

Real Respiratory Bacterial Panel 2 (*B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*)

Test para la detección de *Bordetella pertussis*,
Bordetella parapertussis y *Bordetella holmesii*

USO EXCLUSIVO PROFESIONAL
LEER LAS INSTRUCCIONES CON ATENCIÓN
ANTES DE PROCEDER A UTILIZAR EL TEST

INTRODUCCIÓN

INTENCIÓN DE USO

El test Real Respiratory Bacterial Panel 2 (*B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*) es un test diseñado para la detección y diferenciación cualitativa de *Bordetella pertussis* (BP), *Bordetella parapertussis* (BPP) y *Bordetella holmesii* (BH), mediante la amplificación de diferentes regiones genómicas específicas de cada patógeno por la técnica de PCR a tiempo real. El test permite detectar de una manera sencilla, económica y fiable todas las infecciones causadas por *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* en muestras procedentes de tracto respiratorio (frotis nasofaríngeos, lavados nasofaríngeos, aspirados nasofaríngeos, etc).

Es un producto destinado a usuarios especializados que se utilizará como ayuda para el diagnóstico de enfermedades infecciosas del tracto respiratorio o cualquier indicación que implique la identificación de las bacterias mencionadas.

Para el diagnóstico final deberán tenerse también en cuenta otros parámetros como los síntomas mostrados y el historial clínico del paciente.

INFORMACIÓN GENERAL

El género de las Bordetellas se compone de 8 especies, de las cuales solo son patógenas en humanos *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*. Existe una cuarta *B. bronquiseptica* que normalmente está restringida a animales, aunque en algunas ocasiones se han descrito casos en pacientes inmunocomprometidos.

Tanto *B. pertussis* como *B. parapertussis* son patógenos muy eficientes que establecen la infección por vía respiratoria y permanecen localizados en el tracto respiratorio superior.

La enfermedad provocada por *B. pertussis* y *B. parapertussis* se conoce como tos ferina. Es una enfermedad respiratoria que se produce por transmisión de la bacteria persona a persona a través de gotitas de saliva en aerosol. La enfermedad clásica tiene tres etapas, una primera conocida como fase catarral, con síntomas no específicos como rinorrea, estornudos y tos; una segunda conocida como fase paroxística, con los típicos síntomas del pertussis (ataques de tos severos, silbido inspiratorio y vómitos) y una tercera conocida como fase convalescente, en la que los ataques de tos van disminuyendo.

Si bien la incidencia de la tos ferina es más alta en niños por debajo de los cinco años, no es solo una enfermedad de la infancia y puede tener efectos severos durante la adolescencia y la edad adulta. Existen vacunas que han sido muy efectivas desde su implantación, evitando unas 760.000 muertes anualmente. A pesar de ello, la tos ferina sigue siendo un importante riesgo hoy en día, puesto que todavía se dan 50 millones de casos al año, con 300.000 muertes (la mayoría entre bebés y neonatos). Por todo ello, se requiere un diagnóstico fiable para comenzar el tratamiento y la profilaxis de contacto apropiados.

El diagnóstico de Bordetellas basado en cultivos o en técnicas serológicas, presenta requerimientos especiales, son en ocasiones muy costosas en el tiempo o no presentan buenos datos de sensibilidad. Por este motivo las técnicas moleculares pueden ser una alternativa interesante para la detección de estos patógenos. La mayoría de los test de PCR se basan en la detección de secuencias de inserción (IS) presentes en múltiples copias por genoma, aumentando de este modo la sensibilidad de los test basados en la amplificación de ADN.

POBLACIÓN A LA QUE ESTÁ DESTINADA LA PRUEBA

El producto está destinado para el uso con muestras de pacientes con síntomas de infección respiratoria bacteriana, ya sea de tracto respiratorio superior o inferior.

INCIDENCIA EN LA POBLACIÓN DE LA ENFERMEDAD

La tos ferina ha resurgido en los últimos años con un aumento progresivo de la incidencia, hospitalización y mortalidad.

Según la ECDC, la evolución de la incidencia de *B. pertussis* en España representa un 50%

aproximadamente de los casos de enfermedades respiratorias causadas por bacterias. (Datos Año 2017: 4069 casos de un total de 8183).

FUNDAMENTO

El procedimiento del kit Respiratory Bacterial Panel 2 consta de dos pasos:

a) Extracción de ADN

Reactivos no incluidos en el kit.

