

RIDA® GENE Bordetella

REF PG2505



1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA[®]GENE Bordetella è un test di PCR real-time multiplex per la rilevazione diretta e qualitativa e per la differenziazione di *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella holmesii* da tamponi e lavaggi nasofaringei umani. Il test real-time multiplex RIDA[®]GENE Bordetella è destinato a essere utilizzato quale ausilio nella diagnosi della pertosse causata rispettivamente da *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella holmesii*.

2. Sintesi e spiegazione del test

Bordetella pertussis è un batterio gram-negativo che provoca un'infezione respiratoria acuta chiamata pertosse o tosse convulsa. *Bordetella holmesii*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella bronchiseptica* causano una tosse simile a quella convulsa, ma meno diffusa e in generale più mite. La pertosse può causare gravi complicanze in persone di tutte le età e può essere pericolosa per la vita soprattutto nei bambini. L'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) calcola circa 16 milioni di casi di pertosse in tutto il mondo nel 2008, che hanno causato la morte di circa 195.000 bambini.¹ Nel 2012, negli Stati Uniti, si sono verificati 41.800 casi di pertosse.² Si stima che il 3-35 % delle infezioni da *Bordetella* siano causate da *B. parapertussis*.^{3,4} Nel corso di uno studio della durata di 3 anni, *B. parapertussis* è stato individuato come causa di pertosse nel 14 % dei campioni negli Stati Uniti.⁵ In uno studio francese, *B. holmesii* è stato rilevato in circa il 20 % delle infezioni da *Bordetella* negli adolescenti e negli adulti.⁶

L'infezione da *Bordetella* si trasmette per via respiratoria attraverso le goccioline sospese nell'aria. Dopo un periodo d'incubazione di 7-10 giorni, il decorso clinico attraversa tre stadi: stadio catarrale (1-2 settimane), caratterizzato dai comuni sintomi del raffreddore, stadio parossistico (1-2 settimane), caratterizzato dal parossismo di numerosi colpi di tosse in rapida successione seguiti da conati di vomito, e convalescenza (6-10 settimane), caratterizzata dalla scomparsa della tosse parossistica.^{7,8}

Nelle popolazioni con una elevata copertura vaccinale di neonati e bambini la trasmissione della pertosse continua a verificarsi perché la protezione del vaccino ha una durata di 5-10 anni, mentre l'immunità data dall'infezione naturale si esaurisce dopo 10-15 anni.

Pertanto, in popolazioni con elevata percentuale di soggetti vaccinati la trasmissione della malattia può avvenire da adolescenti e adulti a neonati oppure fra soggetti in cui la protezione del vaccino si è esaurita.^{8,9} Un recente studio suggerisce l'assenza di protezione incrociata verso *B. holmesii* dopo la somministrazione del vaccino contro la pertosse.¹⁰

Per la diagnosi della pertosse sono disponibili diversi metodi di laboratorio, incluse la coltura, la sierologia e la PCR. La coltura è specifica quasi al 100 % e può raggiungere il 50 % nelle prime 2 settimane dall'esordio della tosse, per poi regredire

nel tempo La coltura richiede un terreno speciale e dura almeno una settimana. La diagnosi sierologica è inadeguata nel primo stadio della malattia.

Gli anticorpi vengono rilevati non prima di due settimane dall'infezione o dalla vaccinazione. È possibile ricorrere a test ELISA utilizzando come antigene la tossina della pertosse (PT) o emoagglutinina filamentosa (FHA). La FHA viene formata da tutte le specie di *Bordetella*, mentre la PT è caratteristica del solo *B. pertussis*. La PT è contenuta in tutti i vaccini, mentre la FHA è un componente di molti vaccini acellulari contro la pertosse. Il test sierologico non consente di distinguere la risposta immunitaria contro l'infezione da quella provocata dal vaccino. La PCR real-time consente una rilevazione rapida e specifica nelle prime 4 settimane dall'esordio della tosse, Inoltre, la PCR real-time consente di differenziare le specie patogene di *Bordetella*.^{8,9}

3. Principio del test

RIDA[®]GENE Bordetella è un test di PCR real-time multiplex per la rilevazione diretta e qualitativa e per la differenziazione di *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella holmesii* (IS481, IS1001) da tamponi e lavaggi nasofaringei umani.

