

Instruções de uso

RealStar[®]

Bordetella PCR Kit 1.0

01/2017 PT

RealStar®

Bordetella PCR Kit 1.0

Para utilização com

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

Conteúdo

| | |
|---|-----------|
| 1. Utilização Prevista | 6 |
| 2. Componentes do Kit | 6 |
| 3. Armazenamento | 6 |
| 4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos..... | 7 |
| 5. Informação de Base | 8 |
| 6. Descrição do Produto..... | 11 |
| 6.1 Instrumento de PCR em tempo real..... | 12 |
| 7. Avisos e Precauções | 13 |
| 8. Procedimento | 14 |
| 8.1 Preparação de Amostras..... | 14 |
| 8.2 Preparação da Master Mix..... | 15 |
| 8.3 Preparação da Reação | 17 |
| 9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real..... | 18 |
| 9.1 Definições | 18 |
| 9.2 Detetores de fluorescência (corantes) | 18 |
| 9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante..... | 19 |
| 10. Análise de Dados | 20 |
| 10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico..... | 20 |
| 10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido..... | 20 |
| 10.1.2 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido | 20 |
| 10.2 Interpretação dos Resultados | 21 |
| 10.2.1 Análise Qualitativa | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 11. Avaliação do Desempenho..... | 22 |
| 11.1 Sensibilidade Analítica | 22 |
| 11.2 Especificidade Analítica | 24 |
| 11.3 Precisão | 25 |
| 12. Limitações | 26 |
| 13. Controlo de Qualidade..... | 27 |
| 14. Apoio Técnico | 27 |
| 15. Bibliografia | 28 |
| 16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade | 28 |
| 17. Explicação de Símbolos | 29 |

1. Utilização Prevista

O RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção qualitativa e diferenciação do ADN específico do *Bordetella pertussis* e do *Bordetella parapertussis*.

2. Componentes do Kit

| Cor cobertura | Componente | Número de frascos | Volume [µl/tubo] |
|---------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Azul | Master A | 8 | 60 |
| Violeta | Master B | 8 | 180 |
| Verde | Internal Control | 1 | 1000 |
| Vermelho | Positive Control | 1 | 250 |
| Branco | Water (PCR grade) | 1 | 500 |

Internal Control = Controle interno

Positive Control = Controle positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da recepção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e 15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.

- O armazenamento entre +2 °C e +8 °C não deve exceder um período de duas horas.
- Proteger o Master A e o Master B da luz.

4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos

- Instrumento de PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos de PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- Centrífuga com um rotor para placas de microtitulação, aquando da utilização de placas de reação com 96 poços
- Agitador vortex
- Placas de reação com 96 poços ou tubos de reação adequados com material de fecho (óticos) correspondente
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipeta com filtros (descartáveis)
- Luvas sem pó (descartáveis)

NOTA



Certifique-se de que todos os instrumentos utilizados foram instalados, calibrados, verificados e mantidos de acordo com as instruções e recomendações do fabricante.



É altamente recomendada a utilização do rotor de 72 poços com tubos de reação de 0,1 ml adequados, se utilizando o Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou o Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informação de Base

Bordetella pertussis e *Bordetella parapertussis* são agentes patogênicos responsáveis por tosse convulsa, uma doença altamente contagiosa de tosse aguda em humanos [1, 2]. Outras espécies do género *Bordetella* podem também causar doenças respiratórias em humanos. *Bordetella holmesii* foi mais recentemente associada a doenças como a pertussis [3, 4] e *Bordetella bronchiseptica* infeta uma ampla variedade de mamíferos, incluindo humanos, ocasionalmente causando doenças relacionadas com tosse. As infeções graves podem ocorrer em pessoas que se encontram imunocomprometidos [5].

