



## RIDA<sup>®</sup> GENE Bordetella

**REF** PG2505



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Alemania  
Tel: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA® GENE Bordetella es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii* de exudados y lavados nasofaríngeos humanos. El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Bordetella está indicado para utilizarse como una ayuda para el diagnóstico de la tos ferina causada por *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii*, respectivamente.

## 2. Resumen y descripción del ensayo

*Bordetella pertussis* es una bacteria gram-negativa que causa una infección respiratoria aguda conocida como tos ferina. *Bordetella holmesii*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica* causan una enfermedad similar a la tos ferina que es menos común y, en general, más leve. La tosferina puede ser una enfermedad grave en todos los grupos de edad y potencialmente mortal en los lactantes. La OMS (Organización Mundial de la Salud) calculó unos 16 millones de casos de tos ferina en todo el mundo en 2008, que provocaron la muerte a unos 195 000 niños.<sup>1</sup> En 2012, se comunicaron 41 800 casos de tos ferina en EE. UU.<sup>2</sup> Se calcula que un 3-35 % de las infecciones de *Bordetella* se deben a *B. parapertussis*.<sup>3,4</sup> En un estudio de 3 años de duración en EE. UU., se identificó *B. parapertussis* en el 14 % de las muestras como la causa de la enfermedad de tos ferina.<sup>5</sup> En un estudio en Francia, se detectó *B. holmesii* en cerca del 20 % de las infecciones por *Bordetella* en adolescentes y adultos.<sup>6</sup>

La infección por *Bordetella* se transmite por vía respiratoria, en gotas transportadas por el aire. Después de un período de incubación de 7-10 días, la evolución clínica de la enfermedad pasa por tres fases: fase catarral (1-2 semanas) con síntomas similares a los de la gripe común, etapa paroxística (1-2 semanas), que se caracteriza por paroxismos de tos rápida y numerosa, seguida de vómitos, y la fase de convalecencia (6-10 semanas), que se caracteriza por la desaparición de la tos paroxística.<sup>7,8</sup>

En poblaciones con una alta cobertura de vacunación de lactantes y niños, la tos ferina se sigue transmitiendo, ya que la protección de la vacuna dura 5-10 años y la protección después de la infección natural desaparece después de 10 a 15 años. Así, en poblaciones con una alta tasa de vacunación, la enfermedad se transmite de adolescentes o adultos a los lactantes, o entre personas que no cuentan con la protección de la vacunación.<sup>8,9</sup> Un estudio reciente sugiere la falta de protección cruzada contra *B. holmesii* después de la vacuna de la tos ferina.<sup>10</sup>

Existen varios métodos de laboratorio, como cultivo, serología y PCR, disponibles para el diagnóstico de la tos ferina. El cultivo es casi 100 % específico y puede ser de hasta el 50 % en las primeras 2 semanas después del inicio de la tos (esta cifra disminuye con el tiempo). El cultivo requiere un medio especial y tarda al menos una

semana. El diagnóstico de tos ferina por serología no es adecuado en las etapas tempranas de la enfermedad.

Los anticuerpos se detectan, como pronto, dos semanas después de la infección o la vacunación. Se puede usar un ensayo de ELISA con toxina pertussis (TP) o hemaglutinina filamentosa (HAF) como antígeno del ensayo. La HAF está hecha de todas las especies de *Bordetella*, mientras que la TP solo corresponde a *B. pertussis*. Todas las vacunas contienen TP y muchas vacunas acelulares contra la tos ferina tienen HAF como componente. Con un ensayo serológico no es posible distinguir entre la respuesta inmunitaria debida a la infección o a la vacunación. La PCR en tiempo real permite la detección rápida, específica y sensible en las primeras 4 semanas a partir de la aparición de la tos.

Además, la PCR en tiempo real permite diferenciar entre las especies patógenas de *Bordetella*.<sup>8,9</sup>

### 3. Principio del ensayo

RIDA<sup>®</sup>GENE Bordetella es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii* (IS481, IS1001) de exudados y lavados nasofaríngeos.

Después de aislar el ADN, se amplifican los fragmentos génicos específicos de *Bordetella pertussis* (IS481), *Bordetella parapertussis* (pIS1001) y *Bordetella holmesii* (IS481, hIS1001) (si están presentes). Las dianas amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA<sup>®</sup>GENE Bordetella contiene un **Internal Control DNA** (ICD) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra o para determinar la posible inhibición de la PCR.