Dopo l'isolamento del DNA, i frammenti di gene specifici di *Bordetella pertussis* (IS481), *Bordetella parapertussis* (pIS1001) e *Bordetella holmesii* (IS481, hIS1001) (se presenti) sono amplificati. I target amplificati vengono rivelati con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la Taq-Polymerase rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rilevato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA[®]GENE Bordetella contiene un Internal Control DNA (ICD) quale controllo interno della procedura di preparazione del campione e/o per determinare la possibile inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tab. 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rosso
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	arancione
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu

5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongelare accuratamente i reagenti prima dell'uso (ad esempio in un frigorifero a 2 – 8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 20 cicli di congelamento/scongelo senza compromettere i test (ad esempio dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2 – 8 °C).

6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test RIDA[®] GENE Bordetella RT-PCR real-time è adatto per l'uso con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per la PCR real-time elencati di seguito:

Tab. 2: Attrezzatura necessaria

Piattaforma di estrazione	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS easy [®] MAG [™]
Strumento per la PCR real-time:	
Roche	LightCycler [®] 480II, LightCycler [®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Avvertenze: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se si desidera utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de.

- Tamponi sterili, privi di terreno, in fiocco di nylon (ad esempio Copan Diagnostic Inc., n. di catalogo 552C)
- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler[®] 480II e LightCycler[®] 480 z
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (priva di nucleasi)

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in stanze separate per evitare contaminazione crociata.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

8. Raccolta e conservazione di campioni

8.1 Preparazione del campione da tamponi nasofaringei

Per l'isolamento del DNA da tamponi asciutti utilizzare un kit (ad es. RIDA[®] Xtract (R. Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore.

Per l'isolamento del DNA dai tamponi nasofaringei, si raccomanda la seguente procedura: Dispensare 400 µl di acqua per PCR in una provetta di preparazione. Inserire il tampone nell'acqua e tagliare o rompere il fusto. Chiudere bene la provetta di preparazione, vorticare brevemente e seguire le istruzioni del produttore del kit o del sistema di estrazione del DNA.

Il kit RIDA[®]GENE Bordetella contiene un Internal Control DNA che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'Internal Control DNA può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'Internal Control DNA viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di Internal Control DNA alla Master Mix (vedere Tab. 4).

Se l'Internal Control DNA viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere

20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione. L'**Internal Control DNA** sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** dirett **Internal Control DNA** di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

8.2 Preparazione del campione da lavaggi nasofaringei

Per l'isolamento del DNA da lavaggi nasofaringei, aggiungere il volume adeguato seguendo le istruzioni del produttore del kit o del sistema di estrazione del DNA.

Per l'isolamento del DNA da tamponi asciutti utilizzare un kit (ad es. RIDA[®] Xtract (R. Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore.

Il kit RIDA[®]GENE Bordetella contiene un **Internal Control DNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'**Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'**Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tab. 4).

Se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione. L'**Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10 % a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tab. 3, Tab. 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, il **Positive Contro**, il **No Template Control** e l'**Internal Control DNA**. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2 – 8 °C).

Tab. 3: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix
(ICD come controllo di estrazione e inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

Tab. 4: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix
(ICD solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10% extra)
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
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

Controllo negativo: Dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo negativo.

Campione: Dispensare 5 µl di DNA Extract alla Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: Dispensare 5 µl di **Positive Control** alla Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo PCR real-time per DNA

Tab. 5: Profilo della PCR real-time del DNA per le serie LightCycler® e Rotor-Gene Q

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 6: Profilo della PCR real-time del DNA per Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.3.2 Profilo PCR real-time universale

Nota: il profilo per PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA® GENE DNA e RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

Tab. 7: Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler®

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 8: Profilo PCR real-time universale per Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.4 Impostazione del canale di rilevazione

Tab. 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 480II	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessario
	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	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessario
	ICD	540/580	
	<i>B. holmesii</i>	540/610	
	<i>B. parapertussis</i>	610/670	
ABI 7500	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICD	VIC	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento
	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	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite
	ICD	Giallo	
	<i>B. holmesii</i>	Arancione	
	<i>B. parapertussis</i>	Rosso	

10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, i controlli positivo e negativo devono mostrare risultati corretti (vedere Tabella 10, Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3).

