alethia™ Pertussis

Ensaio de Amplificação de DNA para a Detecção de *Bordetella pertussis* em amostras de swab nasofaríngeo

REF 480750 IVD **Produto para diagnóstico *in vitro***

FINALIDADE DE USO

O ensaio de amplificação de DNA do Alethia Pertussis, realizado no equipamento Alethia™, é um método qualitativo de teste diagnóstico *in vitro* para a detecção direta de *Bordetella pertussis* em amostras de swab nasofaríngeo humano retiradas de pacientes suspeitos de ter infecção do trato respiratório atribuível a *Bordetella pertussis*.

O ensaio Alethia Pertussis utiliza tecnologia de amplificação de DNA isotérmico mediada por alça (LAMP) para detectar *B. pertussis*, visando o elemento de inserção IS481 do genoma de *B. pertussis*. O elemento de inserção IS481 também pode ser encontrado em *B. holmesii* e algumas cepas de *B. bronchiseptica*. As infecções respiratórias com *B. pertussis, B. holmesii* ou *B. bronchiseptica* podem produzir resultados de testes positivos em ensaios de IS481. A infecção por *B. holmesii* pode causar uma doença clínica semelhante a *B. pertussis,* e foram relatados surtos mistos envolvendo infecção por *B. pertussis* e *B. holmesii*. Testes adicionais devem ser realizados se necessário para diferenciar *B. holmesii* e *B. pertussis. B. bronchiseptica* é uma causa rara de infecção em seres humanos. Quando os fatores clínicos sugerem que *B. pertussis* pode não ser a causa da infecção respiratória, outras pesquisas clinicamente apropriadas devem ser realizadas de acordo com as diretrizes publicadas.

Os resultados negativos para o ensaio de amplificação do DNA Alethia Pertussis não impedem a infecção por *Bordetella pertussis* e os resultados positivos não descartam a co-infecção com outros agentes patogênicos respiratórios. Os resultados do ensaio Alethia Pertussis devem ser utilizados em conjunto com a informação obtida durante a avaliação clínica do paciente como auxílio no diagnóstico da infecção por *B. pertussis* e não deve ser utilizada como única base para o tratamento ou outras decisões de manejo de pacientes.

Alethia Pertussis destina-se ao uso em ambientes hospitalares, laboratoriais de referência ou públicos. O dispositivo não é destinado ao uso não laboratorial ou de ponto de atendimento (*Point of Care*).

RESUMO E EXPLANAÇÃO DO TESTE

O ensaio de amplificação de DNA Alethia Pertussis baseia-se em tecnologia de amplificação mediada por alça (LAMP)[1, 2]. O ensaio visa uma sequência de 198 pares de bases do genoma de *Bordetella pertussis* que reside numa região da sequência de elementos de inserção IS481.

A amplificação mediada por alça usa iniciadores (*primers*) projetados especificamente para fornecer uma amplificação específica isotérmica contínua do DNA. Um subproduto desta amplificação é a formação de pirofosfato de magnésio, que forma um precipitado branco, causando, portanto, turbidez na solução. As características de absorção da solução de reação são monitoradas pelo Meridian Alethia Incubator/Reader. As alterações nas características de absorbância da solução de reação criadas pela precipitação de pirofosfato de magnésio indicam a presença de DNA alvo. A ausência de DNA alvo resulta em alterações não significativas na absorbância da amostra.

