126 réplicas por concentración.

Para calcular el LoD estimado de cada virus se utilizó el análisis PROBIT con los datos combinados de las series de dilución y los lotes de reactivos, junto con el límite inferior y superior del intervalo de confianza del 95% (Tabla 11). Las tasas de reactividad observadas en los estudios de LoD para cada virus se resumen en la Tabla 12 a la Tabla 18.

Tabla 11 Resultados del análisis PROBIT con datos del LoD obtenidos para los estándares víricos en plasma conservado en EDTA

Analito	Unidades de medición	LoD	Límite inferior del intervalo de confianza del 95%	Límite superior del intervalo de confianza del 95%
DENV-1	UI/ml	0,6	0,5	0,8
DENV-2	UI/ml	1,0	0,8	1,3
DENV-3	UI/ml	1,0	0,9	1,3
DENV-4	UI/ml	0,4	0,3	0,5
CHIKV Asian	UD*/ml	6,8	5,9	8,1
CHIKV ECSA	UD*/ml	9,3	7,9	11,5
CHIKV WA	UD*/ml	7,1	6,1	8,7

* Unidades detectables

Tabla 12 Resumen de las tasas de reactividad para DENV-1 en plasma conservado en EDTA

Concentración de ARN del DENV (UI/ml)	Número de reactivos	Número de réplicas válidas	% de reactividad	Límite inferior de confianza (unilateral) del 95%
1,69	189	189	100,0%	98,4%
0,85	187	189	98,9%	96,7%
0,42	163	189	86,2%	81,4%
0,21	119	189	63,0%	56,7%
0,11	81	189	42,9%	36,7%

Tabla 13 Resumen de las tasas de reactividad para DENV-2 en plasma conservado en EDTA

Concentración de ARN del DENV (UI/ml)	Número de reactivos	Número de réplicas válidas	% de reactividad	Límite inferior de confianza (unilateral) del 95%
3,49	126	126	100,0%	97,7%
1,75	125	126	99,2%	96,3%
0,87	116	126	92,8%	87,8%
0,44	92	126	73,0%	65,7%
0,22	60	126	47,6%	40,0%

Tabla 14 Resumen de las tasas de reactividad para DENV-3 en plasma conservado en EDTA

Concentración de ARN del DENV (UI/ml)	Número de reactivos	Número de réplicas válidas	% de reactividad	Límite inferior de confianza (unilateral) del 95%
1,40	126	126	100,00%	97,7%
0,70	106	126	84,1%	77,8%
0,35	85	124	68,5%	61,0%
0,17	48	125	38,4%	31,1%
0,09	21	125	16,8%	11,5%

Tabla 15 Resumen de las tasas de reactividad para DENV-4 en plasma conservado en EDTA

Concentración de ARN del DENV (UI/ml)	Número de reactivos	Número de réplicas válidas	% de reactividad	Límite inferior de confianza (unilateral) del 95%
2,40	126	126	100,0%	97,7%
1,20	126	126	100,0%	97,7%
0,60	124	126	98,4%	95,1%
0,30	116	126	92,1%	86,9%
0,15	90	126	71,4%	64,1%

Tabla 16 Resumen de las tasas de reactividad para CHIKV-Asian en plasma conservado en EDTA

Concentración de ARN del CHIKV (UD/ml)	Número de reactivos	Número de réplicas válidas	% de reactividad	Límite inferior de confianza (unilateral) del 95%
16,0	189	189	100,0%	98,4%
8,0	188	189	99,5%	97,5%
4,0	150	189	79,4%	73,9%
2,0	94	189	49,7%	43,5%
1,0	50	189	26,5%	21,2%

Tabla 17 Resumen de las tasas de reactividad para CHIKV-ECSA en plasma conservado en EDTA

Concentración de ARN del CHIKV (UD/ml)	Número de reactivos	Número de réplicas válidas	% de reactividad	Límite inferior de confianza (unilateral) del 95%
16,0	126	126	100,0%	97,7%
8,0	119	126	94,4%	89,8%
4,0	80	125	64,0%	56,3%
2,0	45	126	35,7%	28,6%
1,0	16	126	12,7%	8,1%