Il **Positive Control** per *B. pertussis*, *B. holmesii* e *B. parapertussis* ha una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5×10^3 copie.

Tab. 10: Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Gene Ct target
Controllo positivo	Positivo	NA * ¹	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

*¹ Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test

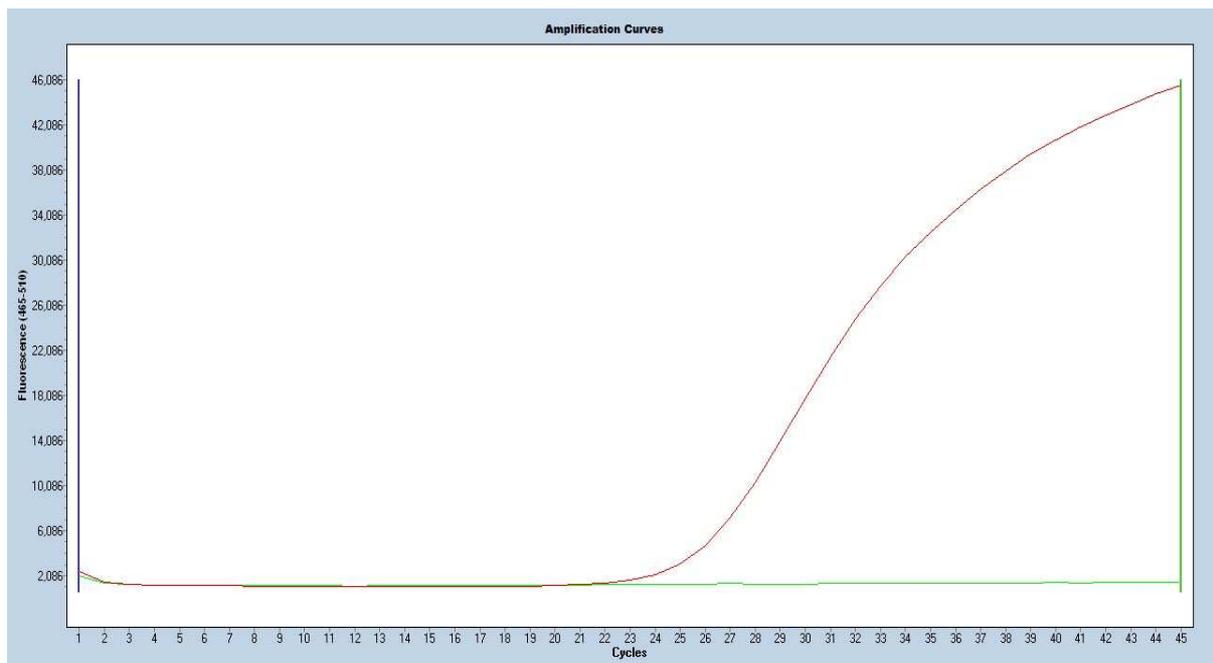


Fig. 1: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (*Bordetella pertussis*) sul LightCycler® 480II

