

## **Instrucciones de uso**

**RealStar<sup>®</sup>**

**Bordetella PCR Kit 1.0**

01/2017 ES

# RealStar®

## Bordetella PCR Kit 1.0

Para utilizar con

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)



531013

96

01 2017

altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

MAN-531010-ES-S01

## Contenido

<b>1. Uso indicado.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Componentes del kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Almacenamiento .....</b>	<b>6</b>
<b>4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados .....</b>	<b>7</b>
<b>5. Información general .....</b>	<b>8</b>
<b>6. Descripción del producto.....</b>	<b>11</b>
6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real.....	12
<b>7. Advertencias y precauciones .....</b>	<b>13</b>
<b>8. Procedimiento .....</b>	<b>14</b>
8.1 Preparación de las muestras .....	14
8.2 Preparación de la Master Mix .....	15
8.3 Preparación de la reacción .....	17
<b>9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real.....</b>	<b>18</b>
9.1 Configuración .....	18
9.2 Detectores de fluorescencia .....	18
9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia .....	19
<b>10. Análisis de datos.....</b>	<b>20</b>
10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas .....	20
10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas .....	20
10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas .....	20
10.2 Interpretación de los resultados .....	21
10.2.1 Análisis cualitativo.....	21

<b>11. Evaluación de rendimiento .....</b>	<b>22</b>
11.1 Sensibilidad analítica .....	22
11.2 Especificidad analítica.....	24
11.3 Precisión .....	25
<b>12. Limitaciones .....</b>	<b>27</b>
<b>13. Control de calidad.....</b>	<b>28</b>
<b>14. Servicio técnico.....</b>	<b>28</b>
<b>15. Bibliografía .....</b>	<b>28</b>
<b>16. Marcas comerciales e información legal .....</b>	<b>29</b>
<b>17. Explicación de los símbolos .....</b>	<b>30</b>

## 1. Uso indicado

El RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa y diferenciación del ADN específico de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*.

## 2. Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen[μl/vial]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	Positive Control	1	250
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

## 3. Almacenamiento

- El RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deben llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento del producto. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.
- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.

- Proteja Master A y Master B de la luz.

## 4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

- Instrumento adecuado de PCR en tiempo real (ver capítulo 6.1, Instrumentos de PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico adecuados
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Centrífuga con rotor para placas de microtitulación, si se utilizan placas de reacción de 96 pocillos
- Agitador vortex
- Placas de reacción de 96 pocillos adecuadas o tubos de reacción con el material de cierre (óptico) correspondiente
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtro (desechables)
- Guantes sin talco (desechables)

### NOTA

**i**

**Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se instalen, se calibren, se comprueben y se mantengan conforme a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.**

**i**

**Se recomienda encarecidamente utilizar el rotor de 72 pocillos con los tubos de reacción de 0,1 ml adecuados, si se utiliza el Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o el Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).**

## 5. Información general

La *Bordetella pertussis* y la *Bordetella parapertussis* son los agentes patógenos causantes de la tos ferina, una enfermedad tísica en humanos altamente contagiosa y aguda [1, 2]. Otras especies del género *Bordetella* también pueden causar enfermedades respiratorias en humanos. La *Bordetella holmesii* se asociaba principalmente a enfermedades similares a la tos ferina [3, 4] y la *Bordetella bronchiseptica*, que ocasionalmente causa enfermedades tísicas, infecta a una amplia variedad de mamíferos, incluidos los humanos. Pueden producirse infecciones graves en personas inmunocomprometidas [5].

Todas las especies de *Bordetella* que pueden causar enfermedades respiratorias en humanos portan elementos transponibles de ADN, también conocidas como secuencias de inserción (IS, por sus siglas en inglés). Estas secuencias de inserción suelen estar presentes en varias copias por genoma (ver Tabla 1), lo que permite el diseño de sistemas de PCR de una alta sensibilidad.

