

## Istruzioni per l'uso

# RealStar<sup>®</sup> Bordetella PCR Kit 1.0

01/2017 IT



# RealStar<sup>®</sup>

## Bordetella PCR Kit 1.0

Per uso con

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



531013



96



01 2017



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

## Contenuto

<b>1.</b>	<b>Usò previsto .....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Componenti del kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Conservazione.....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Materiale e dispositivi richiesti e non forniti .....</b>	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Informazioni generali .....</b>	<b>8</b>
<b>6.</b>	<b>Descrizione del prodotto .....</b>	<b>11</b>
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale .....	12
<b>7.</b>	<b>Avvertenze e precauzioni .....</b>	<b>13</b>
<b>8.</b>	<b>Procedura .....</b>	<b>14</b>
8.1	Preparazione del campione .....	14
8.2	Preparazione della Master Mix.....	15
8.3	Preparazione della reazione .....	17
<b>9.</b>	<b>Programmazione dello strumento PCR in tempo reale .....</b>	<b>18</b>
9.1	Impostazioni .....	18
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti) .....	18
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti .....	19
<b>10.</b>	<b>Analisi dei dati.....</b>	<b>19</b>
10.1	Validità dei test diagnostici .....	20
10.1.1	Test diagnostico valido .....	20
10.1.2	Test diagnostico invalido .....	20
10.2	Interpretazione dei risultati .....	21
10.2.1	Analisi qualitativa .....	21
<b>11.</b>	<b>Dati di performance .....</b>	<b>22</b>

11.1	Sensibilità analitica.....	22
11.2	Specificità analitica.....	23
11.3	Precisione .....	24
<b>12.</b>	<b>Limitazioni .....</b>	<b>26</b>
<b>13.</b>	<b>Controllo di qualità .....</b>	<b>27</b>
<b>14.</b>	<b>Assistenza tecnica .....</b>	<b>27</b>
<b>15.</b>	<b>Letteratura .....</b>	<b>27</b>
<b>16.</b>	<b>Marchi e brevetti.....</b>	<b>28</b>
<b>17.</b>	<b>Spiegazione dei simboli .....</b>	<b>29</b>

## 1. Uso previsto

Il RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo e la differenziazione del DNA specifico di *Bordetella pertussis* e di *Bordetella parapertussis*.

## 2. Componenti del kit

Colore coperchio	Componente	Numero di fiale	Volume [µl/fiale]
Blu	Master A	8	60
Viola	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rosso	Positive Control	1	250
Bianco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control (IC) = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

Water (PCR grade) = Acqua (testata per PCR)

## 3. Conservazione

- Il RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit devono arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al momento della ricezione o se le provette sono state danneggiate durante la spedizione, contattare Altona Diagnostics GmbH per assistenza.
- Tutti i componenti devono essere conservati tra -25°C e -15°C dopo l'arrivo.
- Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti (più di due volte) dei reagenti Master, poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote in caso di utilizzo intermittente.
- La conservazione tra +2°C e +8°C non deve superare un periodo di due ore.
- Proteggere il Master A e il Master B dalla luce.

## 4. Materiale e dispositivi richiesti e non forniti

- Strumento PCR in tempo reale appropriato (vedere capitolo 6.1 Strumenti PCR in tempo reale)
- Sistema o kit di estrazione di acidi nucleici appropriato
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Centrifuga con rotore per piastre per microtitolazione, se si utilizzano piastre di reazione a 96 pozzetti
- Vortex mixer
- Piastre di reazione o provette di reazione appropriate a 96 pozzetti con materiale di chiusura (ottico) corrispondente
- Pipette (regolabili)
- Puntali con filtro (monouso)
- Guanti senza polvere (monouso)

### NOTA



*Assicurarsi che tutti gli strumenti utilizzati siano stati installati, calibrati, controllati e sottoposti a manutenzione secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.*

### NOTA



*Si consiglia di utilizzare il rotore a 72 pozzetti con le appropriate provette di reazione da 0,1 ml, se si utilizza il Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o il Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).*

## 5. Informazioni generali

*Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* sono i patogeni che causano la pertosse, una malattia estremamente contagiosa e acuta che causa tosse dell'essere umano [1, 2]. Anche altre specie del genere *Bordetella* possono causare patologie respiratorie nell'essere umano. La *Bordetella holmesii* è stata associata a una patologia simile alla pertosse solo recentemente [3, 4], e la *Bordetella bronchiseptica* infetta un'ampia serie di mammiferi, tra cui l'uomo, occasionalmente causando tosse. Nelle persone immunodepresse possono presentarsi infezioni gravi [5].