Tabla 18 Resumen de las tasas de reactividad para CHIKV-WA en plasma conservado en EDTA

Concentración de ARN del CHIKV (UD/ml)	Número de reactivos	Número de réplicas válidas	% de reactividad	Límite inferior de confianza (unilateral) del 95%
16,0	126	126	100,0%	97,7%
8,0	122	126	96,8%	92,9%
4,0	100	126	79,4%	72,5%
2,0	54	126	42,9%	35,4%
1,0	19	126	15,1%	10,1%

Reproducibilidad

La reproducibilidad de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV en los **cobas**® 6800/8800 Systems se ha determinado a partir de los estándares siguientes:

- Estándar Secundario de Roche para DENV serotipo 1 (DENV-1)
- Estándar Secundario de Roche para CHIKV genotipo asiático (CHIKV-Asian)

El estudio se basa en el análisis de 3 paneles de miembros CHIKV y DENV coformulados con una concentración aproximada de 0,5 x, 1 x y 2 x el LoD de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV para cada virus. Las pruebas se han realizado para determinar los siguientes componentes de variabilidad:

- Variabilidad entre días durante 3 días
- Variabilidad entre lotes con 3 lotes de reactivos diferentes de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV
- Variabilidad entre instrumentos con 3 **cobas**® 8800 Systems diferentes

Se analizaron aproximadamente 21 réplicas con cada uno de los 3 paneles, lo que supone un total de 63 réplicas con cada lote de reactivos. Todos los datos de reproducibilidad válidos se evaluaron calculando el porcentaje de resultados reactivos para cada nivel de concentración en todos los componentes variables.

Se calcularon los límites de los intervalos de confianza del 95% bilaterales de cada tasa de reactividad para cada uno de los tres niveles de CHIKV y DENV analizados durante 3 días, con 3 lotes de reactivos y 3 **cobas**® 8800 Systems distintos. La prueba **cobas**® CHIKV/DENV garantiza la reproducibilidad durante varios días, con varios lotes de reactivos y en diferentes equipos. En la Tabla 19 se resumen los resultados de la variabilidad entre lotes.

Tabla 19 Resumen de la reproducibilidad entre lotes de reactivos de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV

Analito	Concentración	Lote de reactivos	% de reactividad (réplicas reactivas/válidas)	Límite inferior del intervalo de confianza del 95%	Límite superior del intervalo de confianza del 95%
DENV-1	2 x LoD	1	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	100% (63/63)	94,3%	100,0%
	1 x LoD	1	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	96,8% (61/63)	89,0%	99,6%
	0,5 x LoD	1	92,1% (58/63)	82,4%	97,4%
		2	84,1% (53/63)	72,7%	92,1%
		3	82,5% (52/63)	70,9%	90,9%
CHIKV-Asian	2 x LoD	1	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	100% (63/63)	94,3%	100,0%
	1 x LoD	1	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	98,4% (62/63)	91,5%	100,0%
	0,5 x LoD	1	77,8% (49/63)	65,5%	87,3%
		2	87,3% (55/63)	76,5%	94,4%
		3	73,0% (46/63)	60,3%	83,4%

Verificación del genotipo

El rendimiento de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV para la detección de los 4 serotipos de DENV y los 3 genotipos de CHIKV se determinó mediante el análisis de un total de 43 muestras clínicas únicas, 2 aislados en cultivo y 1 Armored RNA (aRNA) con serotipos/genotipos conocidos. Las 43 muestras clínicas se analizaron sin diluir y tras la dilución con plasma humano normal conservado en EDTA negativo al virus (CHIKV y DENV) añadido a una concentración de 4 x LoD de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV.

Todas las muestras clínicas y los aislados en cultivo se detectaron sin diluir y con una concentración de 4 x LoD (Tabla 20).

