

# Instruções de Utilização

**RealStar<sup>®</sup>**

**Bordetella PCR Kit 1.0**

09/2022 PT



# RealStar<sup>®</sup>

## Bordetella PCR Kit 1.0

Para utilização com

ABI Prism<sup>®</sup> 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism<sup>®</sup> 7500 SDS (Applied Biosystems)

CFX96<sup>™</sup> Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CFX96<sup>™</sup> Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II (Roche)

Mx 3005P<sup>™</sup> QPCR System (Stratagene)

Rotor-Gene<sup>®</sup> 6000 (Corbett Research)

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

VERSANT<sup>®</sup> kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)



531013



96



09/2022



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

## Índice

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

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

## 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

**Tabela 1:** Componentes do kit

Cor da tampa	Componente	Número da tubos	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 = Controlo interno

Positive Control = Controlo 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 receção, 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 2 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 (ver capítulo 8.1 Preparação de Amostras)
- 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.***

**NOTA**

**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 patogénicos 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 2), permitindo a conceção de sistemas PCR que apresentam uma alta sensibilidade.



**Tabela 2:** Sequências de inserção IS481 e IS1001 da *Bordetella* adaptadas de Loeffelholz [6]

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

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

<sup>2</sup> Apenas isolados de *B. bronchiseptica* de origem humana.

<sup>3</sup> Um dos 73 isolados de origem humana foi positivo.

<sup>4</sup> 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 detecção 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 detecção 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 infecção por *B. pertussis* é notificável, mas não uma infecção 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 detecção de *Bordetella pertussis* e sobre a IS1001 para a detecção 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.* 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 [Internal Control (Controlo Interno)] para identificar possíveis inibições da PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

A tecnologia 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 detecção do ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas para *Bordetella pertussis* (Alvo IS481) ADN estão marcadas com o fluoróforo FAM™, ao passo que as sondas específicas para *Bordetella parapertussis* (Alvo IS1001) ADN estão marcadas com o fluoróforo Cy5. A sonda específica para o Internal Control (Controlo Interno) está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a detecção paralela do *Bordetella pertussis* (Alvo IS481) e ADN específico do *Bordetella parapertussis* (Alvo IS1001), assim como do Internal Control (Controlo Interno) nos canais de detecção 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 do Internal Control (Controlo Interno)
- Detecção simultânea de amplificações de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 consiste em:

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

Internal Control = Controlo interno

Positive Control = Controlo positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

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

## 6.1 Instrumentos de PCR em tempo real

O RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 foi desenvolvido e validado para ser usado com os seguintes instrumentos PCR em tempo 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. Avisos e Precauções

*Leia atentamente as instruções de utilização antes de usar o produto.*

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes quanto a:
  - Integridade
  - Integralidade com respeito ao número, tipo e enchimento (ver capítulo 2. Componentes do Kit)
  - Rotulagem correta
  - Congelamento à chegada
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnóstico *in vitro*.
- Amostras devem ser tratadas sempre como infecciosas e/ou riscos biológicos, seguindo os procedimentos laboratoriais seguros.
- Use luvas de proteção descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção ocular sempre que manusear amostras.
- Evite a contaminação microbiana e por nuclease (DNase/RNase) das amostras e dos componentes do kit.
- Use sempre pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase com barreiras de aerossol.
- Use sempre luvas de proteção descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Use zonas de trabalho separadas e segregadas para (i) preparação de amostras, (ii) configuração da reação e (iii) atividades de amplificação/deteção. O fluxo de trabalho no laboratório deve prosseguir de forma unidirecional. Use sempre luvas descartáveis em cada zona e troque de luvas antes de entrar numa zona diferente.
- Dedique consumíveis e equipamento a zonas de trabalho separadas e não os mude de uma zona para a outra.

- Conserve o material positivo, e/ou potencialmente positivo, separado de todos os outros componentes do kit.
- Não abra tubos/placas de reação pós amplificação, para evitar contaminação com produtos de amplificação.
- Poderão ser testados controlos adicionais de acordo com as diretrizes e ou requisitos de regulamentos locais, estaduais e/ou federais, bem como de organizações de acreditação.
- Não aplique autoclave aos tubos de reação depois da PCR, porque não irá degradar o ácido nucleico amplificado e corre-se o risco de contaminar a zona de laboratório.
- Não utilize componentes do kit que estejam fora do prazo de validade.
- Descarte a amostra e os resíduos dos ensaios cumprindo os regulamentos de segurança aplicáveis localmente.

## 8. Procedimento

### 8.1 Preparação de Amostras

O ADN extraído é o material inicial para o kit 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 PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para extração 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)

Sistemas e kits alternativos de extração de ácido nucleico também podem ser apropriados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 deve ser validada pelo utilizador.

Caso se utilize um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente a realização de um passo de centrifugação adicional durante 1 minuto a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um novo tubo de recolha, 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.*

#### ATENÇÃO



*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 Internal Control (Controlo Interno, IC) 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 PCR controlo de inibição.