O kit Alethia Pertussis inclui reagente de controle de ensaio/controle negativo Alethia Pertussis, Dispositivos de Teste Alethia Pertussis, Tampão de Amostra Alethia Pertussis e Óleo Mineral. O controle de ensaio/controle negativo Alethia, utilizado para a diluição e preparação da amostra, é uma solução Tampão Tris contendo *E. coli* tratada com formalina que abrigam o DNA de *Staphylococcus aureus*. O Dispositivo de Teste Alethia Pertussis contém uma esfera liofilizada de reagente em cada uma das duas câmaras; uma Câmara TESTE com primers específicos de IS481 e uma Câmara CONTROLE com primers específicos de *S. aureus*. O DNA de *S. aureus* no Reagente de Controle de Ensaio/Controle Negativo e os *primers* específicos de *S. aureus* de câmara CONTROLE funcionam como o Controle Interno para o ensaio. Durante a preparação da amostra, uma amostra de paciente é adicionada ao Reagente de Controle de Ensaio/Controle Negativo. A adição da amostra ao reagente de Controle de Ensaio/Controle Negativo combina DNA de amostra com o DNA de Controle *S. aureus* e permite o processamento paralelo de DNA alvo e DNA de Controle por meio de amplificação e detecção. O Controle Interno monitora a inibição da amplificação, o desempenho do reagente e a eficácia do processamento da amostra. O Controle alvo do *S. aureus* deve ser amplificado e detectado na reação final ou o teste é considerado inválido e os resultados do paciente não são relatados.

O Alethia monitora as mudanças nas características de absorbância medindo a transmissão de luz através das soluções de reação de Teste e Controle. A transmissão da luz é verificada no ensaio Run Start (início da execução) ($Signal_{Initial}$, S_i) e no ensaio Run End (final da execução) ($Signal_{Initial}$, S_i). O Alethia calcula a alteração na transmissão de luz entre Run End e Run Start (S_f:S_i) e compara a relação com um valor de corte fixo.

Os valores de corte fixos para a câmara TESTE são usados para relatar os resultados da amostra. Os índices S_f:S_i da câmara TESTE menores de 82% são reportados como "POSITIVE" (positivo); as proporções S_f:S_i do bloco TESTE maiores ou iguais a 82% são reportadas como "NEGATIVE" (negativo). *Os valores numéricos não são relatados.*

Os valores de corte fixos para a câmara CONTROLE são usados para determinar validade. Os índices S_f:S_i da câmara TESTE menores de 90% são consideradas válidas e permitem a notificação dos resultados da câmara TEST (POSITIVE, NEGATIVE - positivo, negativo, respectivamente); as proporções S_f:S_i da câmara CONTROLE maiores ou iguais a 90% são consideradas inválidas e impedem o relatório dos resultados da câmara TEST. As reações de câmara de CONTROLE inválidas são relatadas como "INVALID". *Os valores numéricos não são relatados.*

Critérios de corte mais rigorosos são aplicados na reação da câmara CONTROL para garantir que a amplificação não seja inibida, os reagentes estão funcionando como pretendido e que o processamento da amostra foi executado adequadamente.

PRINCÍPIOS

B. pertussis é um patógeno humano exclusivamente responsável pela doença respiratória endêmica tosse convulsa/coqueluche (pertussis); uma doença publicamente relatável que impactou mais de 200 mil pessoas em todo o mundo em 2012. A tosse convulsa é atualmente a única doença nos EUA que mostra uma tendência crescente de casos notificáveis de morbidade substancial apesar da disponibilidade de uma vacina.[3] Os Centros de Controle de Doenças dos EUA (CDC) relataram cerca de 48.300 casos de pertussis em 2012, uma média de 15,4 casos por 100.000 pessoas nos Estados Unidos.[4] Os recentes surtos de pertussis indicaram imunidade decrescente em crianças após receber a dose de vacina acelular de reforço final, permitindo a suscetibilidade da infecção pertussis em ambas populações vacinadas e não vacinadas de crianças de 7 a 11.[5, 6]