Ver apartado "Muestras".

b) Amplificación mediante PCR y detección mediante sondas marcadas con fluoróforos

El kit Real Respiratory Bacterial Panel 2 incluye los reactivos necesarios para realizar la amplificación de secuencias genéticas específicas de las bacterias que se detectan con el kit y su posterior detección mediante el uso de sondas específicas que se encuentran marcadas con una molécula fluorescente y otra apantalladora (quencher).

Las secuencias detectadas en cada caso se muestran en la siguiente tabla:

Bacteria	Locus
<i>Bordetella pertussis</i>	IS481
<i>Bordetella parapertussis</i>	IS1001
<i>Bordetella holmesii</i>	hIS1001+IS481

Durante la PCR se produce también la amplificación de una región de un gen control humano (β -globina o BGB).

El kit Respiratory Bacterial Panel 2 aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa. Durante la amplificación, la enzima hidroliza la sonda que se encuentra unida a su secuencia de ADN complementaria, de este modo el fluoróforo y el quencher de la sonda se separan, dando lugar a un aumento en la señal de fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN diana.

El aumento de fluorescencia se va monitorizando a lo largo de los diferentes ciclos de amplificación en los equipos de PCR a tiempo real.

Una vez finalizado el proceso de amplificación se detecta la presencia de la secuencia IS1001 (BPP) en el canal FAM, de la secuencia hIS1001 (BH) en el canal ROX, de la secuencia IS481 (BP y BH) en el canal Cy5 y finalmente, del gen control (BGB) en el canal HEX.

MATERIALES CONTENIDOS EN EL KIT

Real Respiratory Bacterial Panel 2		Kit 48 tests
Mezcla PCR	REAG BOR MIX A	0,580 ml
Mezcla Oligos	REAG BOR MIX B	0,300 ml
Control Positivo	REAG BOR CONTROL+	0,060 ml
Instrucciones	DO-09051039	1
1) La información sobre la composición de los reactivos se indica en la ficha de seguridad del producto. Puede solicitar una copia de la misma a través de la dirección de correo electrónico msds@operon.es 2) Atención, el contenido del kit garantiza un máximo de 4 usos totales, con un mínimo de 12 muestras por análisis. 3) Estas instrucciones de uso aplican a cualquier referencia comercial del producto: 5.182.XXX.88.000		

MATERIALES NO INCLUIDOS EN EL KIT

Para el desarrollo del kit se requieren además, los siguientes materiales:

1. Microtubos para PCR compatibles con los equipos de PCR a tiempo real.
2. Micropipetas y puntas para micropipetas (estériles o irradiadas con UV e idealmente, con filtro).
3. Centrífuga.
4. Guantes desechables sin polvo.

EQUIPOS NECESARIOS PARA EL DESARROLLO DEL KIT

Se han probado con éxito los siguientes termocicladores: CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad); QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems); Gentier 96 Real-Time PCR (Tianlong) y Gentier 48 E Real-Time PCR (Tianlong).

PRECAUCIONES

1. Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
2. Seguir rigurosamente las instrucciones indicadas. La modificación de cualquiera de los **pasos o temperaturas** puede afectar gravemente a los resultados del test.
3. El producto se fundamenta en técnicas de biología molecular y por lo tanto, deben observarse todas las precauciones necesarias para evitar la contaminación de los reactivos y/o la degradación de las muestras de ácidos nucleicos. Por ello deben utilizarse guantes durante todo el proceso, cambiándolos tan frecuentemente como sea necesario y mantener una limpieza escrupulosa de la zona de trabajo. Es esencial que todos los materiales que se vayan a usar estén libres de DNAsas. Se recomienda usar puntas de pipeta con filtro en la preparación de PCRs, para evitar problemas de contaminación por formación de aerosoles.
4. Se recomienda un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción de

ácidos nucleicos, seguido del área pre-PCR (preparación de mezclas de reacción para PCR y adición del ácido nucleico) y finalmente del área post-PCR (amplificación y detección). Para mantener el flujo unidireccional de trabajo cada una de las áreas debe contar de forma exclusiva, con todos los recursos necesarios para la realización de la técnica (agua libre de nucleasas, centrífugas, vórtex, micropipetas, puntas para micropipetas, viales, etc.).