Tabla 20 Muestras clínicas, aislados en cultivo y Armored RNA de CHIKV/DENV

Fragmento objetivo	Genotipo/Serotipo	Muestras	% de reactividad (muestras reactivas/analizadas) sin diluir	% de reactividad (muestras reactivas/analizadas) diluidas a 4 x LoD
CHIKV	Asiático	10 muestras clínicas	100% (10/10)	100% (10/10)
	ECSA	1 aislado en cultivo	100% (1/1)	100% (1/1)
	África Occidental	1 aRNA	100% (1/1)	100% (1/1)
DENV	1	10 muestras clínicas	100% (10/10)	100% (10/10)
	2	10 muestras clínicas	100% (10/10)	100% (10/10)
	3	3 muestras clínicas, 1 aislado en cultivo	100% (4/4)	100% (4/4)
	4	10 muestras clínicas	100% (10/10)	100% (10/10)

Especificidad analítica

La especificidad analítica de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV se evaluó mediante la reactividad cruzada con 31 microorganismos a una concentración de 10^5 -10^6 copias, equivalentes genómicos, UI o UFC/ml, que incluían 24 aislados víricos, seis cepas bacterianas y un aislado de levadura (Tabla 21). Los microorganismos se añadieron a plasma humano normal conservado en EDTA negativo al virus (CHIKV y DENV) y se analizaron con y sin virus CHIKV y DENV (coformulados) añadidos a una concentración de aproximadamente 3 x LoD de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV. Los microorganismos analizados no presentan reactividad cruzada ni interfieren con la prueba **cobas**® CHIKV/DENV.

Tabla 21 Microorganismos analizados para la especificidad analítica

Virus	Flavivirus	Bacterias	Levadura
Adenovirus tipo 5	Virus de la encefalitis japonesa	*Escherichia coli*	*Candida albicans*
Citomegalovirus	Virus de la encefalitis del Valle Murray	*Propionibacterium acnes*	
Virus de Epstein-Barr	Virus de la encefalitis de St. Louis	*Staphylococcus aureus*	
Virus de la hepatitis A	Virus Usutu	*Staphylococcus epidermidis*	
Virus de la hepatitis B	Virus del Nilo Occidental	*Streptococcus viridans*	
Virus de la hepatitis C	Virus de la fiebre amarilla	*Staphylococcus haemolyticus*	
Virus de la hepatitis E	Virus Zika		
Virus de la hepatitis G			
Virus del herpes simple tipo 1			
Virus del herpes simple tipo 2			
Virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1 grupo M)			
Virus de inmunodeficiencia humana (VIH-2)			
Virus linfotrópico de células T humanas tipo I			
Virus linfotrópico de células T humanas tipo II			
Virus del herpes humano tipo 6 A			
Virus de la gripe A			
Virus de la varicela zóster			

Se analizaron muestras de plasma de cada uno de los estadios de la enfermedad (Tabla 22) con y sin CHIKVand DENV (coformulado) añadidos a una concentración de aproximadamente 3 x LoD de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV para cada virus. Los estadios de la enfermedad no presentan reactividad cruzada ni interfieren con la prueba **cobas**® CHIKV/DENV.

Tabla 22 Muestras de cada estadio de la enfermedad analizadas para la determinación de la especificidad analítica

Estadio de la enfermedad		
Adenovirus tipo 5	Virus de la hepatitis C	Virus linfotrópico de células T humanas tipo I
Citomegalovirus	Virus de la hepatitis E	Virus linfotrópico de células T humanas tipo II
Virus de Epstein-Barr	Virus del herpes simple tipo 1	Parvovirus B19
Virus de la hepatitis A	Virus del herpes simple tipo 2	Virus del Nilo Occidental
Virus de la hepatitis B	Virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) grupo M	

Especificidad analítica: sustancias interferentes

Sustancias endógenas causantes de interferencias

Se analizaron las muestras de plasma con niveles anormalmente elevados de triglicéridos (hasta 33,0 g/l), hemoglobina (hasta 2,0 g/l), bilirrubina no conjugada (hasta 0,20 g/l), albúmina (hasta 60,0 g/l) y ADN humano (hasta 0,002 g/l) con y sin CHIKV y DENV (coformulados) añadidos a una concentración de 3 x LoD de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV. Las muestras que contienen estas sustancias endógenas no influyeron en la sensibilidad o especificidad de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV.