Todas as espécies *Bordetella* que causam doenças respiratórias em humanos transportam elementos de ADN transponível, as denominadas sequências de inserção (IS). Estas sequências de inserção encontram-se normalmente presentes em cópias múltiplas por genoma (ver tabela 1), permitindo a conceção de sistemas PCR que apresentam uma alta sensibilidade

Tabela 1: Sequências de inserção IS481 e IS1001 da *Bordetella* adaptadas de Loeffelholz [6]

| Presença/n.º de cópias por genoma ¹ | | | | |
|--|---------------------|-------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Sequência de inserção | <i>B. pertussis</i> | <i>B. parapertussis</i> | <i>B. holmesii</i> | <i>B. bronchiseptica</i> ² |
| IS481 | +/>50 | -/NA | +/8-10 | (+) ³ /ND |
| IS1001 | -/NA | +/~20 | -/NA | (+) ⁴ /1-7 |

¹ Símbolos e abreviaturas: +, presente em todos os isolados; (+), presente em alguns isolados; -, ausente em todos os isolados; NA, não aplicável; ND, não determinado.

² Apenas isolados de *B. bronchiseptica* de origem humana.

³ Um dos 73 isolados de origem humana foi positivo.

⁴ Quatro dos 73 isolados de origem humana foram positivos.

Com mais de 50 cópias por genoma [7], a sequência de inserção IS481 é o alvo favorável para a deteção de *Bordetella pertussis*. Este alvo também se encontra presente em *Bordetella holmesii*, com números de cópia que compreendem 8 a 10 cópias por genoma [7] e é encontrado de forma pouco frequente em estirpes [8] de *Bordetella bronchiseptica*.

O genoma de *Bordetella parapertussis* transporta aproximadamente 20 cópias da sequência de inserção IS1001, a qual facilita uma deteção de PCR altamente sensível, mas que também é encontrada em algumas estirpes de *Bordetella bronchiseptica* com números de cópias que compreendem 1 a 7 cópias por genoma [7].

Existem diferenças nas necessidades de diagnóstico em clínicas face a contextos de saúde pública. No contexto de uma clínica, o objetivo é otimizar a sensibilidade (não perder casos), fornecendo resultados rápidos em simultâneo. Isto assegura um tratamento adequado e evita a transmissões adicionais. No contexto da saúde pública, é necessário um alto grau de especificidade (na maioria dos países, uma infeção por *B. pertussis* é notificável, mas não uma infeção por outras espécies de *Bordetella*) de forma a evitar intervenções na saúde pública ineficientes e desnecessárias [9].

Em favor da mais elevada sensibilidade enquanto disponibiliza a mais elevada especificidade, o RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 atua sobre a IS481 para a deteção de *Bordetella pertussis* e sobre a IS1001 para a deteção de *Bordetella parapertussis*.

- [1] Zhang X, Weyrich LS, Lavine JS, Karanikas AT, Harvill ET. Falta de proteção cruzada contra *Bordetella holmesii* após a vacinação contra a pertussis. *Emerg Infect Dis.* 2012 Nov;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.* 1998 Aug 19;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. Dis.* 2013 Feb; 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.* 2011 Dec;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.* 2005 Apr;18(2):326-82.
- [6] Loeffelholz M. Towards Improved Accuracy of *Bordetella pertussis* Nucleic Acid Amplification Tests. *J Clin Microbiol.* 2012 Jul, 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.* 2001 May;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.* 2011 Dec;49(12).
- [9] <http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/index.html>

6. Descrição do Produto

O RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção qualitativa e diferenciação do ADN específico do *Bordetella pertussis* e do *Bordetella parapertussis*. O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) para identificar possíveis inibições da PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

A tecnologia de PCR em tempo real utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação das sequências alvo específicas e das sondas alvo específicas para a deteção do ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas para *B. pertussis* (Alvo IS481) ADN estão marcadas com o fluoróforo FAM™, ao passo que as sondas específicas para *B. parapertussis* (Alvo IS1001) ADN estão marcadas com o fluoróforo Cy®5. A sonda específica para o Controlo Interno está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do *B. pertussis* (Alvo IS481) e ADN específico do *B. parapertussis* (Alvo IS1001), assim como do Controlo Interno nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