Tabla 1: Secuencias de inserción IS481 y IS1001 de *Bordetella*, adaptadas a partir de Loeffelholz [6]

Presencia/n.º de copias por genoma <sup>1</sup>				
Secuencia de inserción	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. bronchiseptica</i> <sup>2</sup>
IS481	+/>50	-/NA	+/8-10	(+) <sup>3</sup> /ND
IS1001	-/NA	+/~20	-/NA	(+) <sup>4</sup> /1-7

<sup>1</sup> Símbolos y abreviaturas: +, presente en todos los aislados; (+), presente en algunos aislados; -, ausente en todos los aislados; NA, no aplicable; ND, no determinado.

<sup>2</sup> Solo aislados de *B. bronchiseptica* de origen humano.

<sup>3</sup> Uno de los 73 aislados de origen humano fue positivo.

<sup>4</sup> Cuatro de los 73 aislados de origen humano fueron positivos.

Con más de 50 copias por genoma [7], la secuencia de inserción IS481 es el objetivo preferido para la detección de *Bordetella pertussis*. Este objetivo también está presente en la *Bordetella holmesii*, con números de copias que oscilan entre los 8 y 10 copias por genoma [7] y se encuentra con poca frecuencia en cepas de *Bordetella bronchiseptica* [8].

El genoma de la *Bordetella parapertussis* porta aproximadamente 20 copias de la secuencia de inserción IS1001, lo que facilita la detección de alta sensibilidad de PCR, pero también se encuentra en algunas cepas de *Bordetella bronchiseptica* con números de copia que oscilan entre 1 y 7 copias por genoma [7].

Hay diferencias entre las necesidades diagnósticas de los cuadros clínicos y las de salud pública. En el contexto de los cuadros clínicos, el objetivo es optimizar la sensibilidad (no dejar escapar ningún caso) a la vez que se proporcionan resultados rápidos. Esto asegura un tratamiento adecuado y evita una transmisión posterior. En el contexto de la salud pública, se necesita un alto grado de especificidad (en la mayoría de países, una infección por *B. pertussis* es de notificación obligatoria, pero no una infección por otra especie de *Bordetella*) para evitar intervenciones de salud pública innecesarias e ineficaces [9].

A efectos de ofrecer la más alta sensibilidad, así como la más alta especificidad, el Bordetella PCR Kit 1.0 de RealStar® establece como objetivo el IS481 para la detección de *Bordetella pertussis* y el IS1001 para la detección de *Bordetella parapertussis*.

- [1] Zhang X, Weyrich LS, Lavine JS, Karanikas AT, Harvill ET. Lack of cross-protection against *Bordetella holmesii* after pertussis vaccination. *Emerg Infect Dis*. Noviembre de 2012;18(11):1771-9.
- [2] He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, Mertsola J. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA*. 19 de agosto de 1998;280(7):635-7.
- [3] Rodgers L, Martin SW, Cohn A, Budd J, Marcon M, Terranella A, Mandal S, Salamon D, Leber A, Tondella M-L, Tatti K, Spicer K, Emanuel A, Koch E, McGlone L, Pawloski L, LeMaile-Williams M, Tucker N, Iyer R, Clark TA, DiOrio M. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis*—Ohio, 2010-2011. *Clin. Infect. Dis*. Febrero de 2013; 56:322–331.
- [4] Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* ADN in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol*. Diciembre de 2011;49(12):4347-8.
- [5] Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella subspecies*. *Clin Microbiol Rev*. Abril de 2005;18(2):326-82.
- [6] Loeffelholz M. Towards Improved Accuracy of *Bordetella pertussis* Nucleic Acid Amplification Tests. *J Clin Microbiol*. Julio de 2012, 50(7):2186-2190.
- [7] Reischl U, Lehn N, Sanden GN, Loeffelholz MJ. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J Clin Microbiol*. Mayo de 2001;39(5):1963-6.
- [8] Tatti KM, Sparks KN, Boney KO, Tondella ML. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. Diciembre de 2011;49(12).
- [9] <http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/index.html>

## 6. Descripción del producto

El RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa y diferenciación del ADN específico de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*. El test incluye un sistema de amplificación heterólogo (Control interno) para identificar una posible inhibición de PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

La tecnología de PCR utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias de objetivo específicas y sondas específicas de objetivos para la detección del ADN amplificado. Las sondas se marcan con fluoróforos Reporter y Quencher.