#### 4. Reactivos suministrados

**Tabla 1:** Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rojo
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

#### 5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos contra la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a entre 2 °C y 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente separar en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de manera adecuada (entre 2 °C y 8 °C).

## 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de PCR en tiempo real RIDA<sup>®</sup> GENE Bordetella es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

**Tabla 2:** Equipamiento necesario

Plataforma de extracción	
R-Biopharm	RIDA <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC
bioMérieux	NucliSENS easy <sup>®</sup> MAG <sup>™</sup>
Equipo de PCR en tiempo real:	
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 480II, LightCycler <sup>®</sup> 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 <sup>™</sup>
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Nota:** Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- Hisopos de nylon flocado estériles, sin medio de cultivo (p. ej., Copan Diagnostic Inc., ref. 552C)
- RIDA<sup>®</sup> GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler<sup>®</sup> 480II y el LightCycler<sup>®</sup> 480 z
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (sin nucleasas)

## 7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes

apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Obtención y almacenamiento de muestras

### 8.1 Preparación de las muestras a partir de hisopos nasofaríngeos

Para el aislamiento del ADN a partir de hisopos secos, use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell<sup>®</sup> RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar el ADN a partir de hisopos nasofaríngeos, se recomienda el procedimiento siguiente: Agregue 400 µl de agua para PCR a un tubo de preparación. Inserte el hisopo en el agua, y corte o rompa la varilla. Tape bien el tubo de preparación, mezcle brevemente en un agitador vórtex y siga las instrucciones del fabricante del kit de extracción de ADN o del sistema de extracción de ADN.

El ensayo RIDA<sup>®</sup> GENE Bordetella contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y

**no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

## 8.2 Preparación de las muestras a partir de lavados nasofaríngeos

Para aislar el ADN de lavados nasofaríngeos, agregue el volumen adecuado siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de extracción de ADN o del sistema de extracción de ADN.

Para el aislamiento del ADN a partir de hisopos secos, use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell<sup>®</sup> RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA<sup>®</sup>GENE Bordetella contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

## 9. Ejecución de la prueba

### 9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control DNA** antes de utilizarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C a 8 °C) durante el paso de trabajo.

**Tabla 3:** Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

**Tabla 4:** Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

## 9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

**Control negativo:** Agregue 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

**Nota:** Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

**Muestra:** Agregue 5 µl de extracto de ADN a la mezcla maestra prepipeteada.

**Control positivo:** Añada 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

**Nota:** Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de

la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7 y 8).

### 9.3 Configuración del equipo de PCR

#### 9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

**Tabla 5:** Perfil de ADN por PCR en tiempo real para los equipos serie LightCycler® y Rotor-Gene Q

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

**Tabla 6:** Perfil de ADN por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

### 9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

**Nota:** El perfil universal por PCR en tiempo real se debe usar en los ensayos de ADN solo cuando se combinan en una corrida los ensayos de ADN y ARN RIDA® GENE por PCR en tiempo real.

**Tabla 7:** Perfil universal por PCR en tiempo real en el equipo LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

**Tabla 8:** Perfil universal por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q y CFX96™

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

## 9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 480II	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	465/510	Se requiere el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
	<i>B. holmesii</i>	533/610	
	<i>B. parapertussis</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	465/510	Se requiere el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	540/580	
	<i>B. holmesii</i>	540/610	
	<i>B. parapertussis</i>	610/670	
ABI 7500	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICD	VIC	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno)
	ICD	HEX	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.
	ICD	Amarillo	
	<i>B. holmesii</i>	Naranja	
	<i>B. parapertussis</i>	Rojo	

## 10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real utilizado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivos y negativos deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, fig. 1, fig. 2, fig. 3) para que la corrida se considere válida.

El **Positive Control** para *B. pertussis*, *B. holmesii* y *B. paraptussis* tiene una concentración de  $10^3$  copias/ $\mu$ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de  $5 \times 10^3$  copias.