Tutte le specie di *Bordetella* che causano una patologia respiratoria nell'uomo portano degli elementi di DNA trasponibili, le cosiddette sequenze di inserzione (IS), solitamente presenti in più copie per genoma (si veda la Tabella 1); ciò permette la progettazione di sistemi PCR che offrono un'elevata sensibilità.

**Tab. 1:** Sequenze di inserzione IS481 e IS1001 di *Bordetella*, adattato da Loeffelholz [6]

Presenza/n° di copie per genoma <sup>1</sup>				
Sequenza di inserzione	<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> Simboli e abbreviazioni: +, presenti in tutti gli isolati; (+), presenti in alcuni isolati; -, assenti da tutti gli isolati; NA, non applicabile; ND, non determinato.

<sup>2</sup> Solo isolati di *B. bronchiseptica* derivati da essere umano.

<sup>3</sup> Uno dei 73 isolati derivati da essere umano era positivo.

<sup>4</sup> Quattro dei 73 isolati derivati da essere umano erano positivi.

Con più di 50 copie per genoma [7], la sequenza di inserzione IS481 è il target preferito per il rilevamento di *Bordetella pertussis*. Questo target è presente anche in *Bordetella holmesii*, con numeri di copie che vanno da 8 a 10 copie per genoma [7] e si trova raramente nei ceppi di *Bordetella bronchiseptica* [8].



Il genoma di *Bordetella parapertussis* porta circa 20 copie della sequenza di inserzione IS1001, il che facilita un'elevata sensibilità per il rilevamento con PCR, ma si trova anche in alcuni ceppi di *Bordetella bronchiseptica* con numeri di copie che vanno da 1 a 7 copie per genoma [7].

Vi sono differenze tra le necessità diagnostiche dell'ambito clinico rispetto a quello della sanità pubblica. In ambito clinico, l'obiettivo è di ottimizzare la sensibilità (non perdere casi) pur offrendo risultati rapidi; ciò assicura un trattamento appropriato e impedisce un'ulteriore trasmissione. Nell'ambito della sanità pubblica è necessario invece un elevato grado di specificità (nella maggior parte dei paesi un'infezione da *B. pertussis* deve essere riferita alle autorità, ma non un'infezione causata da altre specie di *Bordetella*) per evitare interventi di sanità pubblica non necessari e inefficaci [9].

A favore della massima sensibilità, pur offrendo la massima specificità possibile, il RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 mira alla sequenza di inserzione IS481 per il rilevamento di *Bordetella pertussis* e alla sequenza IS1001 per il rilevamento di *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*. Novembre 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 agosto 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*. Febbraio 2013; 56:322–331.
- [4] Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol*. Dicembre 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. Aprile 2005;18(2):326-82.
- [6] Loeffelholz M. Towards Improved Accuracy of *Bordetella pertussis* Nucleic Acid Amplification Tests. J Clin Microbiol. Luglio 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. Maggio 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. Dicembre 2011;49(12).
- [9] <http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/index.html>

## 6. Descrizione del prodotto

Il RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo e la differenziazione del DNA specifico di *Bordetella pertussis* e di *Bordetella parapertussis*.

Il test include un sistema di amplificazione eterologa (controllo interno) per identificare la possibile inibizione della PCR e per confermare l'integrità dei reagenti del kit.

La tecnologia PCR in tempo reale utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR) per l'amplificazione di sequenze target specifiche e sonde target specifiche per la rilevazione del DNA amplificato. Le sonde sono marcate con un reporter fluorescente (fluoroforo) ed un quencher.

Le sonde specifiche per il DNA di *Bordetella pertussis* (Target IS481) sono marcate con il fluoroforo FAM™ mentre le sonde specifiche per il DNA di *Bordetella parapertussis* (Target IS1001) sono marcate con il fluoroforo Cy®5. La sonda specifica per il controllo interno (IC) è marcata con il fluoroforo JOE™.

L'uso di sonde collegate a coloranti distinguibili consente il rilevamento in parallelo del DNA specifico di *Bordetella pertussis* (Target IS481) e *Bordetella parapertussis* (Target IS1001), nonché il rilevamento del controllo interno nei corrispondenti canali di rivelazione dello strumento PCR in tempo reale.