O teste consiste em dois processos num único tubo de ensaio:

- Amplificação de PCR do ADN alvo e Controlo Interno
- Deteção simultânea de amplificações de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Controlo Positivo [*Bordetella pertussis* + *Bordetella parapertussis*]
- Água de grau PCR

Os reagentes Master A e Master B contêm todos os componentes (tampão de PCR, ADN polimerase, sal de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a amplificação mediada por PCR e para a deteção de alvos do ADN específico do *B. pertussis* (Alvo IS481) e *B. parapertussis* (Alvo IS1001), assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 foi desenvolvido e validado para utilização com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- 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. Avisos e Precauções

Leia as instruções de utilização cuidadosamente antes de utilizar o produto.

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a:
 - Integridade
 - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
 - Rotulagem correta
 - Congelado aquando do momento da entrega
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- Os espécimes devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivo, segundo os procedimentos laboratoriais de segurança.
- Utilize luvas protetoras descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- Evite contaminação microbiana e por nuclease (DNase/RNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- Utilize sempre pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase, com barreiras de aerossóis.
- Use sempre luvas protetoras descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas e isoladas para (i) a preparação da amostra, (ii) a preparação da reação e (iii) as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.

- Guarde o material positivo e/ou potencialmente positivo separado de todos os outros componentes do kit.
- Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- Os controlos adicionais poderão ser testados segundo as diretrizes ou requisitos de regulamentações estatais e/ou federais ou organizações acreditadas.
- Não utilize a autoclave para os tubos de reação após a PCR, dado que não iria degradar o ácido nucleico amplificado e iria suportar o risco de contaminar a área de laboratório.
- Não utilize componentes do kit que tenham passado do prazo de validade.
- Deite fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as regulamentações de segurança locais.

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O ADN extraído é o material inicial para o RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0.

A qualidade do ADN extraído tem um impacto profundo no desempenho de todo o sistema de teste. É necessário assegurar que o sistema utilizado para a extração de ácido nucleico é compatível com a tecnologia de PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para a extração de ácido nucleico:

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

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 deve ser validada pelo utilizador.

No caso da utilização de um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação, incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente um passo de centrifugação adicional de 10 min. a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um tubo de colheita novo, antes da eluição do ácido nucleico.

ATENÇÃO



Se o seu sistema de preparação de amostras utilizar tampões de lavagem contendo etanol, certifique-se de que elimina quaisquer vestígios de etanol antes da eluição do ácido nucleico. O Etanol é um forte inibidor de PCR em tempo real.



A utilização de ARN transportador é crucial para a eficiência da extração e estabilidade do ácido nucleico.

Para obter informações adicionais e assistência técnica relativamente ao pré-tratamento e preparação de amostras, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

8.2 Preparação da Master Mix

Todos os reagentes e amostras devem ser completamente descongelados, misturados (através de pipetagem ou por agitação ligeira em vortex) e centrifugados brevemente antes da utilização.

O RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 contém um Controlo Interno heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um controlo de inibição de PCR.

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado como um controlo de inibição de PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

| Número de Reações (reações) | 1 | 12 |
|-------------------------------------|--------------|---------------|
| Master A | 5 µl | 60 µl |
| Master B | 15 µl | 180 µl |
| Controlo Interno (Internal Control) | 1 µl | 12 µl |
| Volume da Master Mix | 21 µl | 252 µl |

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de PCR, adicione o Controlo Interno durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, o Controlo Interno **não deve** ser adicionado diretamente à amostra. O Controlo Interno deve ser sempre acrescentado à mistura de tampão de amostra/lise. O volume do Controlo Interno que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10% do volume da eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de tampão de eluição ou água, deve ser adicionado 6 µl de Controlo Interno por amostra à mistura de tampão de espécime/lise.
- ▶ Se o Controlo Interno for acrescentado durante o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

| Número de Reações (reações) | 1 | 12 |
|-----------------------------|--------------|---------------|
| Master A | 5 µl | 60 µl |
| Master B | 15 µl | 180 µl |
| Volume da Master Mix | 20 µl | 240 µl |

ATENÇÃO

Se o Controlo Interno foi adicionado durante o procedimento de preparação da amostra, pelo menos o controlo negativo deve incluir o Controlo Interno



Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, nunca adicione Controlo Interno diretamente ao espécime.