**Tabla 10:** Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de genes diana
Control positivo	Positivo	ND * <sup>1</sup>	Consulte el certificado de garantía de calidad.
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

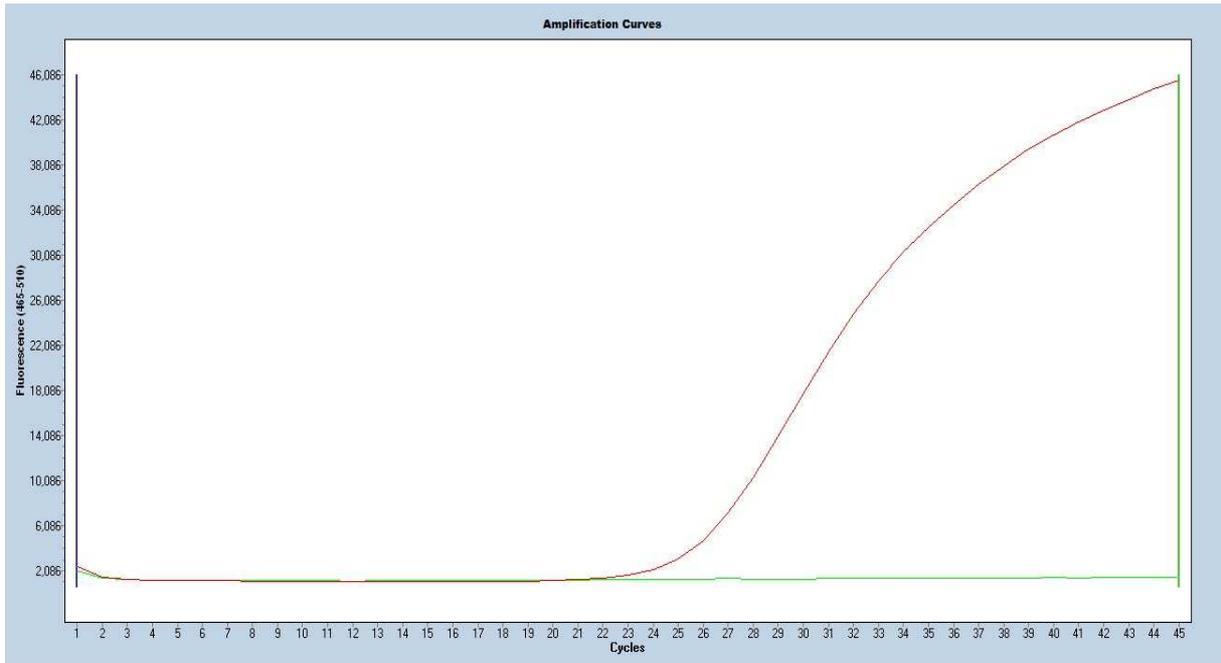
\*<sup>1</sup> No se requiere un valor de Ct del ICD para determinar que el control positivo es positivo.

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

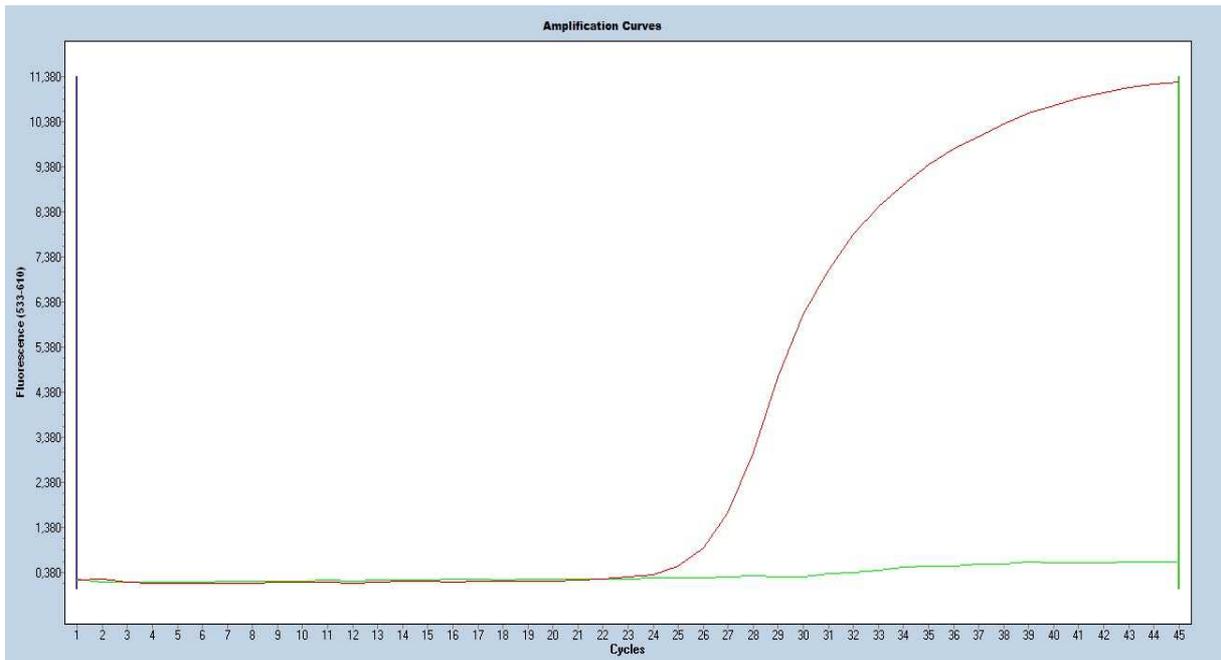
Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