Sustancias exógenas causantes de interferencias

Se analizaron muestras de plasma humano normal conservado en EDTA y negativo para el virus (CHIKV y DENV) con concentraciones anormalmente elevadas de fármacos (Tabla 23) con y sin CHIKV y DENV (coformulado) añadidos a una concentración de 3 x LoD de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV para cada virus. Estas sustancias exógenas no influyeron en la sensibilidad o especificidad de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV.

Tabla 23 Concentraciones de fármacos añadidos al plasma conservado en EDTA

Nombre del fármaco analizado	Concentración
Acetaminofeno	1.337 µmol/l
Ácido acetilsalicílico	3.657 µmol/l
Ácido ascórbico	346 µmol/l
Atorvastatina	606 µg Eq/l
Fluoxetina	11,3 µmol/l
Ibuprofeno	2.450 µmol/l
Loratadina	0,8 µmol/l
Nadolol	3,9 µmol/l
Naproxeno	2.192 µmol/l
Paroxetina	3,1 µmol/l
Fenilefrina HCL	496 µmol/l
Sertralina	2,0 µmol/l

Correlación

Evaluación del rendimiento de la prueba cobas® CHIKV/DENV en comparación con la prueba RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 y la prueba RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0

Se comparó el rendimiento de la prueba **cobas**® CHIKV/DENV con la prueba RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 y la prueba RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 (Altona Diagnostics) con 100 muestras individuales positivas para CHIKV mediante NAT, 100 muestras individuales positivas para DENV mediante NAT y 100 muestras de plasma negativas para CHIKV y DENV.

Las muestras negativas se analizaron sin diluir con las pruebas **cobas**® CHIKV/DENV, RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 y RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0, mientras que las muestras positivas se analizaron sin diluir con la prueba **cobas**® CHIKV/DENV y la prueba RealStar® correspondiente.

Las muestras seronegativas mostraron una especificidad del 100% al generar 100 de 100 resultados no reactivos con los tres métodos.

Respecto a las muestras positivas, la prueba **cobas**® CHIKV/DENV ofrece una sensibilidad mayor para CHIKV y DENV que las pruebas RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 y RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0. Según la prueba de McNemars, los métodos no eran concordantes (Tabla 24).

Tabla 24 Correlación de muestras positivas (sin diluir)

Métodos		Resultados para fragmentos objetivo víricos individuales	
Prueba RealStar® CHIKV RT-PCR Kit 2.0 Prueba RealStar® DENV RT-PCR Kit 2.0	**cobas® CHIKV/DENV**	**CHIKV**	**DENV**
No reactivo	No reactivo	1	0
Reactivo	No reactivo	0	0
No reactivo	Reactivo	14	19
Reactivo	Reactivo	85	81
Total		100	100
Prueba de McNemar, valor p (bilateral, $\alpha = 0,05$)		0,0001	0,0000

Fallo de todo el sistema

La tasa de fallo de todo el sistema para la prueba **cobas**® CHIKV/DENV se determinó mediante el análisis de 100 réplicas de plasma conservado en EDTA a las que se añadió CHIKV y DENV (coformulados). Estas muestras se analizaron con una concentración de fragmento objetivo de aproximadamente 3 x LoD y se ejecutaron en pooles de 1 (sin diluir). El estudio se realizó con el **cobas**® 6800 System y el **cobas p** 680 instrument (pipeteo y pooling).

Los resultados del estudio indican que todas las réplicas fueron reactivas para cada fragmento objetivo, lo que representa una tasa de fallo de todo el sistema del 0%. El intervalo de confianza bilateral exacto del 95% fue del 0% para el límite inferior y del 3,62% para el límite superior [0%: 3,62%].

Información adicional

Características principales de la prueba

Tipo de muestra	Plasma
Cantidad mínima de muestra necesaria	1000 µl
Cantidad de muestra procesada	850 µl
Duración de la prueba	Los resultados están listos en menos de 3,5 horas desde la carga de la muestra en el sistema.