5. Los procedimientos de biología molecular requieren de personal instruido para evitar el riesgo de resultados incorrectos debido a la degradación del ácido nucleico o de posibles contaminaciones en el proceso de amplificación.

6. Se recomienda una limpieza periódica de los equipos utilizados, principalmente micropipetas y superficies de trabajo, con objeto de minimizar el riesgo de contaminación de reactivos.

7. Almacenar los componentes del kit en las condiciones indicadas.

8. No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.

9. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.

10. En caso de rotura de la caja externa, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.

11. En caso de rotura o alteración del envasado primario desechar el test.

12. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.

13. Las muestras de pacientes deben considerarse siempre como potencialmente infecciosas. Observe todas las normas medioambientales y de seguridad.

14. Preste especial atención a la revisión de este documento que aplica en función del lote de producto. Esta revisión está indicada en la etiqueta interior del kit. El uso de una revisión diferente se considera un mal uso del test.

15. No tirar la caja externa del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. La caja contiene información esencial respecto al marcado CE del producto y lotificación.

16. Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que estén establecidos el usuario y/o el paciente.

ALMACENAMIENTO

Los componentes del kit Real Respiratory Bacterial Panel 2 deben almacenarse -20 °C y protegidos de la luz. El transporte del kit puede realizarse en condiciones de refrigeración (2-8 °C).

Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos, ya que podría repercutir en el rendimiento del producto. Se ha confirmado la estabilidad de los reactivos tras un total de 4 ciclos de congelación/descongelación.

La fecha de caducidad de todos los reactivos está impresa en la etiqueta.

La caducidad y condiciones de almacenamiento de los reactivos una vez abiertos es la misma que la de los reactivos originales.

El kit mantiene sus especificaciones siempre que se almacene y manipule en las condiciones indicadas.

MUESTRAS

El test ha sido diseñado y validado para su uso con ADN obtenido a partir de muestras respiratorias de diferente naturaleza. En concreto, el kit se ha validado con ADN extraído de: aspirado/lavado nasofaríngeo, frotis nasofaríngeo, exudados.

En el caso de frotis, utilizar una torunda de algodón o cepillo secos y estériles para la toma de muestra. Asegúrese de tomar una cantidad suficiente de muestra, pero sin que se produzca el sangrado. Guardar la torunda en un tubo con un medio de transporte adecuado (por ejemplo, UTM, medio Amies-Stuart, etc).

La calidad y concentración del ADN extraído es de vital importancia para el correcto funcionamiento del kit. La presencia de inhibidores en la muestra o la baja concentración de ADN podría reducir la sensibilidad del test.

Algunos de los procedimientos de extracción de ADN que han sido evaluados con resultados satisfactorios con el kit Real Respiratory Bacterial Panel 2 son: QIAamp UCP pathogen Mini M48 kit (Qiagen), MagAttract DNA Mini kit (Qiagen), sistema extracción MagNA Pure System (Roche) NucliSENS easyMAG system (bioMerieux).

Almacenar las muestras de ADN a 2-8 °C, si se van a analizar en un tiempo breve, o a -20 °C para almacenamientos más prolongados (hasta un año).

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Los especímenes respiratorios pueden contener sustancias interferentes que se sabe inhiben las reacciones de PCR. La mayoría de estas sustancias interferentes serán eliminadas durante la extracción del ADN. En el caso de que en el ADN final quedase algún inhibidor, este sería detectado por la ausencia de amplificación del gen control (BGB) durante la PCR.

PROCEDIMIENTO

1.- Reacción en cadena de la polimerasa PCR

*Descongelar los reactivos de PCR. Mezclar con

vórtex y centrífugar brevemente, para garantizar que todo el contenido esté en el fondo de los tubos.

* Preparar el número de viales necesarios para las muestras que se vayan a analizar. Utilizar viales adecuados para el sistema óptico del equipo de Real Time que se vaya a utilizar. Además de los viales para las muestras, se requerirá un vial para el blanco y otro para el control positivo.

* En cada tubo de PCR añadir: 10 μ l de MIX A + 5 μ l de MIX B.

Si se van a amplificar varios ADNs se recomienda preparar una mezcla común con todos los reactivos, de modo que finalmente se añadan 15 μ l de mezcla por vial. Las mezclas con todos los reactivos para la PCR deben prepararse siempre en exceso, para contrarrestar las pérdidas de volumen durante el proceso de pipeteo. Por ejemplo, se puede añadir como extra el volumen requerido para una PCR por cada 12 reacciones.