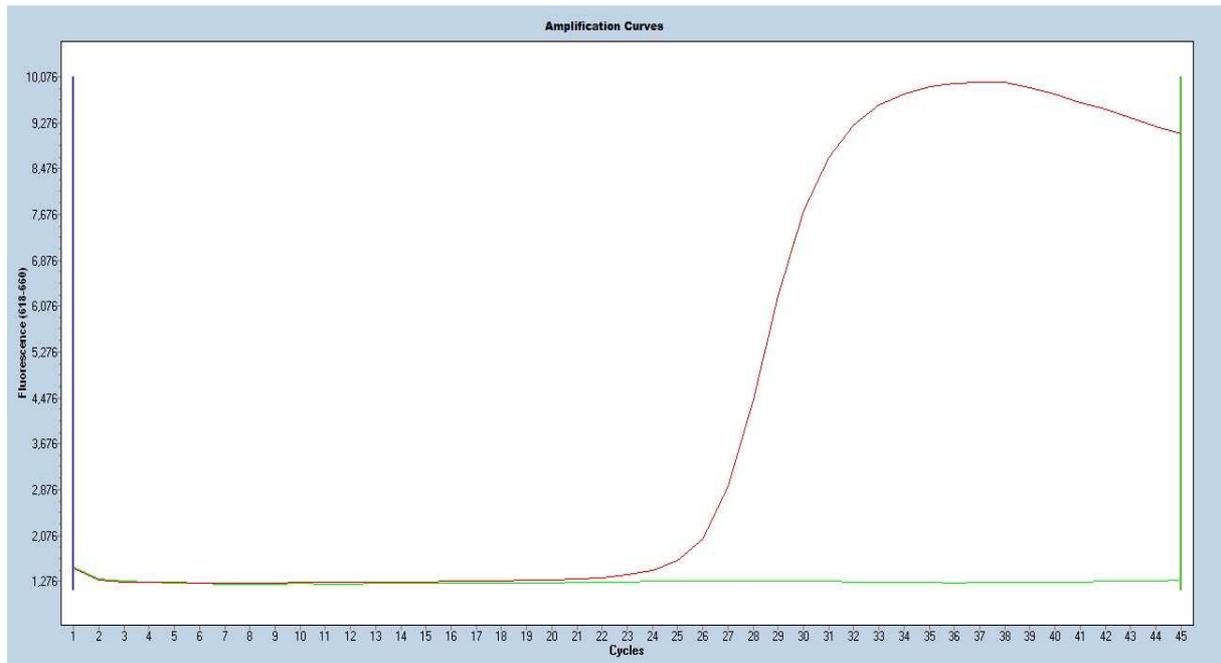
- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba



**Fig. 1:** Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Bordetella difficile*) en el LightCycler® 480II



**Fig. 2:** Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Bordetella holmesii*) en el LightCycler® 480II



**Fig. 3:** Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Bordetella parapertussis*) en el LightCycler® 480II

## 11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 11.

**Tabla 11:** Interpretación de las muestras

Genes diana			ICD	Resultado
<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. parapertussis</i>		
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	<i>B. pertussis</i> detectada
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>B. holmesii</i> detectada*
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>B. parapertussis</i> detectada
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	No válido
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	No válido
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>B. pertussis</i> y <i>B. parapertussis</i> detectada
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>B. holmesii</i> y <i>B. parapertussis</i> detectada
negativo	negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	No válido

**Nota:** \*consultar también el punto 8 en el capítulo 12: Limitaciones del método

*B. pertussis*, *B. parapertussis* o *B. holmesii* se detectan si el ADN de la muestra y el **Internal Control DNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

*B. pertussis*, *B. parapertussis* o *B. holmesii* también se detectan si hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero no del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La detección del control de amplificación interno no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control DNA** sea débil o esté ausente.