- ▶ Se o IC 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 (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (Controlo Interno)	1 µl	12 µl
<b>Volume da Master Mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

- ▶ Se o IC for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de PCR, adicione o IC durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema usado para a extração de ácido nucleico, o IC **não deve ser** adicionado diretamente ao espécime. O IC deve ser sempre acrescentado à mistura de espécime/Lysis Buffer (tampão de lise). O volume do IC que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10 % do volume de eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de Elution Buffer (tampão de eluição) ou água, deve ser adicionado 6 µl de IC por amostra à mistura de espécime/Lysis Buffer (tampão de lise).



- ▶ Se o IC for acrescentado durante o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

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

**ATENÇÃO**

*Se o IC [Internal Control (Controlo Interno)] foi adicionado durante o procedimento de preparação da amostra, pelo menos o controlo negativo deve incluir o Controlo Interno.*

**ATENÇÃO**

*Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, nunca adicione IC 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
<b>Volume Total</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ 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 centrifugadora com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1 000 x g (~ 3 000 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>Bordetella pertussis</i>	Target IS481	FAM™	(Nenhum)
ADN específico do <i>Bordetella parapertussis</i>	Target IS1001	Cy5	(Nenhum)
Internal Control (Controlo Interno)	Internal Control	JOE™	(Nenhum)

## 9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

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

	Fase	Repetições do 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 (qualitativo)

Um teste de diagnóstico **qualitativo** é considerado **válido** se as seguintes condições de controlo forem cumpridas:

ID do Controlo	Canal de Detecção		
	FAM™	Cy5	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 (qualitativo)

Um ensaio de diagnóstico **qualitativo** é **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se alguma das condições para um ensaio de diagnóstico **válido** não existir.

No caso de um ensaio de diagnóstico **inválido**, repita o teste usando 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™	Cy5	JOE™	
+	+	+	Foi detetado o ADN específico do <i>Bordetella pertussis</i> e do <i>Bordetella parapertussis</i> . <sup>1,2</sup>
+	-	+	Foi detetado o ADN específico do <i>Bordetella pertussis</i> . <sup>1</sup>
-	+	+	Foi detetado o ADN específico do <i>Bordetella parapertussis</i> . <sup>2</sup>
-	-	+	Não foi detetado o ADN específico do <i>Bordetella pertussis</i> nem do <i>Bordetella parapertussis</i> . A amostra não contém quantidades detetáveis do ADN específico do <i>Bordetella pertussis</i> ou do <i>Bordetella 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 Internal Control (Controlo Interno) no canal de deteção JOE™ para resultados positivos no canal de deteção FAM™ ou no canal de deteção Cy5. Carga(s) elevada(s) do ADN do *Bordetella pertussis* (Alvo IS481) e/ou *Bordetella parapertussis* (Alvo IS1001) na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Internal Control (Controlo interno).

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> A existência de um sinal positivo no canal Cy5 também pode ser devido à presença de ADN de *Bordetella bronchiseptica* na amostra.

## 11. Avaliação do Desempenho

### 11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 define-se como a concentração (cópias/μl de eluato) de moléculas de ADN específico do *Bordetella pertussis* (Alvo IS481) ou *Bordetella 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 *Bordetella pertussis* (Alvo IS481) e *Bordetella parapertussis* (Alvo IS1001).

**Tabela 3:** Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ADN específico do *Bordetella 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 4:** Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ADN específico do *Bordetella 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 kit 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 kit 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 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 Precisão

A precisão do kit 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 3 análises.

Os dados de variabilidade são expressos através do desvio padrão e do coeficiente de variação com base no ciclo limiar - valores ( $C_t$ ). Foram analisadas pelo menos 6 réplicas por amostra quanto a variabilidade intraensaio, variabilidade interensaio e entre lotes.

**Tabela 5:** Dados de precisão para a detecção de ADN específico do *Bordetella pertussis* (Alvo IS481) e do *Bordetella parapertussis* (Alvo IS1001)

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

**Tabela 6:** Dados de precisão para a detecção do Internal Control (Controlo Interno)

Internal Control (Controlo Interno)	Ciclo limiar médio (C <sub>t</sub> )	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 obter 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 diagnóstico *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 de amostras adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente na amostra. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores de PCR (por ex., heparina) poderá causar resultados inválidos ou falsos negativos.

- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma do *Bordetella pertussis* (Alvo IS481) e *Bordetella parapertussis* (Alvo IS1001) abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção 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 apoio ao cliente, contacte o nosso Apoio Técnico através do:

**E-mail:** [support@altona-diagnostics.com](mailto: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. 10ª Edição. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Terceira Edição. Mosby, 2010.

## 16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

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

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




Produto não autorizado ou aprovado pela FDA.

Não disponível em todos os países.

© 2022 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

## 17. Explicação de Símbolos

Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código do lote
	Cor da tampa
	Número de catálogo
	Conteúdo
	Número
	Componente
	Número de item de comércio internacional
	Consulte as instruções de utilização
	Contém o suficiente para "n" testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante

Símbolo	Explicação
	<p>Atenção: Destaca os procedimentos ou as instruções de funcionamento que, se não forem seguidos corretamente, podem resultar em lesões pessoais ou afetar o desempenho do produto. Contacte o Apoio Técnico da Altona Diagnostics para obter assistência.</p>
	<p>Nota: Consiste em informações úteis para o utilizador mas que não são essenciais para a tarefa em questão.</p>
	<p>Versão</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](mailto:info@altona-diagnostics.com)

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