Atención, para evitar contaminaciones indeseadas, se recomienda realizar esta preparación en una cabina de PCR o zona limpia dedicada exclusivamente a la preparación de reacciones de PCR.

* Añadir 5 μ l de ADN en cada tubo (una muestra por vial). En el caso del blanco, añadir 5 μ l de agua; en el caso del positivo, añadir 5 μ l del control positivo.

Atención, para evitar contaminaciones indeseadas, se recomienda añadir el ADN en una cabina dedicada exclusivamente a la manipulación de ácidos nucleicos. Se recomienda seguir el siguiente orden de adición: blanco (1°), muestras y control positivo (siempre en último lugar).

* En cada ensayo debe incluirse **siempre** un blanco (agua) y el control positivo incluido en el kit.

* Cerrar los viales con una tapa adecuada para el sistema óptico del equipo de PCR a tiempo real.

* Mezclar suavemente y centrífugar para eliminar posibles burbujas que pudieran afectar a la lectura de fluorescencia.

* Si es posible, mantener los reactivos y las mezclas a 2-8 °C durante la preparación.

* Introducir los viales en el termociclador de Real Time y proceder a la amplificación utilizando los siguientes parámetros:

➤ Volumen de reacción= 20 μ l.

➤ En aquellos termocicladores que trabajan con referencia pasiva (como Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System, Applied Biosystems StepOne Real Time PCR Systems, Startegene Mx3005P Real Time PCR System), comprobar que la opción de control pasivo ROX está desactivada.

* Programa de amplificación:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	5 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (lectura fluorescencia)	30 seg	60°C

Los datos de fluorescencia se deben de recoger en la etapa de hibridación/elongación a través de los siguientes canales:

FAM	HEX*	ROX**	Cy5
IS1001 (BPP)	Gen control (BGB)	hIS1001 (BH)	IS481 (BP/BH)

* o VIC o JOE, en su defecto ** o TEXAS, en su defecto

NOTA: para obtener información básica sobre la preparación y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario de cada instrumento. En función del equipo de Real Time empleado, seleccione el canal de detección adecuado.

2.- Interpretación de los resultados

Una vez terminada la reacción, guarde y analice los datos con el software propio del termociclador Real Time empleado y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los resultados de cada diana deben analizarse de forma independiente, ajustando en cada caso de forma manual el valor de umbral (threshold). Dicho umbral debe ajustarse para que se encuentre en la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (background).

Para que el resultado **sea válido** los controles utilizados deben cumplir las siguientes condiciones:

VALOR Cq	FAM	HEX	ROX	Cy5
Blanco (NTC)	Sin señal	Sin señal	Sin señal	Sin señal
Control + (PTC)	< 40	< 40	< 40	< 40

Tras confirmar que los resultados obtenidos para los controles de la reacción son válidos, analizaremos los resultados para las diferentes muestras.

RESULTADOS

El kit Real Respiratory Bacterial Panel 2 permite la detección e identificación de las siguientes bacterias asociadas a infecciones del tracto respiratorio: *B. pertussis* (BP), *B. parapertussis* (BPP) y *B. holmesii* (BH).

* El resultado obtenido se interpreta como **POSITIVO** si la reacción genera una curva de crecimiento de fluorescencia que cruza el umbral con un valor Cq inferior a 40 ciclos en alguno de los siguientes canales: FAM (IS1001; BPP) / ROX (hIS1001; BH) / Cy5 (IS481; BP/BH). El control interno de amplificación (canal HEX; BGB) podrá mostrar o no una curva de crecimiento de fluorescencia, ya que la presencia de una elevada cantidad de ADN bacteriano podría causar una amplificación preferencial del mismo.

* El resultado obtenido se interpreta como **NEGATIVO** si la reacción genera una curva de crecimiento de fluorescencia que cruza el umbral con un valor Cq igual o mayor de 40 ciclos, o si la reacción no genera una curva de crecimiento de fluorescencia.

En este caso, el control interno (canal HEX; BGB) debe mostrar una curva de crecimiento de fluorescencia que cruza el umbral con un valor Cq inferior a 40 ciclos.

* El resultado se interpreta como **INVÁLIDO** si no se genera una curva de crecimiento de fluorescencia en ninguno de los canales de medida, o si no se cumplen los criterios de positividad o negatividad anteriormente indicados.