*B. pertussis*, *B. parapertussis* o *B. holmesii* no se detectan si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero hay señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del **Internal Control DNA**.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra ni del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

## 12. Limitaciones del método

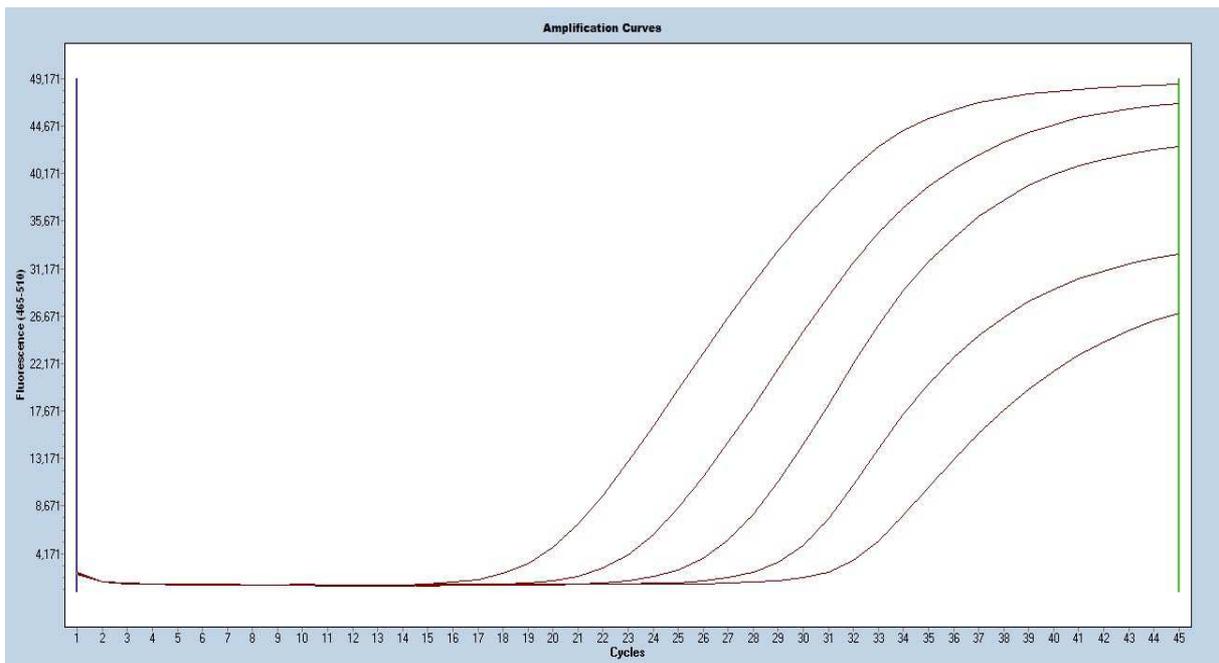
1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo está validado solo para muestras de lavados y exudados nasofaríngeos humanos.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismo en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de nuevas variantes y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA<sup>®</sup>GENE Bordetella.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LoD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia del gen diana de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*, respectivamente (IS481, IS1001).
8. En caso de una señal positiva para *B. pertussis* y *B. holmesii*, no se puede descartar la coinfección debida a los genes diana detectados.