8.3 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 20 µl da Master Mix para cada poço necessário de uma placa de reação ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.
- ▶ Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl do controlo (controlo positivo ou negativo).

| Preparação da Reação | |
|----------------------|--------------|
| Master Mix | 20 µl |
| Controlo da Amostra | 10 µl |
| Volume Total | 30 µl |

- ▶ Certifique-se de que são utilizados todos os controlos positivos e pelo menos um controlo negativo por processamento.
- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche a placa de reação com 96 poços com as tampas adequadas ou uma película adesiva ótica e os tubos de reação adequados.
- ▶ Centrifugue a placa de reação com 96 poços numa centrífuga com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real

Para obter informações relativas à configuração e programação dos diferentes instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à utilização do RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

9.1 Definições

- Configure as seguintes definições:

| Definições | |
|--------------------|--------------|
| Volume de Reação | 30 µl |
| Taxa de rampa | Predefinição |
| Referência Passiva | ROX™ |

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

| Alvo | Nome do Detetor | Reporter | Quencher |
|---|------------------|----------|----------|
| ADN específico do <i>B. pertussis</i> | Alvo IS481 | FAM™ | (Nenhum) |
| ADN específico do <i>B. parapertussis</i> | Alvo IS1001 | Cy®5 | (Nenhum) |
| Controlo Interno (Internal Control) | Controlo Interno | JOE™ | (Nenhum) |

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

- Defina o perfil de temperatura e a aquisição de corante:

| | Modo de análise | Ciclo | Aquisição | Temperatura [°C] | Tempo [min: seg] |
|--------------|---------------------|-------|-----------|------------------|------------------|
| Desnaturação | Suspensão | 1 | - | 95 | 02:00 |
| Amplificação | Realização de Ciclo | 45 | - | 95 | 00:15 |
| | | | sim | 58 | 00:45 |
| | | | - | 72 | 00:15 |

10. Análise de Dados

Para obter informações básicas relativas à análise de dados em instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido

Para que um processamento de teste de diagnóstico seja **válido**, devem existir as seguintes condições de controlo:

| ID do Controlo | Canal de Detecção | | |
|--|-------------------|------|------|
| | FAM™ | Cy®5 | JOE™ |
| Controlo Positivo [<i>Bordetella pertussis</i> + <i>Bordetella parapertussis</i>] | + | + | +/-* |
| Controlo Negativo | - | - | + |

* A presença ou ausência de um sinal no canal JOE™ não é relevante para a validade do teste.

10.1.2 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido

Um processamento de teste de diagnóstico é **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se alguma das condições de controlo para um processamento de teste de diagnóstico **válido** não estiver presente.

No caso de um processamento de teste de diagnóstico **inválido** repita o teste utilizando os restantes ácidos nucleicos purificados ou comece a partir das amostras originais novamente.