Las sondas específicas para el ADN de *Bordetella pertussis* (objetivo IS481) están marcadas con el fluorocromo FAM™, mientras que las sondas específicas para el ADN de *Bordetella parapertussis* (objetivo IS1001) están marcadas con un fluorocromo que muestra similares características de Cy®5. La sonda específica para el Control interno está marcada con el fluorocromo JOE™.

El uso de sondas unidas a diferentes fluorocromos permite la detección paralela del ADN específico de *Bordetella pertussis* (objetivo IS481) y *Bordetella parapertussis* (objetivo IS1001), así como del Control interno en los canales de detección correspondientes del instrumento de PCR en tiempo real.

El test consta de tres procesos en un solo tubo:

- Amplificación de PCR del ADN diana y del Control interno
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se compone de:

- Dos reactivos Master (Master A y Master B)
- Control interno
- Control positivo [*Bordetella pertussis* + *Bordetella parapertussis*]
- Agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (tampón de PCR, ADN polimerasa, sal de magnesio cebadores y sondas) para permitir la amplificación mediante la PCR y la detección del ADN específico de *Bordetella pertussis* (objetivo IS481) y *Bordetella parapertussis* (objetivo IS1001), y el Control interno en una configuración de reacción.

### 6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se desarrolló y se validó para su uso con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

## 7. Advertencias y precauciones

Lea las instrucciones de uso detenidamente antes de utilizar el producto.

- Antes del primer uso, compruebe los siguientes puntos respecto al producto y sus componentes:
  - Integridad
  - Si está completo en cuanto a número, tipo y volumen (ver capítulo 2. Componentes del kit)
  - Etiquetaje correcto
  - Si está congelado al llegar
- El uso de este producto está limitado al personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras deben tratarse siempre como si fueran infecciosas o biopeligrosas conforme a los procedimientos de seguridad en el laboratorio.
- Utilice guantes protectores desechables sin talco, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (ADNsas/RNasas) de la muestra y de los componentes del kit.
- Utilice siempre puntas de pipetas desechables libres de ADNsas/RNasas con barreras de aerosol.
- Utilice siempre guantes protectores desechables sin talco cuando manipule los componentes del kit.
- Utilice áreas de trabajo separadas para (i) la preparación de las muestras, (ii) la configuración de reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de manera unidireccional. Utilice siempre guantes desechables en cada área y cámbieselos antes de acceder a un área distinta.
- Utilice suministros y equipamiento en cada área de trabajo separada y no los translade de un área a otra.

- Almacene el material positivo o presuntamente positivo separadamente de todos los demás componentes del kit.
- No abra los tubos o placas de reacción después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.
- Pueden utilizarse controles adicionales utilizando de acuerdo con las pautas o requisitos de las regulaciones locales, estatales y/o federales, o de organizaciones de acreditación.
- No esterilice en el autoclave los tubos de reacción después de la PCR, ya que no degradará el ácido nucleico amplificado y conllevará el riesgo de contaminar la zona del laboratorio.
- No utilice componentes del kit cuya fecha de caducidad.
- Descarte muestras y residuos del test conforme a las regulaciones locales de seguridad.

## 8. Procedimiento

### 8.1 Preparación de las muestras

El ADN extraído es el material inicial para el RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0.

La calidad del ADN extraído tiene una repercusión fundamental en el rendimiento del test. Debe garantizarse que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología de PCR en tiempo real. Los siguientes kits y sistemas son adecuados para la extracción de ácido nucleico:

- QIAamp® ADN Mini Kit (QIAGEN)
- QIAasymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

También pueden resultar adecuados sistemas alternativos de extracción de ácido nucleico.