## 13. Características de rendimiento

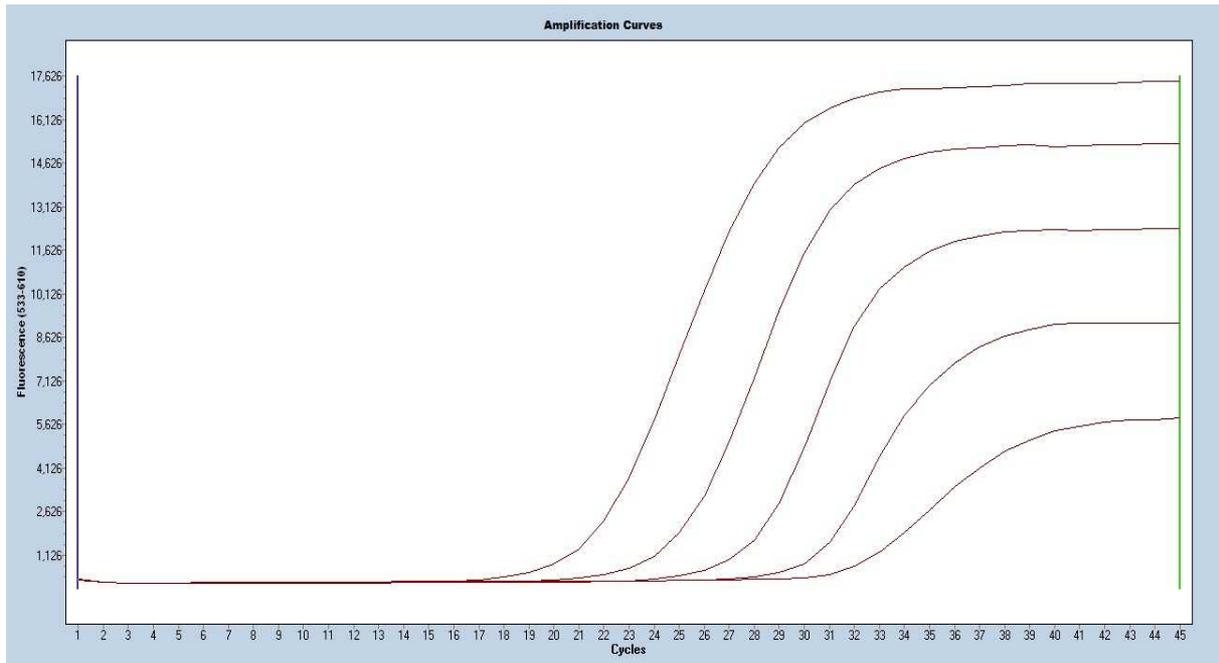
### 13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Bordetella tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de ADN por reacción para *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*, respectivamente.

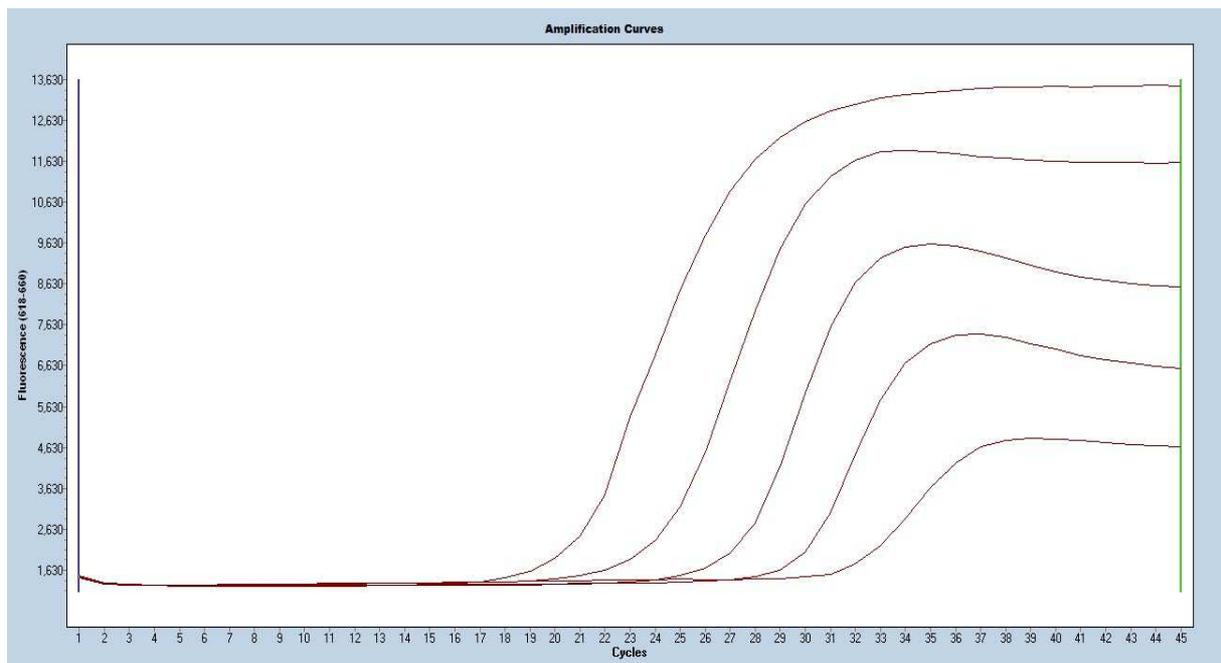
Las siguientes figuras 4, 5 y 6 muestran una dilución seriada de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* ( $10^5 - 10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$  en cada caso) en el LightCycler® 480II.