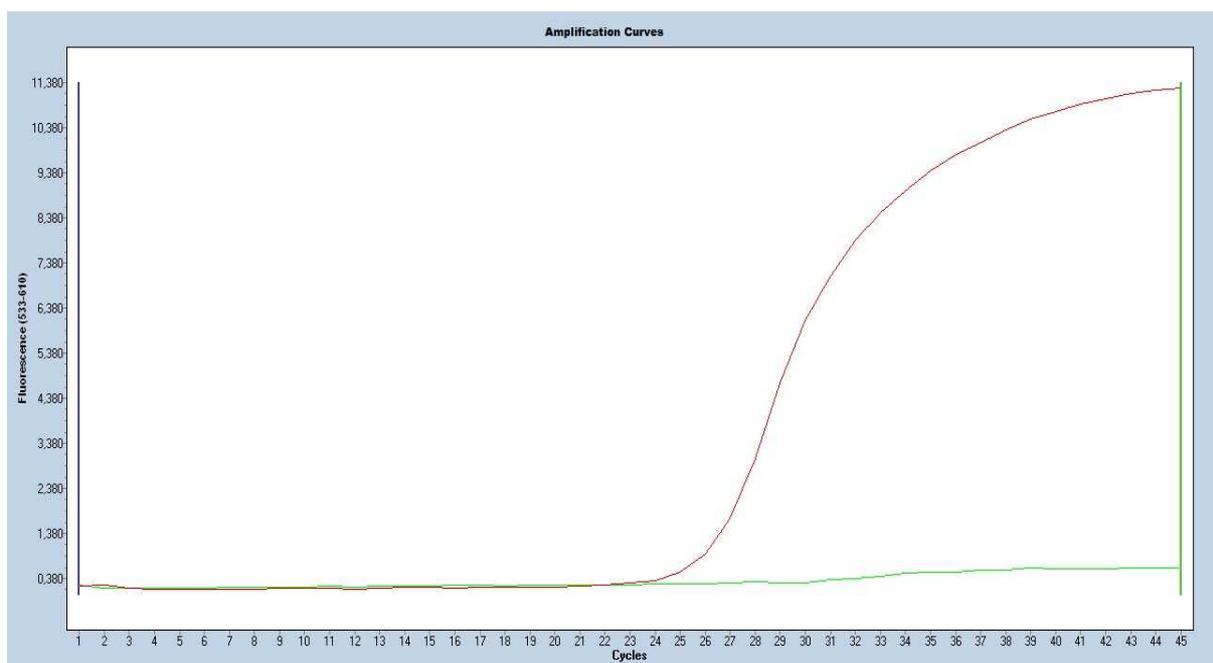


Fig. 2: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (*Bordetella holmesii*) sul LightCycler® 480II

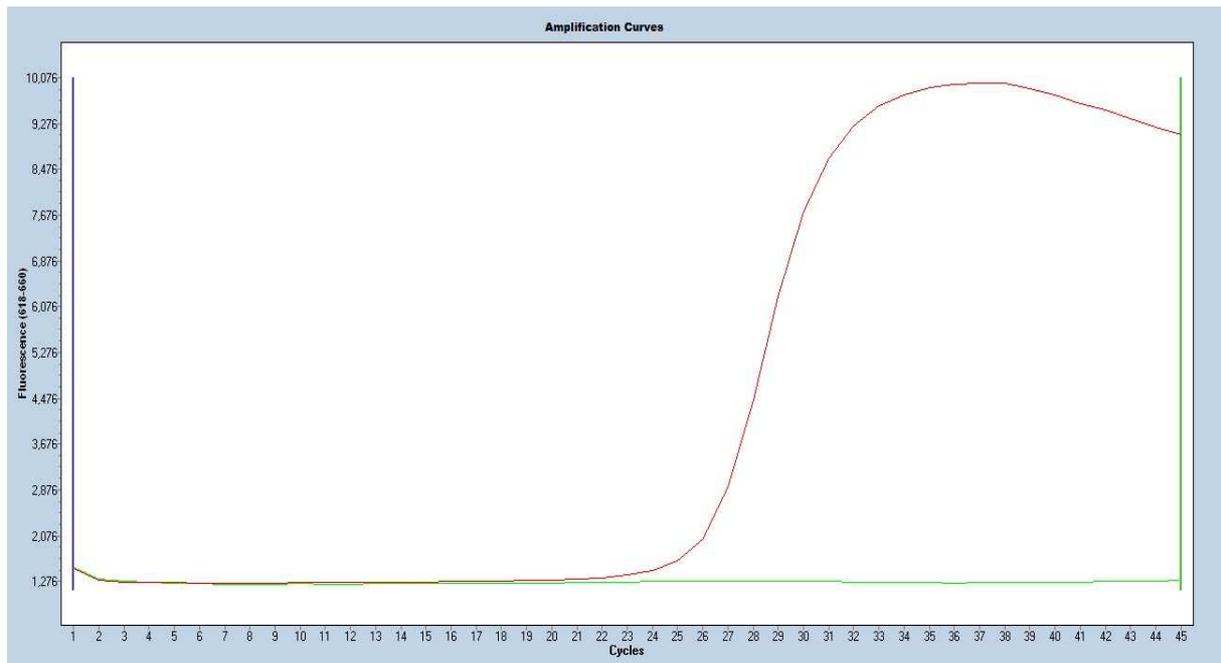


Fig. 3: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (*Bordetella parapertussis*) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