En el caso de las muestras no válidas, se recomienda repetir el ensayo. Si la muestra vuelve a dar resultado no válido, se recomienda repetir diluyendo la muestra de ADN para descartar posibles problemas de inhibición. Si vuelve a dar no válido, se recomienda repetir el proceso de extracción de ADN eluyendo en un menor volumen, para descartar un problema de baja concentración de ácido nucleico.

Es importante comprobar los perfiles de amplificación de cada muestra para confirmar que el resultado obtenido es correcto y no puede atribuirse a ruido de fondo o artefactos generados durante la reacción.

En la siguiente tabla mostramos las diferentes posibilidades de resultados que podemos encontrarnos en una muestra con el kit Real Respiratory Bacterial Panel 2:

BPP (FAM)	BH (ROX)	BP / BH (Cy5)	BGB (HEX)	Interpretación del resultado
-	-	-	+	NEGATIVO: BPP, BH y BP
+	+	+	+ o -	POSITIVO: BPP, BH y BP
+	-	-	+ o -	POSITIVO: BPP NEGATIVO: BH y BP
-	-	+	+ o -	POSITIVO: BP NEGATIVO: BPP y BH
-	+	+	+ o -	POSITIVO: BH y BH+BP* NEGATIVO: BPP
+	-	+	+ o -	POSITIVO: BPP y BP NEGATIVO: BH
-	-	-	-	MUESTRA NO VÁLIDA

* No se puede descartar una co-infección de BH y BP, confirmar con otros signos clínicos.

CONTROL DE CALIDAD

Es necesario confirmar el correcto funcionamiento del kit amplificando siempre en cada ensayo un blanco (agua) y el control positivo incluido en el kit.

Un blanco que da un resultado positivo en el análisis indica un problema de contaminación. En este caso, deberá repetirse el proceso, garantizando que el área de trabajo y el equipo estén adecuadamente descontaminados y que se tomen precauciones extremas durante la realización de la PCR.

Un control positivo que arroja un resultado negativo indica un fallo de la reacción de PCR, ya sea por preparación inadecuada de la reacción, por fallo de los reactivos o por fallo del control positivo. Antes de repetir el proceso de amplificación, asegúrese de que todos los reactivos se hayan almacenado de forma correcta y de que no hayan caducado.

En el caso de muestras negativas, es necesaria la presencia de amplificado en el canal del gen control (BGB) para confirmar que se trata de un verdadero negativo. La ausencia de amplificación en una muestra negativa puede estar causado por falta de ADN (medir concentración), por su degradación o por la presencia de inhibidores de la PCR en el mismo (hemoglobina, restos de sales, etc).

LIMITACIONES DEL TEST

* Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del kit deben interpretarse por un profesional de la salud, teniendo en consideración el historial médico, los síntomas clínicos y cualquier otra prueba diagnóstica que se disponga del paciente.

* Este ensayo se podría utilizar con otro tipo de muestras aunque solo ha sido validado con muestras procedentes de aspirado/lavado nasofaríngeo y frotis nasofaríngeo.

* Los resultados obtenidos con este producto dependen de la correcta recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento de las muestras; para evitar resultados erróneos es necesario prestar una particular atención a estas fases y seguir atentamente las instrucciones provistas con los

productos para la extracción de los ácidos nucleicos.

* Existe la posibilidad de falsos negativos o de resultados variables cuando se trabaje con muestras con un bajo número de copias del molde diana, inferiores al límite de detección del test (ver epígrafe de sensibilidad).

* Debido a la alta sensibilidad analítica de la técnica, existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con muestras positivas de altas concentraciones, de los controles positivos o de los mismos productos de la reacción de amplificación. Estos fenómenos pueden evitarse solo con unas buenas prácticas de las técnicas de laboratorio y siguiendo atentamente las instrucciones del producto.

PRESTACIONES / EVALUACIONES INTERNAS Y EXTERNAS

Se ha evaluado la sensibilidad y la especificidad diagnósticas del test con muestras de ADN procedentes de diferente origen.

A continuación se muestran los resultados obtenidos por técnica y analito.

CT = Concordancia entre técnicas

CS = Concordancia de sensibilidad

CE = Concordancia de especificidad

Evaluación nº 1:

Evaluación realizada en las instalaciones de OPERON, S.A.