10.2 Interpretação dos Resultados

10.2.1 Análise Qualitativa

| Canal de Detecção | | | Interpretação de Resultados |
|-------------------|------|------|--|
| FAM™ | Cy®5 | JOE™ | |
| + | + | +* | Foi detetado o ADN específico do <i>B. pertussis</i> e do <i>B. parapertussis</i> . ^{1,2} |
| + | - | +* | Foi detetado o ADN específico do <i>B. pertussis</i> . ¹ |
| - | + | +* | Foi detetado o ADN específico do <i>B. parapertussis</i> . ² |
| - | - | + | Não foi detetado o ADN específico do <i>B. pertussis</i> nem do <i>B. parapertussis</i> . A amostra não contém quantidades detetáveis do ADN específico do <i>B. pertussis</i> ou do <i>B. parapertussis</i> . |
| - | - | - | PCR inibição ou falha ao nível do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra. |

* Não é necessária a deteção do Controlo interno no canal de deteção JOE™ para resultados positivos no canal de deteção FAM™ ou no canal de deteção Cy®5. Carga(s) elevada(s) do ADN do *B. pertussis* (Alvo IS481) e/ou *B. parapertussis* (Alvo IS1001) na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno.

¹ A existência de um sinal positivo no canal FAM™ também pode ser devido à presença de ADN de *Bordetella holmesii* ou *B. bronchiseptica* na amostra.

² A existência de um sinal positivo no canal Cy®5 também pode ser devido à presença de ADN de *B. bronchiseptica* na amostra.

11. Avaliação do Desempenho

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 define-se como a concentração (cópias/μl de eluato) de moléculas de ADN específico do *B. pertussis* (Alvo IS481) ou *B. parapertussis* (Alvo IS1001) que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada através da análise de diluições seriadas de ADN quantificado de *B. pertussis* (Alvo IS481) e *B. parapertussis* (Alvo IS1001).

Tabela 2: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ADN específico do *B. pertussis* (Alvo IS481)

| Concentração inserida [cópias/μl] | Número de Réplicas | Número de Positivos | Taxa de Positividade [%] |
|-----------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| 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 |

Tabela 3: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ADN específico do *B. parapertussis* (Alvo IS1001)

| Concentração inserida [cópias/μl] | Número de Réplicas | Número de Positivos | Taxa de Positividade [%] |
|-----------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| 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 |

A sensibilidade analítica do RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a deteção de ADN específico da IS481 de *Bordetella pertussis*, a sensibilidade analítica é de 0,74 cópias/μl para [intervalo de confiança de 95%, 0,39 a 2,08 cópias/μl]
- Para a deteção de ADN específico da IS1001 de *Bordetella parapertussis*, a sensibilidade analítica é de 0,60 cópias/μl para [intervalo de confiança de 95%, 0,35 a 1,54 cópias/μl]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 é garantida pela seleção meticulosa dos oligonucleotídeos (primers e sondas). Os oligonucleotídeos foram verificados pela análise de comparação das sequências com sequências publicamente disponíveis, para garantir que todos os genótipos relevantes do *Bordetella* serão detetados.

A especificidade analítica do RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 foi avaliada através do teste a um painel de ARN/ADN genômico extraído de bactérias relacionadas com *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* e outros agentes patogênicos que provocam sintomas semelhantes a *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*.

O RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogênicos:

- Adenovírus humano 1
- Adenovírus humano 4
- Enterovírus, Coxsackie A3
- Metapneumovírus humano A2
- Metapneumovírus humano B2
- Vírus da gripe A
- Vírus da gripe B
- Vírus parainfluenza 1
- Vírus parainfluenza 2
- Vírus parainfluenza 3
- Vírus parainfluenza 4a/b
- Vírus sincicial respiratório humano A
- Vírus sincicial respiratório humano B
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Chlamydomphila psittaci*
- *Corynebacterium diptheriae*
- *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 Precisão

A precisão do RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 foi determinada com base na variabilidade Intra-ensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade Inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade Inter-lote (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises.

Os dados de variabilidade são expressos através do desvio padrão e do coeficiente de variação com base no ciclo limiar - valores (C_t). Pelo menos seis réplicas por amostra foram analisadas quanto a variabilidade Intra-ensaio, variabilidade Inter-ensaio e variabilidade Inter-lote.