Tab.11: Interpretazione del campione

Geni target			ICD	Risultato
<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> rilevato
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>B. holmesii</i> rilevato*
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>B. parapertussis</i> rilevato
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	Non valido
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	Non valido
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>B. pertussis</i> e <i>B. parapertussis</i> rilevato
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>B. holmesii</i> e <i>B. parapertussis</i> rilevato
negativo	negativo	negativo	positivo	Geni target non rilevati
negativo	negativo	negativo	negativo	Non valido

Avvertenze: *vedere anche il punto 8 nel capitolo 12: Limiti del metodo

B. pertussis, *B. parapertussis* o *B. holmesii* viene rilevato se il DNA del campione e l'Internal Control DNA mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rilevazione.

B. pertussis, *B. parapertussis* o *B. holmesii* viene rilevato anche se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma l'Internal Control DNA non mostra alcun segnale di amplificazione nel sistema di rilevazione. La rilevazione del controllo di amplificazione interno non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell'Internal Control DNA sia debole o assente.

B. pertussis, *B. parapertussis* o *B. holmesii* non viene rilevato se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma l'Internal Control DNA mostra un segnale di amplificazione nel sistema di rilevazione. La rilevazione dell'Internal Control DNA esclude l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né il DNA del campione né l'**Internal Control** **DNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rilevazione. Il campione contiene un inibitore della PCR. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per i tamponi e i lavaggi nasofaringei umani.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rilevazione di nuove varianti e causare un risultato falso negativo con il test RIDA[®]GENE Bordetella.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rilevazione (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza del gene target per *B. pertussis*, *B. paraptussis* e *B. holmesii*, rispettivamente (IS481, IS1001).
8. In caso di segnale positivo per *B. pertussis* e *B. holmesii* non è possibile escludere una coinfezione dovuta ai geni target rilevati.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test RIDA® GENE Bordetella di PCR real-time multiplex ha un limite di rilevazione ≥ 10 copie di DNA per reazione per *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii*, rispettivamente.

Le seguenti Figure 4, 5 e 6 mostrano serie di diluizioni di *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler® 480II.