Os surtos de coqueluche são particularmente desafiantes para o controle, já que os estágios iniciais da doença se assemelham a outras infecções respiratórias e os pacientes podem permanecer altamente infecciosos por até 5 semanas após o aparecimento dos sintomas.[3] Além disso, a coqueluche não é oficialmente diagnosticada até a presença da característica tosse "gritada" que é exibida quase 2 semanas após o aparecimento do sintoma.[3] O diagnóstico clínico de coqueluche pode ser realizado usando testes de cultura, sorologia ou testes de amplificação de ácido nucleico (NAAT). Embora a cultura seja altamente específica, a sensibilidade é baixa, os resultados podem levar até 7 dias e as células viáveis necessárias para a cultura diminuem com a progressão da doença (após 2 semanas de início do sintoma).[7] Ao contrário da cultura, os ensaios NAAT podem fornecer resultados rápidos e não requer bactérias viáveis. O teste de amplificação de ácido nucleico para *B. pertussis* é mais sensível durante as primeiras três semanas de tosse, pois o DNA bacteriano está presente na nasofaringe. A quantidade de bactérias presentes na nasofaringe diminui drasticamente após a quarta semana de tosse, tornando a probabilidade de obter resultados de testes falsamente negativos mais elevados durante os últimos estágios da infecção.[8] Além disso, apenas pacientes sintomáticos com tosse devem ser testados por NAAT para evitar resultados falso-positivos por contatos próximos assintomáticos.[8] A sorologia só pode ser utilizada para diagnóstico em estágios tardios da doença, aproximadamente 2-8 semanas após o início da tosse.

REAGENTES / MATERIAIS FORNECIDOS

O número máximo de testes obtidos com este kit de teste está listado no exterior da caixa.

1. **Reagente de controle de ensaio/controle negativo Alethia Pertussis:** Solução Tampão Tris contendo *E. coli* tratada com formalina contendo um plasmídeo com um segmento do genoma de *S. aureus* e ázida de sódio (0,09%) como conservante. O Reagente de Controle de Ensaio/Controle Negativo funciona como o Controle de Ensaio durante o teste do paciente e como o Controle Negativo Externo durante os testes de Controle de Qualidade de rotina;
2. **Dispositivo de Teste Alethia Pertussis:** Dispositivo de duas câmaras contendo reagentes de amplificação liofilizados (DNA polimerase, desoxinucleótidos trifosfatos) e primers IS481 (Câmara TESTE) ou primers controle (Câmara CONTROLE);
3. **Tampão de Amostra Alethia Pertussis:** solução de Tris-EDTA contendo azida de sódio (0,09%) como conservante;
4. **Óleo mineral** (frasco com conta gotas);
5. **Reagente de pré-tratamento Alethia (para procedimento opcional de tratamento de amostras):** Reagente liofilizado contendo agente neutralizante e ázida de sódio (0,1%) como conservante. Cada frasco contém reagente suficiente para tratar 50 amostras.

MATERIAIS FORNECIDOS SEPARADAMENTE

Kit de Controle Externo Alethia Pertussis, Número de Catálogo: 479930

MATERIAIS NÃO FORNECIDOS

1. Luvas de látex descartáveis (sem talco);
2. Ponteiras resistentes a aerossol, livres de DNase e RNase.
3. Sistema de coleta e transporte de amostras
   Swabs nasofaríngeos: poliéster (capacidade mínima de 18 µL, por exemplo, Puritan Medical Products catálogo 25-801D 50); Rayon (capacidade mínima de 31 µL, por exemplo, Puritan Medical Products catálogo 25-801R 50); ou Nylon Flocado (Capacidade Mínima de 69 µL, por exemplo, Copan catálogo 503CS01 ou o swab do Catálogo 482C)
   Meio de transporte não nutritivo: Líquido Amies sem carvão vegetal; ou Líquido Stuart (Volume máximo: 1,2 mL em tampão/esponja)
   Sistema de coleta: Coleção Copan Liquid Amies Elution Swab (ESwab™) e Sistema de Transporte (catálogo Copan 482C);
4. Água desionizada;
5. Tubos de microcentrífuga

EQUIPAMENTOS NÃO FORNECIDOS

1. Banho térmico seco com bloco térmico de 12 mm capaz de atingir 95°C;
2. Termômetro digital com memória MÁX/MIN (ex., Termômetro a prova d'água e choque Traceable® Lollipop™);
3. Vórtex Mixer;
4. Cronômetro com intervalos de medição disponíveis;
5. Micropipeta com capacidade para 50 µL;
6. Pipeta com capacidade para 2.5 mL;
7. Equipamento de corte (ex, tesouras, alicates de cortes)
8. Equipamento Alethia, Meridian Bioscience, Inc. Número de Catálogo: 610189