Tabela 4: Dados de precisão para a detecção de ADN específico do *B. pertussis* (Alvo IS481) e do *B. parapertussis* (Alvo IS1001) (Alvo IS1001)

| | <i>B. pertussis</i> (Alvo IS481) e <i>B. parapertussis</i> (Alvo IS1001) | Ciclo limiar médio (C_t) | Desvio Padrão | Coeficiente de Variação [%] |
|-------------------------------|---|---------------------------------|------------------|--------------------------------|
| Variabilidade Intra-ensaio | <i>B. pertussis</i> (Alvo IS481) | 30,84 | 0,12 | 0,40 |
| | <i>B. parapertussis</i> (Alvo IS1001) | 30,44 | 0,14 | 0,46 |
| Variabilidade Inter-ensaio | <i>B. pertussis</i> (Alvo IS481) | 30,83 | 0,12 | 0,37 |
| | <i>B. parapertussis</i> (Alvo IS1001) | 30,63 | 0,20 | 0,65 |
| Variabilidade Inter-lote | <i>B. pertussis</i> (Alvo IS481) | 30,76 | 0,12 | 0,38 |
| | <i>B. parapertussis</i> (Alvo IS1001) | 30,45 | 0,10 | 0,34 |
| Variabilidade Total | <i>B. pertussis</i> (Alvo IS481) | 30,79 | 0,12 | 0,40 |
| | <i>B. parapertussis</i> (Alvo IS1001) | 30,56 | 0,20 | 0,65 |

Tabela 5: Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno

| Controlo Interno | Ciclo limiar médio (C _t) | Desvio Padrão | Coefficiente de Variação [%] |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------|------------------------------|
| Variabilidade Intra-ensaio | 27,05 | 0,15 | 0,55 |
| Variabilidade Inter-ensaio | 26,71 | 0,16 | 0,61 |
| Variabilidade Inter-lote | 26,94 | 0,17 | 0,63 |
| Variabilidade Total | 26,82 | 0,23 | 0,84 |

12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as instruções de utilização é necessária para resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente no espécime. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores PCR (p.e. heparina) pode provocar falsos negativos ou resultados inválidos.

- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma do *B. pertussis* (Alvo IS481) e *B. parapertussis* (Alvo IS1001) abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de detecção da presença dos agentes patogénicos.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todas as conclusões clínicas e laboratoriais.
- Muitas espécies de *Bordetella* transportam elementos de ADN transponível, as denominadas sequências de inserção (IS). Particularmente a IS481 encontra-se em números de cópias elevados no genoma de *Bordetella pertussis* e a IS1001 ocorre no genoma de *Bordetella parapertussis*. O elemento transponível IS481 é também encontrado em números de cópias médios no genoma de *Bordetella holmesii* e com uma incidência muito reduzida no genoma de algumas estirpes de *Bordetella bronchiseptica*. O elemento transponível IS1001 também pode estar presente em números de cópias reduzidos no genoma de *Bordetella bronchiseptica*.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

14. Apoio Técnico

Para recomendações técnicas, contacte o nosso Apoio Técnico:

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

15. Bibliografia

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and 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. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

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).

Os nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo onde não estão especificamente marcados como tal, não devem ser considerados como estando desprotegidos pela legislação.

















O RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 é um kit de diagnóstico com a marcação CE de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/EC relativa ao diagnóstico *in vitro*.

Produto não licenciado junto da Health Canada e não autorizado ou aprovado pela FDA.

Não disponível em todos os países.

© 2017 Altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

| | |
|---|--|
|  | Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i> |
|  | Código do lote |
|  | Cor cap |
|  | Número do produto |
|  | Índice |
|  | Número |
|  | Componente |
|  | Número de identificação de comércio |
|  | Consulte as instruções de utilização |
|  | Contém o suficiente para "n" testes/reações (rxns) |
|  | Limite de temperatura |
|  | Data de validade |
|  | Fabricante |
|  | Atenção |
|  | Nota |
|  | Versão |

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

www.altona-diagnostics.com