Il test comprende due processi in un'unica provetta:

- Amplificazione per PCR del DNA target e del controllo interno
- Rilevamento simultaneo di ampliconi da PCR mediante sonde marcate con colorante fluorescente

Il RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 è composto da:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control [*Bordetella pertussis* + *Bordetella parapertussis*]
- Water (PCR grade)

Internal Control = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

Water (PCR grade) = Acqua (testata per PCR)

Master A e Master B contengono tutti i componenti (tampone per PCR, DNA polimerasi, sali di magnesio, primers e sonde) per consentire l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento del DNA specifico di *Bordetella pertussis* (Target IS481), *Bordetella parapertussis* (Target IS1001) e del controllo interno in una singola reazione.

### 6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti di PCR in tempo reale:

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

## 7. Avvertenze e precauzioni

*Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare il prodotto.*

- Prima del primo utilizzo, controllare il prodotto e i suoi componenti per:
  - Integrità
  - Completezza rispetto a numero, tipo e riempimento (vedere il capitolo 2. Componenti del kit)
  - Etichette corrette
  - Congelamento all'arrivo
- L'utilizzo di questo prodotto è limitato al personale appositamente istruito e addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*.
- I campioni devono essere sempre trattati come infettivi e/o pericolosi secondo le procedure di laboratorio sicure.
- Indossare guanti protettivi monouso senza polvere, un camice da laboratorio e una protezione per gli occhi durante la manipolazione dei campioni.
- Evitare la contaminazione microbica e nucleasica (DNasi/RNasi) dei campioni e dei componenti del kit.
- Utilizzare sempre puntali per pipette monouso privi di DNasi/RNasi.
- Indossare sempre guanti protettivi usa e getta senza polvere quando si maneggiano i componenti del kit.
- Utilizzare aree di lavoro separate e isolate per (i) preparazione del campione, (ii) impostazione della reazione e (iii) attività di amplificazione/rilevazione. Il flusso di lavoro in laboratorio dovrebbe procedere in modo unidirezionale. Indossare sempre guanti monouso in ogni area e cambiarli prima di entrare in un'altra area.
- Dedicare materiali di consumo e attrezzature alle aree di lavoro separate e non spostarle da un'area all'altra.
- Conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separato da tutti gli altri componenti del kit.

- Non aprire le provette/piastre di reazione dopo l'amplificazione, per evitare contaminazione con ampliconi.
- Controlli aggiuntivi possono essere testati secondo le linee guida o i requisiti delle normative locali, statali e/o federali o delle organizzazioni di accreditamento.
- Non sterilizzare in autoclave le provette dopo la PCR, poiché ciò non distrugge gli acidi nucleici amplificati e rischierà di contaminare l'area di laboratorio.
- Non utilizzare componenti del kit che hanno superato la data di scadenza.
- Eliminare i rifiuti dei campioni e del test in base alle normative di sicurezza locali.

## 8. Procedura

### 8.1 Preparazione del campione

Il DNA estratto è il materiale di partenza per il RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0.

La qualità del DNA estratto ha un profondo impatto sulle prestazioni dell'intero saggio. È necessario garantire che il sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico sia compatibile con la tecnologia PCR in tempo reale. I seguenti kit e sistemi sono indicati per l'estrazione dell'acido nucleico:

- QIAamp® DNA 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)

Potrebbero anche essere appropriati sistemi e kit di estrazione alternativi. L'idoneità della procedura di estrazione dell'acido nucleico per l'uso con RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 deve essere convalidata dall'utente.

Se si utilizza una procedura di preparazione del campione basata su colonna di centrifugazione che include tamponi di lavaggio contenenti etanolo, si consiglia di effettuare un'ulteriore fase di centrifugazione per 10 minuti a circa 17000 x g (~ 13000 rpm), usando una nuova provetta di raccolta, prima dell'eluizione dell'acido nucleico.

### ATTENZIONE



***Se il sistema di preparazione dei campioni utilizza tamponi di lavaggio contenenti etanolo, assicurarsi di eliminare eventuali tracce di etanolo prima dell'eluizione dell'acido nucleico. L'etanolo è un forte inibitore della PCR in tempo reale.***

### ATTENZIONE



***L'uso dell'RNA carrier è fondamentale per l'efficienza di estrazione e la stabilità dell'acido nucleico estratto.***

Per ricevere ulteriori informazioni e assistenza tecnica riguardanti pre-trattamento e preparazione dei campioni contattare il nostro servizio di assistenza tecnica (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

## 8.2 Preparazione della Master Mix

Tutti i reagenti e i campioni devono essere completamente scongelati, miscelati (mediante pipettaggio o passaggio delicato su un agitatore vortex) e centrifugati brevemente prima dell'uso.