PRECAUÇÕES

1. Todos os reagentes se destinam somente ao uso em diagnóstico *in vitro*;
2. Não troque o reagente de Controle de ensaio/controle negativo ou dispositivos de teste entre lotes. O tampão de amostra, o reagente de pré-tratamento e o óleo mineral são intercambiáveis desde que estejam dentro das datas de validade atribuídas quando usados;
3. Siga as regras de Biossegurança Nível 2 e observe as Boas Práticas durante a execução dos ensaios.[9] Trate todas as amostras e material derivado destes ensaios como potencialmente contaminantes. Não coma, beba ou fume nos locais onde as amostras ou reagentes do kit são manuseados;
4. Use luvas descartáveis durante os ensaios e lave bem as mãos ao terminar;
5. É recomendável que sejam empregados Programas de Controle de Qualidade para testes Moleculares, incluindo uso adequado e cuidado com os equipamentos;[10]
6. O Dispositivo de Teste Alethia Pertussis contém reagentes liofilizados. A embalagem protetora não deve ser aberta até que o ensaio se encontre pronto para ser iniciado;
7. O Dispositivo de Teste Alethia Pertussis inclui um recurso de travamento designado para prevenir a contaminação da área de teste pelo produto amplificado. NÃO use o Dispositivo de Teste se o travamento estiver rompido;
8. Descarte os dispositivos Alethia imediatamente após o encerramento do teste, mantendo a trava seguramente em seu lugar. A abertura do dispositivo depois da amplificação pode resultar em contaminação da área de teste pelo produto amplificado.
9. Os resultados de teste inválidos podem ser resultado dapreparação inadequada da amostra, falha no reagente, falha do instrumento ou falha no controle interno. Nesses casos, o resultado inválido pode ser corrigido repetindo o teste. A nasofaringe de alguns pacientes contém um inibidor biológico que também causará um resultado inválido. Nesses casos, o inibidor causará repetidos resultados inválidos, a menos que a amostra seja tratada para remover a interferência. (Consulte a seção sobre TRATAMENTO/PRÉTRATAMENTO DE AMOSTRA OPCIONAL para o método de tratamento);
10. Os regulamentos locais, estaduais e federais para a notificação de doenças notificáveis são atualizados continuamente e incluem uma série de organismos para investigações de vigilância e surto.[a, b] Além disso, os Centros para o Controle de Doenças (CDC) recomendam que, quando os patógenos de doenças relatáveis são detectados por um teste de diagnóstico independente da cultura, o laboratório deve facilitar a obtenção do material isolado ou clínico para submissão ao laboratório de saúde pública apropriado para auxiliar na detecção de surtos e nas investigações epidemiológicas. Os laboratórios são responsáveis por seguir suas regulamentações estaduais e/ou locais e devem consultar seus laboratórios de saúde pública locais e/ou estaduais para obter diretrizes de submissão de amostras isoladas e/ou clínicas.
    a. Resumo de doenças notificáveis. MMWR
       http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm6153.pdf
    b. CIFOR Análise de Autoridades Estaduais Legais.
       http://www.cifor.us/documents/CIFORAnalysisStateLegalAuthorities.pdf

RISCOS e PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

Refira ao SDS, disponível em www.meridianbioscience.com para riscos e precauções de segurança (Hazards and Precautionary Statements).

ARMAZENAMENTO E VALIDADE

A data de expiração está indicada na etiqueta da embalagem original. Armazenar entre 2 e 30°C.

PREPARAÇÃO DO REAGENTE

Certifique-se de que os reagentes do kit estão à temperatura ambiente (21-30ºC) antes da utilização. Resultados imprecisos podem ser obtidos se a temperatura dos reagentes não estiver em equilíbrio com a temperatura ambiente ao ser executado o teste.

COLETA E PREPAÇÃO DA AMOSTRA

Tipo de Amostra: Swabs nasofaríngeos

Coleta de amostra: A coleta de amostras de swab nasofaríngeo deve ser realizada de acordo com procedimentos institucionais para coleta de amostras clínicas para infecção por *B. pertussis*. As amostras de swab nasofaríngeo devem ser coletadas com tipos adequados de swab (por exemplo, Poliéster, nylon flocado ou rayon).