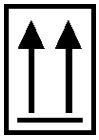
Símbolos

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

Tabla 25 Símbolos utilizados en las etiquetas de los productos de PCR para diagnóstico de Roche

Age/DOB	Edad o fecha de nacimiento		Fecha de fabricación
SW	Software auxiliar	D	Distribuido por
Assigned Range [copies/mL]	Intervalo asignado (copias/ml)		No deben reutilizarse
Assigned Range [IU/mL]	Intervalo asignado (UI/ml)		Mujeres
EC REP	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Para evaluación del rendimiento IVD únicamente
BARCODE	Hoja de datos del código de barras	GTIN	Global Trade Item Number (número mundial de un artículo comercial)
LOT	Código de serie	IVD	Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*
	Riesgo biológico	LLR	Límite inferior del intervalo asignado
REF	Número de catálogo		Hombres
Collect Date	Fecha de recogida		Fabricante
	Consulte las instrucciones de uso	CONTROL –	Control negativo
Σ	Suficiente para <*n*> pruebas	NON STERILE	Sin esterilizar
CONTENT	Contenido del kit	#	Número del paciente
CONTROL	Control	?	Nombre del paciente

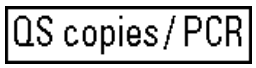
Abrir aquí



Este lado hacia arriba

Control positivo

Identificación exclusiva del dispositivo



Copias QS por reacción de PCR, utilice copias QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.

Procedimiento ultrasensible

UI de QS por reacción de PCR, utilice las unidades internacionales (UI) de QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.

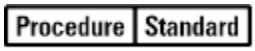
Límite superior del intervalo asignado

Número de serie

Línea de llenado de orina

Centro

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.



Procedimiento estándar

Fecha de caducidad

Esterilizado con óxido de etileno

Dispositivo para pruebas cerca del paciente

Almacenar en la oscuridad

Dispositivo no apto para pruebas cerca del paciente

Límite de temperatura

Dispositivo para autoexamen

Archivo de definición de pruebas

Dispositivo no apto para autoexamen

Marcado CE de conformidad; este dispositivo cumple con los requisitos aplicables para el marcado CE de un producto sanitario para diagnóstico *in vitro*.

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

Fabricante y distribuidores

Tabla 26 Fabricante y distribuidores

Fabricado en los Estados Unidos

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com

Fabricado en los EE. UU.

Distributed by

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

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

Marcas registradas y patentes

Este producto está cubierto por una o más patentes de EE. UU. con n.º 8962293, 9102924, 8609340, 9234250, 8097717, 8192958, 10059993 y 10358675, y por las patentes equivalentes extranjeras.

COBAS, COBAS OMNI y AMPERASE son marcas comerciales de Roche.

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

ProClin® es una marca registrada de Rohm and Haas Company.

MICROLAB® es una marca comercial registrada de Hamilton Company.

BD PPT™ es una marca comercial de Becton, Dickinson & Company.

VACUETTE® es una marca comercial registrada de Greiner Bio-One GmbH LLC.

REALSTAR® es una marca comercial registrada de Altona Diagnostics GmbH.

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

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

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

Copyright

©2021 Roche Molecular Systems, Inc.