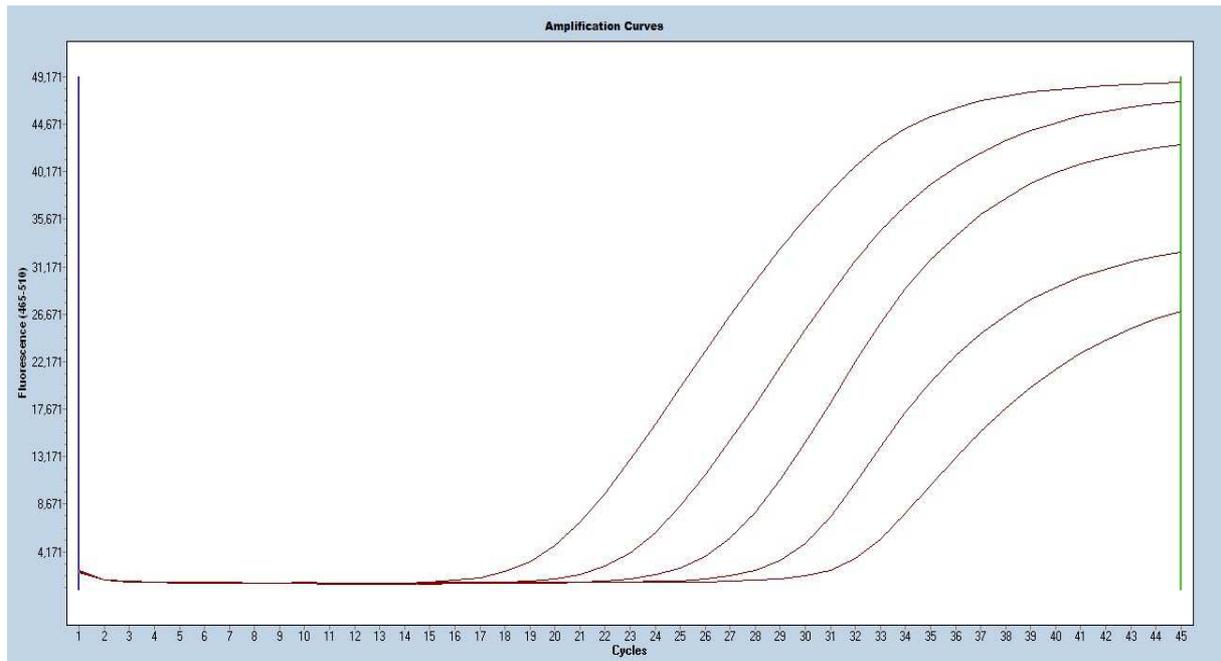


Fig. 4: Serie di diluizione di *Bordetella pertussis* ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler® 480II

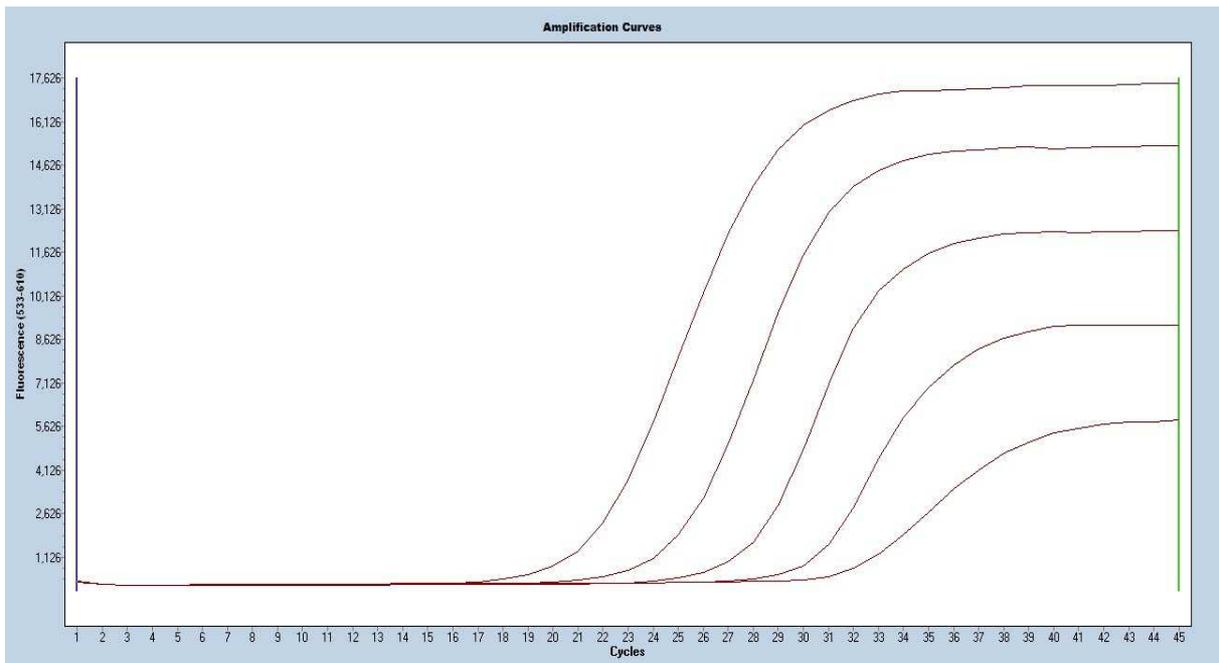


Fig. 5: Serie di diluizione di *Bordetella holmensis* ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

