

Instrucciones de uso

RealStar[®]

Bordetella PCR Kit 1.0

09/2022 ES

RealStar[®]

Bordetella PCR Kit 1.0

Para utilizar con

ABI Prism[®] 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism[®] 7500 SDS (Applied Biosystems)

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

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

LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)

Mx 3005P[™] QPCR System (Stratagene)

Rotor-Gene[®] 6000 (Corbett Research)

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

VERSANT[®] kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)



531013



96



09 2022



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

Índice

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

| | | |
|------------|--|-----------|
| 11. | Evaluación de rendimiento | 22 |
| 11.1 | Sensibilidad analítica | 22 |
| 11.2 | Especificidad analítica..... | 23 |
| 11.3 | Precisión | 25 |
| 12. | Limitaciones | 26 |
| 13. | Control de calidad..... | 27 |
| 14. | Asistencia técnica..... | 27 |
| 15. | Bibliografía | 28 |
| 16. | Marcas comerciales y aviso legal..... | 28 |
| 17. | Explicación de los símbolos | 29 |

1. Uso indicado

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

2. Componentes del kit

Tabla 1: Componentes del kit

| Color de la 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 kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deberían 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 °C 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 alcuotas si se van a utilizar de manera intermitente.

- El almacenamiento entre +2 °C y +8 °C no debe superar un período de 2 horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

- Instrumento PCR en tiempo real apropiado (consulte el capítulo 6.1 Instrumentos PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico apropiado (consulte el capítulo 8.1 Preparación de las muestras)
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Centrífuga con un rotor para microplacas, si se utilizan placas de reacción de 96 pocillos
- Agitador vortex
- Placas de reacción de 96 pocillos o tubos de reacción apropiados con el material de cierre (óptico) correspondiente
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtros (desechables)
- Guantes sin polvo (desechables)

NOTA



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

NOTA



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 (consulte el Tabla 2), lo que permite el diseño de sistemas de PCR de una alta sensibilidad.

Tabla 2: Secuencias de inserción IS481 y IS1001 de *Bordetella*, adaptadas a partir de Loeffelholz [6]

| Presencia/n.º de copias por genoma ¹ | | | | |
|---|---------------------|-------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Secuencia de inserción | <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 y abreviaturas: +, presente en todos los aislados; (+), presente en algunos aislados; -, ausente en todos los aislados; NA, no aplicable; ND, no determinado.

² Solo aislados de *B. bronchiseptica* de origen humano.

³ Uno de los 73 aislados de origen humano fue positivo.

⁴ 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 kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 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* DNA 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 kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro* basado en tecnología 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 [Internal Control (control interno)] para identificar una posible inhibición de PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

La tecnología PCR en tiempo real 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 Cy5. La sonda específica para el Internal Control (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 Internal Control (control interno) en los canales de detección correspondientes del instrumento PCR en tiempo real.

La prueba consta de dos procesos en un solo ensayo de valoración de tubo:

- Amplificación de PCR del ADN objetivo y Internal Control (control interno)
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se compone de:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

Internal Control = control interno

Positive Control = control positivo

Water (PCR grade) = agua indicada para PCR

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

6.1 Instrumentos PCR en tiempo real

El kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se ha desarrollado y validado para usarse con los siguientes instrumentos PCR en tiempo real:

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

7. Advertencias y precauciones

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

- Antes del primer uso, compruebe el producto y sus componentes en cuanto a:
 - Integridad
 - Si el número, el tipo y el relleno están completos (consulte el capítulo 2. Componentes del kit)
 - Etiquetado correcto
 - Si ha llegado congelado