Il RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 contiene un controllo interno (IC) eterologo, che può essere utilizzato o come controllo di inibizione della PCR o come controllo della procedura di preparazione del campione (estrazione dell'acido nucleico) e come controllo di inibizione della PCR.

- ▶ Se l'IC viene utilizzato come controllo di inibizione della PCR, ma non come controllo della procedura di preparazione del campione, impostare la Master Mix secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controllo interno	1 µl	12 µl
<b>Volume Master Mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

- ▶ Se l'IC viene utilizzato come controllo per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere l'IC durante la procedura di estrazione dell'acido nucleico.
- ▶ Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, l'IC **non deve** essere aggiunto direttamente al campione. L'IC deve essere sempre aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi. Il volume dell'IC da aggiungere dipende sempre e soltanto dal volume di eluizione. Rappresenta il 10% del volume di eluizione. Ad esempio, se l'acido nucleico deve essere eluito in 60 µl di tampone di eluizione o acqua, devono essere aggiunti 6 µl di IC per campione nella miscela campione/tampone di lisi.
- ▶ Se l'IC è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, preparare la Master Mix secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
<b>Volume Master Mix</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

#### ATTENZIONE



*Se l'IC (controllo interno) è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, almeno il controllo negativo deve includere l'IC.*



**ATTENZIONE**

*Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, non aggiungere mai l'IC direttamente al campione.*

### 8.3 Preparazione della reazione

- ▶ Pipettare 20 µl di Master Mix in ciascuno dei pozzetti richiesti di un'appropriata piastra di reazione ottica a 96 pozzetti o di un'appropriata provetta di reazione ottica.
- ▶ Aggiungere 10 µl di campione (eluato dall'estrazione dell'acido nucleico) o 10 µl del controllo (controllo positivo o negativo).

Preparazione della reazione	
Master Mix	20 µl
Campione o controllo	10 µl
<b>Volume totale</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Assicurarsi che ogni controllo positivo e almeno un controllo negativo siano utilizzati ad ogni esecuzione del saggio.
- ▶ Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con la Master Mix pipettando su e giù.
- ▶ Chiudere la piastra di reazione a 96 pozzetti con tappi o pellicola adesiva ottica adeguati e le provette di reazione con tappi appropriati.
- ▶ Centrifugare la piastra di reazione a 96 pozzetti in una centrifuga con rotore per piastra di microtitolazione per 30 secondi a circa 1000 x g (~ 3000 rpm).

## 9. Programmazione dello strumento PCR in tempo reale

Per informazioni di base sull'impostazione e la programmazione dei diversi strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sulla programmazione dell'utilizzo del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 su specifici strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

### 9.1 Impostazioni

- Definire i seguenti parametri:

Impostazioni	
Volume di reazione	30 µl
Velocità di rampa	Predefinito
Riferimento passivo	ROX™

### 9.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

Target	Nome sonda	Reporter	Quencher
DNA specifico di <i>Bordetella pertussis</i>	Target IS481	FAM™	(Nessuno)
DNA specifico di <i>Bordetella parapertussis</i>	Target IS1001	Cy®5	(Nessuno)
Controllo interno	IC	JOE™	(Nessuno)

### 9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti

- Impostare il profilo della temperatura e l'acquisizione del colorante:

	Fase	Ripetizioni del ciclo	Acquisizione	Temperatura [°C]	Durata [min:sec]
Denaturazione	Mantenimento	1	-	95	02:00
Amplificazione	Ciclaggio	45	-	95	00:15
			sì	58	00:45
			-	72	00:15

## 10. Analisi dei dati

Per informazioni di base sull'analisi dei dati su specifici strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sull'analisi dei dati generati con RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 su diversi strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

## 10.1 Validità dei test diagnostici

### 10.1.1 Test diagnostico valido

Un test diagnostico è **valido** se sono soddisfatte le seguenti condizioni di controllo:

Controllo	Canale		
	FAM™	Cy®5	JOE™
Controllo Positivo [ <i>Bordetella pertussis</i> e <i>Bordetella parapertussis</i> ]	+	+	+/-*
Controllo negativo	-	-	+

\* La presenza o l'assenza di un segnale nel canale JOE™ non è rilevante per la validità dell'esecuzione del test.