La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico para su uso con el RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 debe validarla el usuario.

Si utiliza un procedimiento de preparación de muestras basado en centrifugación (spin column, en inglés) que incluya tampones de lavado que contengan etanol, se recomienda encarecidamente seguir un paso de centrifugación adicional durante 10 minutos a aproximadamente 17 000 x g (~13 000 rpm), utilizando un tubo de recogida nuevo, antes de la elución del ácido nucleico.

#### PRECAUCIÓN



***Si su sistema de preparación de pruebas utiliza tampones de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor de la PCR en tiempo real.***



***El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.***

Si necesita más información o asistencia técnica en relación con el pretratamiento y la preparación de muestras, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

### 8.2 Preparación de la Master Mix

Todos los reactivos y muestras deben descongelarse completamente, mezclarse (pipeteando o aplicando un vortex suave) y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 contiene un Control interno heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de PCR.



- ▶ Si se utiliza el Control interno como control de inhibición de PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de muestras, prepare la Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control	1 µl	12 µl
<b>Volumen de Master Mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

- ▶ Si se utiliza el Control interno como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de PCR, añada el Control interno durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar que método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el Control interno **no debe** añadirse directamente a la muestra. El Control interno debe añadirse siempre a la mezcla de muestra y tampón de lisis. El volumen del Control interno que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 10 % del volumen de la elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de tampón de elución o agua, deberán añadirse 6 µl de Control interno por muestra a la mezcla de muestra/tampón de lisis.
- ▶ Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación de muestras, configure la Master Mix conforme al siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
<b>Volumen de Master Mix</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

**PRECAUCIÓN**

*Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación, al menos el control negativo debe incluir el Control interno.*



*Sin importar que método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el Control interno directamente a la muestra.*

**8.3 Preparación de la reacción**

- ▶ Pipetee 20 µl de la Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos o un tubo de reacción óptica.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl del control (control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
<b>Volumen total</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Asegúrese de que se utilicen cada control positivo y al menos uno negativo por serie.
- ▶ Mezcle a fondo las muestras y los controles con la Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una lámina adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.
- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrífuga con un rotor de placa de microtitulación durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

## 9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real

Para obtener información básica sobre la preparación y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para obtener instrucciones detalladas para la programación en relación con el uso del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 en instrumentos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

### 9.1 Configuración

- Defina la siguiente configuración:

Configuración	
Volumen de reacción	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	ROX™

### 9.2 Detectores de fluorescencia

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
ADN específico de <i>Bordetella pertussis</i>	Objetivo IS481	FAM™	(Ninguno)
ADN específico de <i>Bordetella parapertussis</i>	Objetivo IS1001	Cy®5	(Ninguno)
Internal Control (Control interno)	IC	JOE™	(Ninguno)

## 9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

- Defina el perfil de temperatura y la detección de fluorescencia:

	Modo de análisis	Ciclo Repeticiones	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Desnaturalización	Retención	1	-	95	02:00
Amplificación	Ciclo	45	-	95	0:15
			sí	58	0:45
			-	72	0:15

## 10. Análisis de datos

Para ver información básica en relación con el análisis de datos en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 en diferentes instrumentos específicos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

### 10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

#### 10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas

Para que una serie de pruebas diagnósticas sea **válida**, deben cumplirse las siguientes condiciones de control:

Id. de control	Canal de detección		
	FAM™	Cy®5	JOE™
Control positivo [ <i>Bordetella pertussis</i> + <i>Bordetella parapertussis</i> ]	+	+	+/-*
Control negativo	-	-	+

\* La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ no es relevante para la validez de la prueba.

#### 10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas

Una serie de pruebas diagnósticas es **no válida**(i) si la serie no se ha completado o (ii) si no se cumple cualquiera de las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas **válida**.