- El uso de este producto se limita a personal especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras siempre se deben tratar como infecciosas y/o con peligro biológico de conformidad con los procedimientos de laboratorio seguros.
- Lleve guantes protectores desechables sin polvo, una bata de laboratorio y protección ocular al manipular las muestras.
- Evite la contaminación microbiana y por nucleasa (ADNasa/ARNasa) de las muestras y de los componentes del kit.
- Use siempre puntas de pipeta desechables libres de ADNasa/ARNasa con barreras para aerosol.
- Lleve siempre guantes protectores desechables sin polvo al manipular componentes del kit.
- Use zonas de trabajo separadas y segregadas para (i) la preparación de muestras, (ii) la configuración de la reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de forma unidireccional. Lleve siempre guantes desechables en cada zona y cámbielos antes de entrar en una zona diferente.
- Dedique los suministros y el equipo a zonas de trabajo separadas y no los mueva de una zona a otra.
- Almacene el material positivo y/o potencialmente positivo separado de todos los demás componentes del kit.
- No abra las placas o los tubos de reacción después de la amplificación para evitar la contaminación con amplicones.
- Se pueden hacer pruebas de controles adicionales de conformidad con las directrices o los requisitos de las normativas locales, estatales y/o federales o de las organizaciones acreditadoras.
- No esterilice en autoclave los tubos de reacción después del PCR, ya que esto no degradará el ácido nucleico amplificado y se corre el riesgo de contaminar la zona de laboratorio.
- No use componentes del kit cuya fecha de caducidad haya expirado.
- Deseche la muestra y los residuos del ensayo de acuerdo con las normativas de seguridad locales.

8. Procedimiento

8.1 Preparación de las muestras

El ADN extraído es el material de partida para el kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0.

La calidad del ADN extraído afecta de forma significativa al rendimiento de todo el sistema del test. Se recomienda comprobar 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® 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)

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 kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 debe validarla el usuario.

Si se usa un procedimiento de preparación de la muestra basado en columna de centrifugación que incluya tampones de lavado con etanol, se recomienda encarecidamente realizar un paso de centrifugación adicional durante 1 minuto a aprox. 17 000 x g (~13 000 rpm) utilizando un nuevo tubo colector, 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.

PRECAUCIÓN



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 las muestras, póngase en contacto con nuestro soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

8.2 Preparación del Master Mix

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

El kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 contiene un Internal Control (control interno, IC) 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 IC como control de inhibición de PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de las muestras, prepare el 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 (control interno) | 1 µl | 12 µl |
| Volumen del Master Mix | 21 µl | 252 µl |

- ▶ Si se utiliza el IC como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de PCR, añada el IC durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el IC **no debe** añadirse directamente al espécimen. El IC debe añadirse siempre a la mezcla de espécimen/lysis buffer (tampón de lisis). El volumen del IC 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 elution buffer (tampón de elución) o agua, deberán añadirse 6 µl del IC por muestra a la mezcla de espécimen/lysis buffer (tampón de lisis).
- ▶ Si se añadió el IC durante el procedimiento de preparación de las muestras, configure el 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 |
| Volumen del Master Mix | 20 µl | 240 µl |

PRECAUCIÓN

Si se añadió el IC [Internal Control (control interno)] durante el procedimiento de preparación de las muestras, al menos el control negativo debe incluir el IC.

PRECAUCIÓN

Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el IC directamente al espécimen.

8.3 Preparación de la reacción

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

| Configuración de reacción | |
|---------------------------|--------------|
| Master Mix | 20 µl |
| Muestra o control | 10 µl |
| Volumen total | 30 µl |

- ▶ Asegúrese de que se utilicen cada control positivo y al menos uno negativo por Master Mix y serie.
- ▶ Mezcle a fondo las mezclas y los controles con el Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una película 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 1 000 x g (~3 000 rpm).

9. Programación de los instrumentos PCR en tiempo real

Para ver información básica en relación con la configuración y la programación de los diferentes instrumentos PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 en instrumentos PCR en tiempo real específicos, póngase en contacto con nuestro soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

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 (colorantes)

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

| Objetivo | Nombre del detector | Marcador | Amortiguador de la fluorescencia |
|---|---------------------|----------|----------------------------------|
| ADN específico de <i>Bordetella pertussis</i> | Target IS481 | FAM™ | (Ninguno) |
| ADN específico de <i>Bordetella parapertussis</i> | Target IS1001 | Cy5 | (Ninguno) |
| Internal Control (Control interno) | Internal Control | JOE™ | (Ninguno) |

9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

- Defina el perfil de temperatura y la adquisición de colorantes:

| | Fase | Repeticiones de ciclo | Obtención | Temperatura [°C] | Tiempo [min:s] |
|-------------------|-----------|-----------------------|-----------|------------------|----------------|
| Desnaturalización | Retención | 1 | - | 95 | 02:00 |
| Amplificación | Ciclo | 45 | - | 95 | 00:15 |
| | | | Sí | 58 | 00:45 |
| | | | - | 72 | 00:15 |

10. Análisis de datos

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

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

10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una serie de pruebas diagnósticas **cualitativa** es **válida** si se cumplen las siguientes condiciones de control:

| ID de control | Canal de detección | | |
|--|--------------------|-----|------|
| | FAM™ | Cy5 | 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 serie de pruebas.