Se analizaron un total de 258 muestras, utilizando como técnicas de referencia el kit Allplex Respiratory Panel 4 (Seegene), el kit Smart Bp/Bpp (Cepheid), el kit Illumigene Pertussis (Meridian Bioscience) y el kit Respiratory Bacterial Panel Strip (Operon, S.A.).

B. pertussis (N = 106)		Allplex Respiratory Panel 4	
		Positivas (37)	Negativas (69)
Real Respiratory Bacterial Panel 2	Positivas (37)	35	2
	Negativas (69)	2	67
CT = 96,23 %		CS = 94,6 %	CE = 97,1 %

B. pertussis (N = 129)		Smart Bp/Bpp	
		Positivas (85)	Negativas (44)
Real Respiratory Bacterial Panel 2	Positivas (83)	82	1
	Negativas (49)	6	43
CT = 94,6 %		CS = 93 %	CE = 97,8 %

B. pertussis (N = 21)		Illumigene Pertussis	
		Positivas (1)	Negativas (20)
Real Respiratory Bacterial Panel 2	Positivas (1)	1	0
	Negativas (20)	0	20
CT = 100 %		CS = 100 %	CE = 100 %

B. pertussis (N = 258)		Respiratory Bacterial Strip	
		Positivas (123)	Negativas (135)
Real Respiratory Bacterial Panel 2	Positivas (121)	121	0
	Negativas (137)	2	135
CT = 99,22 %		CS = 98,4 %	CE = 100 %

B. parapertussis (N = 106)		Allplex Respiratory Panel 4	
		Positivas (13)	Negativas (93)
Real Respiratory Bacterial Panel 2	Positivas (13)	13	0
	Negativas (93)	0	93
CT = 100 %		CS = 100 %	CE = 100 %

B. parapertussis (N = 129)		Smart Bp/Bpp	
		Positivas (45)	Negativas (84)
Real Respiratory Bacterial Panel 2	Positivas (46)	44	2
	Negativas (83)	1	82
CT = 97,7 %		CS = 97,8 %	CE = 97,6 %

B. parapertussis (N = 258)		Respiratory Bacterial Strip	
		Positivas(59)	Negativas(199)
Real Respiratory Bacterial Panel 2	Positivas (59)	59	0
	Negativas(199)	0	199
CT = 100 %		CS = 100 %	CE = 100 %

B. holmesii (N = 258)		Respiratory Bacterial Panel Strip	
		Positivas(4)	Negativas(254)
Real Respiratory Bacterial Panel 2	Positivas (4)	4	0
	Negativas(254)	0	254
CT = 100 %		CS = 100 %	CE = 100 %

Evaluación nº 2:

Evaluación realizada en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de San Sebastián.

Se analizaron un total de 110 muestras, utilizando como técnicas de referencia el kit *B. pertussis* + *B. parapertussis* RealCycler de Progenie, y una PCR propia para *B. holmesii*.

B. pertussis (N = 110)		RealCycler	
		Positivas (40)	Negativas (70)
Real Respiratory Bacterial Panel 2	Positivas (39)	39	0
	Negativas (71)	1	70
CT = 99,1 %		CS = 97,5 %	CE = 100 %

B. parapertussis (N = 110)		RealCycler	
		Positivas (36)	Negativas (74)
Real Respiratory Bacterial Panel 2	Positivas (36)	36	0
	Negativas (74)	0	74
CT = 100 %		CS = 100 %	CE = 100 %

B. holmesii (N = 110)		RealCycler + PCR propia	
		Positivas(7)	Negativas(103)
Real Respiratory Bacterial Panel 2	Positivas (7)	7	0
	Negativas (103)	0	103
CT = 100 %		CS = 100 %	CE = 100 %

SENSIBILIDAD

Se evaluó con varios lotes la cantidad mínima de ADN puro que puede genotiparse/evaluarse adecuadamente con el Real Respiratory Bacterial Panel 2, obteniendo los siguientes resultados:

ng/PCR	BP	BPP	BH
Límite de detección*	0,000001	0,000001	0,0000001
Límite del test**	0,00001	0,00001	0,000001

* Límite de detección = cantidad mínima de ADN/ARN que puede detectarse con el test.

** Límite del test = cantidad mínima de ADN/ARN con la que **siempre** podemos hacer el genotipado o que siempre detectamos con el test.