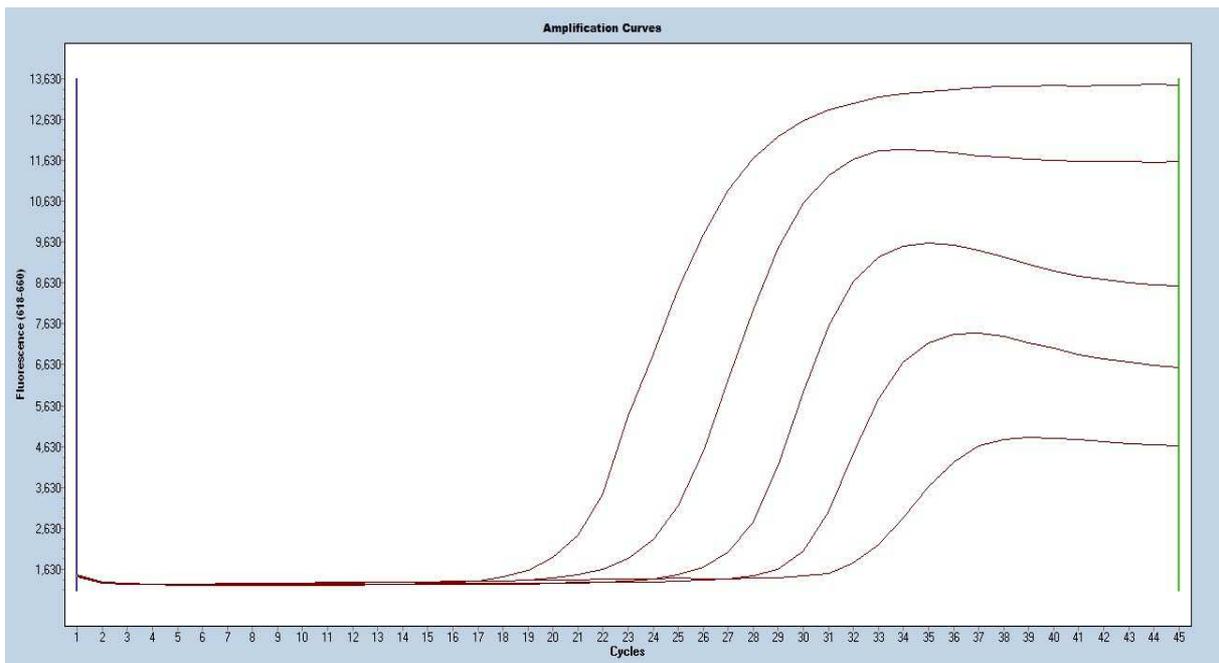


Fig. 6: Serie di diluizione di *Bordetella parapertussis* ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

Il limite di rivelabilità dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dalla concentrazione del DNA.

13.2 Specificità analitica

Il test RIDA® GENE Bordetella di PCR real-time multiplex è specifico per *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmesii* e *Bordetella parapertussis* da tamponi e lavaggi nasofaringei. Non è stata rilevata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab. 12):

Tab. 12: Test di reattività crociata

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Virus Coxsackie B4, umano	-	Virus parainfluenzale umano, sierotipo 3	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Cytomegalovirus, umano	-	Virus parainfluenzale 4b, ceppo CH19503, umano	-
Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo Long	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo 9320	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Rinovirus, umano, genogruppo A	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	Virus Epstein Barr, ceppo B95-8	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	Virus dell'herpes simplex 1, ceppo McIntyre	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	Virus dell'herpes simplex 2 ceppo MS	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	Virus dell'influenza A/PR/8/34	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , ceppo 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> sottosp. <i>Pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> sottosp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , ceppo FH di agente Eaton	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ceppo NCTC 7465	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Metapneumovirus</i> , umano	-	Virus Varicella Zoster (tipo B)	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Neisseria meningitides</i> , ceppo FAM18	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	Virus parainfluenzale 1, ceppo C35, umano	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
Coronavirus 229E, umano	-	Virus parainfluenzale 2, ceppo Greer, umano	-		

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2019-05-17	3. Principio del test 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari 9.4 Impostazione del canale di rilevazione 11. Interpretazione del risultato 13.2 Specificità analitica

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica <i>in vitro</i>
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici nel test

Non pertinente

16. Bibliografia

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.