10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una serie de pruebas diagnósticas **cualitativa** 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 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™ | Cy5 | JOE™ | |
| + | + | +* | Se ha detectado ADN específico de <i>Bordetella pertussis</i> y ADN específico de <i>Bordetella parapertussis</i> . ^{1, 2} |
| + | - | +* | Se ha detectado ADN específico de <i>Bordetella pertussis</i> . ¹ |
| - | + | +* | Se ha detectado ADN específico de <i>Bordetella parapertussis</i> . ² |
| - | - | + | 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 Internal Control (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 Cy5. 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 Internal Control (control interno).

¹ 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.

² Una señal positiva en el canal Cy5 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 kit 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 3: 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. entrada [copias/μl] | Número de repeticiones | 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 4: 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. entrada [copias/μl] | Número de repeticiones | 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 kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se determinó mediante análisis probit:

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

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del kit 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 kit 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 kit 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
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Chlamydomphila 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 kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se determinó como variabilidad intraensayo (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad interensayo (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). Se calculó la variabilidad total combinando los 3 análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación basándose en valores de ciclo de umbral (C_t). Se analizaron al menos 6 repeticiones por muestra para variabilidad intraensayo, interensayo e interlote.

Tabla 5: 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 promedio (C_t) | Desviación estándar | Coefficiente de variación [%] |
|--|-----------------|--|------------------------|----------------------------------|
| Variabilidad intraensayo | Objetivo IS481 | 30,84 | 0,12 | 0,40 |
| | Objetivo IS1001 | 30,44 | 0,14 | 0,46 |
| Variabilidad interensayo | 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 6: Datos de precisión para la detección del Internal Control (control interno)

| Internal Control (control interno) | Ciclo de umbral promedio (C _t) | Desviación estándar | Coefficiente de variación [%] |
|------------------------------------|--|---------------------|-------------------------------|
| Variabilidad intraensayo | 27,05 | 0,15 | 0,55 |
| Variabilidad interensayo | 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 especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que este ensayo 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 este test tenga un rendimiento óptimo.
- Este ensayo no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben emplearse métodos apropiados de extracción del ácido nucleico antes de utilizar este ensayo.
- La presencia de inhibidores de la PCR (p. ej. heparina) puede provocar una 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 kit 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 EN ISO 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

14. Asistencia técnica

Si necesita ayuda al cliente, póngase en contacto con nuestro soporte 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. 10ª edición. ASM Press, 2011.

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

16. Marcas comerciales y aviso legal

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); NucliSENS®, easyMAG® (bioMérieux); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); Maxwell® (Promega); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIAasymphony® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); VERSANT® (Siemens Healthcare); Mx 3005P™ (Stratagene).

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. usados en este documento, incluso si no están marcados específicamente como tales, no se deben considerar privados de protección legal.














El kit 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 no aprobado ni autorizado por la FDA.

No disponible en todos los países.

© 2022 altona Diagnostics GmbH; todos los derechos reservados.

17. Explicación de los símbolos

| Símbolo | Explicación |
|---|--|
|  | Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i> |
|  | Código de lote |
|  | Color del tapón |
|  | Número de catálogo |
|  | Contenido |
|  | Número |
|  | Componente |
|  | Número mundial de artículo comercial |
|  | Consultar instrucciones de uso |
|  | Contiene suficiente para «n» tests/reacciones (rxns) |
|  | Límite de temperatura |
|  | Fecha de vencimiento |
|  | Fabricante |

| Símbolo | Explicación |
|---|---|
|  | <p>Precaución: Destaca instrucciones o procedimientos operativos que, si no se siguen correctamente, pueden provocar lesiones personales o afectar al rendimiento del producto. Póngase en contacto con el soporte técnico de Altona Diagnostics si necesita ayuda.</p> |
|  | <p>Nota: Se ofrece al usuario información que es útil pero no esencial para la tarea en cuestión.</p> |
|  | <p>Versión</p> |

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