**Fig. 4:** Dilución seriada de *Bordetella pertussis* ( $10^5 - 10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler® 480II



**Fig. 5:** Dilución seriada de *Bordetella holmesii* ( $10^5 - 10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Fig. 6:** Dilución seriada de *Bordetella parapertussis* ( $10^5 - 10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler<sup>®</sup> 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y la concentración del ADN.

## 13.2 Especificidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Bordetella es específico para *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmesii* y *Bordetella parapertussis* en lavados y exudados nasofaríngeos. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 12):

**Tabla 12:** Ensayos de reactividad cruzada

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Virus coxsackie B4, humano	-	Virus de parainfluenza, serotipo 3	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Citomegalovirus, humano	-	Virus de parainfluenza 4b cepa CH19503, humano	-
Adenovirus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Virus sincitial respiratorio, humano, cepa Long	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Virus sincitial respiratorio, humano, cepa 9320	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Rinovirus, humano, genogrupo A	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	Virus Epstein-Barr, cepa B95-8	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	Virus del herpes simple 1, cepa McIntyre	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	Virus del herpes simple 2, cepa MS	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	Virus de la gripe A/PR/8/34	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , cepa MGH78578	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> SM131	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , cepa FH de Eaton Agent	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , cepa NCTC 7465	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Metaneumovirus</i> , humano	-	Virus de la varicela-zóster (tipo B)	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Neisseria meningitides</i> , cepa FAM18	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	Virus de parainfluenza 1 cepa C35, humano	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
Coronavirus 229E, humano	-	Virus de parainfluenza 2, cepa Greer, humano	-		

## 14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2019-05-17	3. Principio del ensayo 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 9.4 Configuración del canal de detección 11. Interpretación de los resultados 13.2 Especificidad analítica

## 15. Explicación de los símbolos

### Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Obsérvese las instrucciones de uso.
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

### Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

## 16. Bibliografía

1. World Health Organization 2011. Pertussis. <http://www.who.int/immunization/topics/pertussis/en/index.html>. Accessed 21.05.2013.
2. Centers for Disease Control and Prevention 2013. 2012 Provisional Pertussis Surveillance Report. <http://www.cdc.gov/pertussis/downloads/Provisional-Pertussis-Surveillance-Report.pdf>. Accessed 21.05.2013.
3. Linneman CC und Perry EB. *Bordetella parapertussis*. Recent experience and a review of the literature. Am J Dis Child. 1977, 131 (5): 560-563.
4. Mertsola, J. Mixed outbreak of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infection in Finland. Eur J Clin Microbiol. 1985, 4(2): 123-128.
5. Cherry JD und Seaton BL. Patterns of *Bordetella parapertussis* Respiratory Illnesses: 2008–2010.
6. Njamkepo E et al. Significant Finding of *Bordetella holmesii* DNA in Nasopharyngeal Samples from French Patients with Suspected Pertussis. Njamkepo E et al. Significant Finding of *Bordetella holmesii* DNA in J. Clin Microbiol 2011, 49(12):4347-4348.
7. Robert Koch Institut 2013. Pertussis (Keuchhusten). RKI-Ratgeber für Ärzte 2010. Accessed 21.05.2013.
8. Centers for Disease Control and Prevention 2012. Pertussis. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book: Course Textbook - 12th Edition Second Printing (May 2012). Accessed 21.05.2013.
9. Riffelmann M et al. Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. J Clin Microbio. 2005, 43(10): 4925-4929.
10. Zhang X et al. Lack of Cross-protection against *Bordetella holmesii* after Pertussis Vaccination. Emerg Infect Dis 2012, 18(11): 1771-1779.