En caso de que obtenga una serie de pruebas diagnósticas **no válida**, repita las pruebas utilizando el resto de ácidos nucleicos purificados o empiece de nuevo con las muestras originales.

## 10.2 Interpretación de los resultados

### 10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección			Interpretación del resultado
FAM™	Cy®5	JOE™	
+	+	+*	<i>Bordetella pertussis</i> y se ha detectado ADN específico de <i>Bordetella parapertussis</i> . <sup>1,2</sup>
+	-	+*	Se ha detectado ADN específico de <i>Bordetella pertussis</i> . <sup>1</sup>
-	+	+*	Se ha detectado ADN específico de <i>Bordetella parapertussis</i> . <sup>2</sup>
-	-	+	No se ha detectado ADN específico de <i>Bordetella pertussis</i> ni de <i>Bordetella parapertussis</i> . La muestra no contiene cantidades detectables de ADN específico de <i>Bordetella pertussis</i> ni de <i>Bordetella parapertussis</i> .
-	-	-	Inhibición de la PCR o fallo del reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.

\* La detección del Control interno en el canal de detección JOE™ no es necesaria para resultados positivos en el canal de detección FAM™ o en el canal de detección Cy®5. Una carga alta de ADN de *Bordetella pertussis* (objetivo IS481) y/o *Bordetella parapertussis* (objetivo IS1001) en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

<sup>1</sup> Una señal positiva en el canal FAM™ podría deberse también a la presencia de ADN de *Bordetella holmesii* o de *B. bronchiseptica* en la muestra.

<sup>2</sup> Una señal positiva en el canal Cy®5 podría deberse también a la presencia de ADN de *Bordetella bronchiseptica* en la muestra.

## 11. Evaluación de rendimiento

### 11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se define como la concentración (copias/μl del eluido) de moléculas de ADN específico de *Bordetella pertussis* (objetivo IS481) o *Bordetella parapertussis* (objetivo IS1001) que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de la serie de diluciones de ADN de *Bordetella pertussis* (objetivo IS481) y de ADN de *Bordetella parapertussis* (objetivo IS1001).

Tabla 2: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ADN de la *Bordetella pertussis* (objetivo IS481)

Conc. [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,600	18	18	100
10,000	18	18	100
3,160	18	18	100
1,000	18	18	100
0,316	18	14	78
0,100	18	8	44
0,032	18	8	44
0,010	18	0	0
0,003	18	0	0

Tabla 3: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ADN de la *Bordetella parapertussis* (objetivo IS1001)

Conc. [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,600	18	18	100
10,000	18	18	100
3,160	18	18	100
1,000	18	18	100
0,316	18	14	78
0,100	18	9	50
0,032	18	2	11
0,010	18	0	0
0,003	18	0	0

La sensibilidad analítica del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ADN específico del IS481 de *Bordetella pertussis*, la sensibilidad analítica es de 0,74 copias/μl para [95 % de intervalo de confianza de 0,39 a 2,08 copias/μl]
- Para la detección de ADN específico del IS1001 de *Bordetella parapertussis*, la sensibilidad analítica es de 0,60 copias/μl para [95 % de intervalo de confianza de 0,35 a 1,54 copias/μl]

## 11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se garantiza mediante la selección exhaustiva de los oligonucleótidos (cebadores y sondas). Los oligonucleótidos se comprobaron mediante un análisis de comparación con secuencias disponibles públicamente para asegurar que se detectarán todos los genotipos relevantes de *Bordetella*.

La especificidad analítica del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se evaluó probando un panel de ARN/ADN genómico extraído de bacterias relacionadas con *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* y otros patógenos que causan síntomas similares, como *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*.

El RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Adenovirus humano 1
- Adenovirus humano 4
- Enterovirus, Coxsackie A3
- Metapneumovirus humano A2
- Metapneumovirus humano B2
- Virus de la gripe A
- Virus de la gripe B
- Virus parainfluenza 1
- Virus parainfluenza 2
- Virus parainfluenza 3
- Virus parainfluenza 4a/b
- Virus sincitial respiratorio humano A
- Virus sincitial respiratorio humano B
- *Chlamydophila pneumoniae*
- *Chlamydophila psittaci*
- *Corynebacterium diphtheriae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Mycobacterium avium*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Neisseria meningitidis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Bordetella petrii*
- *Bordetella trematum*
- *Bordetella hinzii*
- *Bordetella avium*
- *Bordetella bronchiseptica* IS481-

## 11.3 Precisión

La precisión para el RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se determinó como variabilidad de intratest (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad de intertest (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). La variabilidad total se calculó combinando los tres análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación, basándose en valores de ciclo de umbral de ( $C_t$ ). Se analizaron al menos seis replicados por muestra para variabilidad intratest, intertest e interlote.

Tabla 4: Datos de precisión para la detección específica del ADN de *Bordetella pertussis* (objetivo IS481) y *Bordetella parapertussis* (objetivo IS1001)

<i>Bordetella pertussis</i> (objetivo IS481) y <i>Bordetella parapertussis</i> (objetivo IS1001)		Ciclo de umbral medio ( $C_t$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	Objetivo IS481	30,84	0,12	0,40
	Objetivo IS1001	30,44	0,14	0,46
Variabilidad intertest	Objetivo IS481	30,83	0,12	0,37
	Objetivo IS1001	30,63	0,20	0,65
Variabilidad interlote	Objetivo IS481	30,76	0,12	0,38
	Objetivo IS1001	30,45	0,10	0,34
Variabilidad total	Objetivo IS481	30,79	0,12	0,40
	Objetivo IS1001	30,56	0,20	0,65

Tabla 5: Datos de precisión para la detección del Control interno

Control interno	Ciclo de umbral medio ( $C_t$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	27,05	0,15	0,55
Variabilidad intertest	26,71	0,16	0,61
Variabilidad interlote	26,94	0,17	0,63
Variabilidad total	26,82	0,23	0,84

## 12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se limita a personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que esta test tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.
- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que esta prueba tenga un rendimiento óptimo.
- Esta el test no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben llevarse a cabo métodos adecuados de extracción de ácido nucleico antes de utilizar esta prueba de valoración.
- La presencia de inhibidores de la PCR (p.ej. heparina) puede provocar falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del genoma de *Bordetella pertussis* (objetivo IS481) y *Bordetella parapertussis* (objetivo IS1001) cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar fallos al detectar la presencia de los patógenos.
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

- Muchas especies de *Bordetella* portan elementos de ADN transponibles, las conocidas como secuencias de inserción (IS, por sus siglas en inglés). En particular, la IS481 está presente con un número alto de copias en el genoma de *Bordetella pertussis* y la IS1001 está en el genoma de *Bordetella parapertussis*. El elemento transponible IS481 también se encuentra con un número medio de copias en el genoma de *Bordetella holmesii* y con una incidencia muy baja en el genoma de algunas cepas de *Bordetella bronchiseptica*. El elemento transponible IS1001 también puede estar presente con un número bajo de copias en el genoma de *Bordetella bronchiseptica*.

### 13. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

### 14. Servicio técnico

Si necesita asesoramiento técnico, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico:

**E-mail:** support@altona-diagnostics.com  
**Teléfono:** +49-(0)40-5480676-0

### 15. Bibliografía

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise y David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10.ª edición. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G. and Steven M. Opal. Infectious Diseases, tercera edición. Mosby, 2010.

### 16. Marcas comerciales e información legal

RealStar® (Altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIA Symphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

No debe considerarse que los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso aunque no se marquen específicamente como tales, carecen de protección legal.



El RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.

Producto sin licencia con Health Canada y sin autorización ni aprobación de la FDA.

No disponible en todos los países.

© 2017 Altona Diagnostics GmbH; reservados todos los derechos.

## 17. Explicación de los símbolos

	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de producto
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión

## Notas:



**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