CE IVD

Bibliografía

1. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. J Virol 1998;72:73-83.
2. Stramer SL. Current perspectives on transfusion-transmitted infectious disease: emerging and re-emerging infections. ISBT Sci Ser 2014;9:30-36.
3. Petersen LR, Busch MP. Transfusion-transmitted arboviruses. Vox Sang 2010;98:495-503.
4. Petersen LR, Tomashek KM, Biggerstaff BJ. Estimated prevalence of dengue viremia in Puerto Rican blood donors, 1995 through 2010. Transfusion 2012;52:1647-1651.
5. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. Nature 2013;496:504-507.
6. Stramer SL, Linnen CM, Carrick JM, et al. Dengue viremia in blood donors identified by RNA and detection of dengue transfusion transmission during the 2007 dengue outbreak in Puerto Rico. Transfusion 2012;52:1657-1666.
7. Gan VC, Leo YS. Current epidemiology and clinical practice in arboviral infections - implications on blood supply in South-East Asia. ISBT Sci Ser 2014 Jul;9:262-267.
8. ProMed. Dengue virus transmission—China (HK), Archive number 20221011.5526. October 10, 2002. http://www.promedmail.org (accessed July 14, 2017).
9. AABB. Dengue viruses. www.aabb.org/tm/eid/Documents/dengue-viruses.pdf (updated February 2014; accessed July 14, 2017).
10. Tambyah PA, Koay ESC, Poon ML, Lin RV, Ong BK; Transfusion-Transmitted Dengue Infection Study Group. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. N Engl J Med 2008;359:1526-1527.
11. Sabino EC, Loureiro P, Lopes ME, et al. Transfusion-transmitted dengue and associated clinical symptoms during the 2012 epidemic in Brazil. J Infect Dis 2016;213:694-702.
12. Levi JE. Dengue virus and blood transfusion. J Infect Dis 2016;213:689-690.
13. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. Transfusion 2009;49:1S-29S.
14. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. Lancet Infect Dis 2017;17:e107-e117.
15. World Health Organization (WHO). Chikungunya fact sheet. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/ (updated April 2017; accessed July 14, 2017).
16. Brouard C, Bernillon P, Quatresous I, et al. Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007. Transfusion 2008;48:1333-1341.
17. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, et al. Genome microevolution of chikungunya virus causing Indian Ocean outbreak. PloS Med 2006;3:e263.
18. Liumbruno GM, Calteri D, Petropulacos K, et al. The chikungunya epidemic in Italy and its repercussions on the blood system. Blood Transfus 2008;6:199-210.
19. Zeller H, Bortel Van W, Sudre B. Chikungunya: its history in Africa and Asia and its spread to new regions in 2013-2014. J Infect Dis 2016;214(suppl 5):S436-S440.

20. Roiz D, Boussès P, Simard F, Paupy C, Fontenille D. Autochthonous chikungunya transmission and extreme climate events in Southern France. PLoS Negl Trop Dis 2015;9:e0003854.

21. Johansson MA, Powers AM, Pesik N, Cohen NJ, Staples JE. Nowcasting the spread of chikungunya virus in the Americas. PLoS One 2014;9:e104915.

22. Pan American Health Organization (PAHO). Number of reported cases of chikungunya fever in the America, by country or territory, 2017 (as of June 2, 2017). www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=8975&itemid=40931&lang=en (accessed June 5, 2017).

23. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya virus in the United States, 2014 final data for the United States. http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2014.html (last updated October 30, 2015; last accessed July 20, 2017)

24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya virus in the United States, 2015 final data for the United States. http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2015.html (last updated June 23, 2016; last accessed July 20, 2017)

25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya virus, 2016 provisional data for the United States. www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2016.html (last updated January 18, 2017; accessed June 5, 2017)

26. Rocha V. Virus-transmitting yellow fever mosquitoes discovered in L.A. County. Los Angeles Times, October 15, 2014. http://www.latimes.com/local/lanow/la-me-In-yellow-fever-mosquito-los-angeles-20141015-story.html.

27. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene 1990;93:125-128.

28. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. Nature 1995;373:487-493.

29. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. Cell 1995;80:869-878.

30. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (NY) 1992;10:413-417.

31. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real-time quantitative PCR. Genome Res 1996;986-994.

32. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.

33. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

34. Añez G, Jiang Z, Heisey DA, Kerby S, Rios M, Chikungunya virus Collaborative Study Group. Collaborative study for the characterization of a chikungunya virus RNA reference ragent for use in nucleic acid testing. Vox Sang 2015;109: 312-318.

Revisión del documento

Información de revisión del documento	
Doc Rev. 3.0 03/2021	Se han actualizado las advertencias de peligro. Se ha actualizado el apartado **Marcas registradas y patentes**. Se ha actualizado la dirección del distribuidor. Se ha incluido el símbolo Rx Only en la primera página. Se ha incluido la declaración “Fabricado en”. Se ha actualizado la página de símbolos armonizados. Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.