### 10.1.2 Test diagnostico invalido

Un test diagnostico **non è valido**, (i) se l'esecuzione non è stata completata o (ii) se una delle condizioni di controllo per un test diagnostico **valido** non è soddisfatta.

In caso di test diagnostici **non validi** ripetere i test utilizzando gli acidi nucleici purificati rimanenti o ricominciare dai campioni originali.

## 10.2 Interpretazione dei risultati

### 10.2.1 Analisi qualitativa

Canale			Interpretazione dei risultati
FAM™	Cy®5	JOE™	
+	+	+*	Rilevato DNA specifico di <i>Bordetella pertussis</i> e di <i>Bordetella parapertussis</i> . <sup>1,2</sup>
+	-	+*	Rilevato DNA specifico di <i>Bordetella pertussis</i> . <sup>1</sup>
-	+	+*	Rilevato DNA specifico di <i>Bordetella parapertussis</i> . <sup>2</sup>
-	-	+	Non è stato rilevato DNA specifico né di <i>Bordetella pertussis</i> né di <i>Bordetella parapertussis</i> . Il campione non contiene quantità rilevabili di DNA specifico di <i>Bordetella pertussis</i> o <i>Bordetella parapertussis</i> .
-	-	-	Inibizione della PCR o guasto del reagente. Ripetere i test dal campione originale o raccogliere e testare un nuovo campione.

\* Il rilevamento del controllo interno nel canale di rilevamento JOE™ non è necessario in caso di risultati positivi nel canale di rilevamento FAM™ o nel canale di rilevamento Cy®5. Un elevato carico di DNA di *Bordetella pertussis* (Target IS481) e/o *Bordetella parapertussis* (Target IS1001) nel campione può portare a segnali del controllo interno ridotti o assenti.

<sup>1</sup> Un segnale positivo nel canale FAM™ può essere dovuto anche alla presenza di DNA di *Bordetella holmesii* o *B. bronchiseptica* nel campione.

<sup>2</sup> Un segnale positivo nel canale Cy®5 può essere dovuto anche alla presenza di DNA di *Bordetella bronchiseptica* nel campione.

## 11. Dati di performance

### 11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 è definita come la concentrazione (copie/μl dell'eluato) di molecole di DNA specifico di *Bordetella pertussis* (Target IS481) o *Bordetella parapertussis* (Target IS1001) che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata dall'analisi delle diluizioni seriali di DNA *Bordetella pertussis* (Target IS481) quantificato e *Bordetella parapertussis* (Target IS1001) quantificato.

**Tab. 2:** Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di *Bordetella pertussis* (Target IS481)

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
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

**Tab. 3:** Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di *Bordetella parapertussis* (Target IS1001)

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
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 sensibilità analitica del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 è stata determinata dall'analisi Probit:

- Per il rilevamento di DNA specifico di *Bordetella pertussis* (Target IS481), la sensibilità analitica è di 0,74 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,39 - 2,08 copie/μl]
- Per il rilevamento di DNA specifico di *Bordetella parapertussis* (Target IS1001), la sensibilità analitica è di 0,60 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,35 - 1,54 copie/μl]

## 11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 è assicurata dall'accurata selezione degli oligonucleotidi (primer e sonde). Gli oligonucleotidi sono stati controllati mediante analisi comparativa delle sequenze rispetto a sequenze pubblicamente disponibili per garantire che tutti i genotipi pertinenti di *Bordetella* fossero rilevati.

La specificità analitica del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 è stata valutata analizzando un pannello dell'RNA/di DNA genomico estratto da batteri correlati a *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* e da altri patogeni che causano sintomi simili a *Bordetella pertussis* e a *Bordetella parapertussis*.

Il RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

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

### 11.3 Precisione

La precisione del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 è stata determinata come variabilità intra-dosaggio (variabilità all'interno di un esperimento), variabilità inter-dosaggio (variabilità tra esperimenti diversi) e variabilità inter-lotto (variabilità tra lotti di produzione diversi). La variabilità totale è stata calcolata combinando le tre analisi.



I dati di variabilità sono espressi in termini di deviazione standard e coefficiente di variazione sulla base del ciclo soglia ( $C_t$ ) - valori. Almeno sei replicati per campione sono stati analizzati per la variabilità intra-dosaggio, inter-dosaggio e inter-lotto.