ESPECIFICIDAD

Se ha comprobado la ausencia de reacción entrecruzada con los siguientes microorganismos: *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus A*, *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus B*, *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus galactiae*, *Moraxella catharralis*, *Neisseria subflava*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella lacunata*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus D*, *Streptococcus C*, *Streptococcus G*, *Legionella dumoffii*, *Legionella micdadei*, *Legionella maceachernii*, *Legionella longbeachae*, *Legionella israelensis*, *Legionella bozemanii*, *Legionella cherrii*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus mecA (-)*, *S. aureus mecA (+)*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumoniae*, *Streptococcus salivarius*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella bronchiseptica*, *S. pneumoniae-serotipo 19A*, *S. pneumoniae-serotipo 1*, *S. pneumoniae-serotipo 5*, *S. pneumoniae-serotipo 3*.

EFFECTO HOOK

Se han evaluado cantidades crecientes de ADN de cada uno de los microorganismos detectados con el kit sin que se haya observado inhibición de la señal o aparición de reacciones entrecruzadas que pudieran asociarse con la existencia de Efecto Hook.

No existe por lo tanto Efecto Hook.

PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se ha estudiado la precisión intraensayo de Real Respiratory Bacterial Panel 2 mediante el análisis de 5 réplicas de 4 muestras reales y una curva de sensibilidad de un ADN control y con tres lotes diferentes de producto.

El análisis lo realizó una misma persona y los resultados de las réplicas fueron iguales en todos los casos, demostrando la alta precisión intraensayo del producto.

El kit ha demostrado tener una muy buena precisión intraensayo, obteniéndose siempre el mismo genotipado en las muestras.

PRECISIÓN INTERDÍA

Se analizaron 4 muestras reales y una curva de sensibilidad de un ADN control, cada una de ellas por duplicado, con un lote del producto Real Respiratory Bacterial Panel 2 a lo largo de 5 días consecutivos. El análisis lo realizó una misma persona y los resultados obtenidos para cada ADN fueron los mismos en todos los casos, demostrando la alta precisión interdía del producto.

El kit ha demostrado una buena reproducibilidad variando el día, obteniéndose siempre el mismo genotipado en las muestras.

PRECISIÓN INTERLABORATORIO

Se ha estudiado la precisión interlaboratorio mediante el análisis de 4 muestras reales y una curva de sensibilidad de un ADN control, por duplicado. Cada análisis fue realizado por tres personas diferentes, en el mismo día y utilizando el mismo lote de producto. Para variar al máximo las condiciones de uso del kit, cada operador utilizó un termociclador diferente.

El kit mostró una buena reproducibilidad variando el operador y condiciones.

PRECISIÓN INTERLOTE

Se analizaron 23 muestras de ADN y una curva de sensibilidad de un ADN control, con tres lotes de producto Real Respiratory Bacterial Panel 2. El análisis lo realizó una misma persona en el mismo día y los resultados obtenidos con todos los lotes fueron iguales, demostrando la alta precisión interlote del producto.

BIBLIOGRAFÍA

* Tatti K et al. "Novel multitarget Real-Time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens". *J Clin Microbiol*. 2011 Dec; Vol 49, N° 12: 4059-4066. doi: 10.1128/JCM.00601-11.

* Loeffenholz M. "Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests". *J Clin Microbiol*. 2012 Jul; Vol 50, N° 7: 2186-2190. doi: 10.1128/JCM.00612-12.

* Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *Bordetella parapertussis*. ECDC 2012.

* Arbefeville et al. "Optimizing polymerase chain reaction testing for the diagnosis of pertussis: current perspectives" *Pathology and Laboratory Medicine International* 2015;7 67-73

* Lofti et al. "Molecular detection of *Bordetella holmesii* in two infants with pertussis-like syndrome: the first report from Iran" *Iran J Microbiol*. 2017 Aug; 9(4): 219-223.

* Kolodkina et al. "Multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*". *Iran J Microbiol*. 2014 Jun;6(3):140-8.

* Rodgers et al. "Epidemiologic and Laboratory Features of a Large Outbreak of Pertussis-Like Illnesses Associated With Circulating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis*—Ohio, 2010-2011". *Clinical Infectious Diseases* 2013;56(3):322-31



DO-09051039 Rev. 2 (14-04-2021)

OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) - SPAIN + 34 976 503597