**Tab. 4:** Dati di precisione per il rilevamento di DNA specifico di *Bordetella pertussis* (Target IS481) e *Bordetella parapertussis* (Target IS1001)

<i>Bordetella pertussis</i> (Target IS481) e <i>Bordetella parapertussis</i> (Target IS1001)		Ciclo soglia medio ( $C_t$ )	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	Target IS481	30,84	0,12	0,40
	Target IS1001	30,44	0,14	0,46
Variabilità inter-dosaggio	Target IS481	30,83	0,12	0,37
	Target IS1001	30,63	0,20	0,65
Variabilità inter-lotto	Target IS481	30,76	0,12	0,38
	Target IS1001	30,45	0,10	0,34
Variabilità totale	Target IS481	30,79	0,12	0,40
	Target IS1001	30,56	0,20	0,65

**Tab. 5:** Dati di precisione per il rilevamento del controllo interno

Controllo interno	Ciclo soglia me- dio ( $C_t$ )	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	27,05	0,15	0,55
Variabilità inter-dosaggio	26,71	0,16	0,61
Variabilità inter-lotto	26,94	0,17	0,63
Variabilità totale	26,82	0,23	0,84

## 12. Limitazioni

- Per risultati ottimali è richiesta la rigorosa osservanza delle istruzioni per l'uso.
- L'utilizzo di questo prodotto è limitato al personale appositamente istruito e addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*.
- La buona pratica di laboratorio è essenziale per la corretta esecuzione di questo test. È necessario prestare la massima attenzione per preservare la purezza dei componenti del kit e le impostazioni di reazione. Tutti i reagenti devono essere attentamente monitorati per impurità e contaminazione. Eventuali reagenti sospetti devono essere eliminati.
- Per l'esecuzione ottimale di questo test sono necessarie adeguate procedure di raccolta, trasporto, conservazione ed elaborazione dei campioni.
- Questo test non deve essere utilizzato direttamente sul campione. Prima di utilizzare questo test, devono essere condotti appropriati metodi di estrazione dell'acido nucleico.
- La presenza di inibitori della PCR (ad es. eparina) può causare risultati falsi negativi o non validi.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare una il mancato rilevamento della presenza dei patogeni.
- Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati del RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 devono essere interpretati in considerazione di tutti i risultati clinici e di laboratorio.
- Molte specie di *Bordetella* sono portatrici di elementi genetici trasponibili, le cosiddette sequenze di inserzione (IS). In particolare IS481 è presente nel genoma della *Bordetella pertussis* con un alto numero di copie e IS1001 è presente nel genoma della *Bordetella parapertussis*. L'elemento trasponibile IS481 è presente anche nel genoma della *Bordetella holmesii* con un numero medio di copie e nel genoma di alcuni ceppi di *Bordetella bronchiseptica* con scarsa incidenza. L'elemento trasponibile IS1001 può trovarsi anche nel genoma della *Bordetella bronchiseptica* con un numero di copie esiguo.

### **13. Controllo di qualità**

In conformità con il sistema di gestione della qualità certificato ISO EN 13485 di Altona Diagnostics GmbH, ogni lotto di RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 è testato in base a specifiche prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

### **14. Assistenza tecnica**

Per l'assistenza ai clienti, si prega di contattare il nostro supporto tecnico:

**e-mail:**                    **support@altona-diagnostics.com**

**telefono:**                **+49-(0)40-5480676-0**

### **15. Letteratura**

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

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

## 16. Marchi e brevetti

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®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Nomi registrati, marchi, ecc. utilizzati in questo documento, anche se non specificamente contrassegnati come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

















Il RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 è un kit diagnostico marcato CE secondo la direttiva diagnostica *in vitro* europea 98/79/CE.

Prodotto non concesso in licenza con Health Canada e non approvato o autorizzato dalla FDA.

Non disponibile in tutti i Paesi.

© 2017 Altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

## 17. Spiegazione dei simboli

Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
	Lotto
	Colore del tappo
	Numero di catalogo
	Indice
	Numero
	Componente
	Global Trade Identification Number
	Istruzioni per l'uso
	Contiene sufficienti per "n" test / reazioni (rxns)
	Limite di temperatura
	Da usare entro
	Fornitore
	Attenzione
	Note
	Versione

**Note:**



**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)