Coloque o(s) swab(s) em meio de transporte não nutritivo (por exemplo, Líquido Amies, sem carvão, Líquido Stuart ou Copan ESwab médio) ou guarde-o sem conservação em um tubo estéril sem meio.

As amostras ou amostras não conservadas armazenadas em meios de transporte devem ser testadas o mais rápido possível, mas podem ser mantidas à temperatura ambiente (21-30ºC) por até 5 dias ou refrigeradas (2-8ºC) por até 7 dias antes do teste. Não congele as amostras.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA:

NOTA: Assegure-se que o instrumento Alethia esteja ligado e que as verificações de desempenho tenham sido completadas antes de iniciar o PREPARO DA AMOSTRA. Refira ao Manual de Operação do Alethia para informações complementares ao procedimento indicado acima e demais informações sobre a operação do instrumento.

NOTA: Os equipamentos de laboratório utilizados para cortar SWABS (por exemplo, tesouras, alicates de cortes) devem ser tratados com um agente de limpeza de grau molecular (por exemplo, 10% de hipoclorito), antes de cada uso. O equipamento deve estar completamente seco antes de cortar os swabs.

1. Preparação da amostra
   a. Swabs (rayon, nylon ou flocado):
      i. Coloque a amostra de swab em um tubo Tampão de amostra rotulado. Corte a haste do swab para garantir que as amostras caibam no tubo. Elua a amostra misturando no vórtex por 45-60 segundos. **As amostras eluídas podem ser mantidas à temperatura ambiente (21-30ºC) por até 48 horas ou refrigeradas (2-8ºC) por até 7 dias antes do teste.**
      ii. Adicione 50 µL de amostra eluída a um tubo de Controle de Ensaio/Controle Negativo com tampa rotulados.
      iii. Repita as etapas de PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS para todas as amostras de swab a serem processadas.
   b. Meio ESwab: O meio dentro do tubo de coleta do sistema ESwab contém amostra do paciente eluída.
      i. Misture no vórtex o tubo ESwab contendo a amostra de swab durante um mínimo de 10 segundos para eluir a amostra
      ii. Transfira 25 µL do meio para um tubo de Controle de Ensaio/Controle Negativo com tampa rotulados. (Não transfira este material para o tubo Tampão de amostra. Ele vai diretamente para tubo de o controle de ensaio/controle negativo)
      iii. Repita as etapas de PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS para todas as amostras de ESwab a serem processadas.
2. Misture no vórtex cada tubo de Controle de Ensaio/Controle Negativo contendo amostra eluída por aproximadamente 10 segundos.
3. Aqueça cada amostra/tubo de controle em um banho seco a 95 ± 5 ° C por 10 ± 2 minutos. Monitore o passo de tratamento térmico com um termômetro digital e temporizador de intervalo.
4. Remova cada amostra/tubo de controle do banho seco. As amostras tratadas com calor podem ser mantidas à temperatura ambiente (21-30 C) por até 15 minutos antes do teste.
5. Misture no vórtex por aproximadamente 10 segundos.

PROCEDIMENTO DO TESTE

NOTA: Até um máximo de dez amostras podem ser processadas em cada corrida do Alethia.

1. Retire um Dispositivo de Teste Alethia Pertussis da embalagem para cada amostra em teste. Cuidadosamente abra o Dispositivo e mantenha de forma que o reagente liofilizado não saia de seu interior. Apoie o Dispositivo em uma superfície plana ou em um suporte que o acomode com segurança;
2. Usando uma ponteira nova, transfira 50 µL da Amostra Termicamente Tratada, para a Câmara TESTE (Esfera Branca) do Dispositivo de Teste Alethia. Não introduza bolhas de ar na mistura de reação. Usando uma nova ponteira, transfira 50 µL da Amostra Termicamente Tratada para a Câmara CONTROLE (Esfera amarela) do Dispositivo de Teste Alethia. Não introduza bolhas de ar na mistura reação;
3. Adicione 1 gota de Óleo Mineral para a câmara TESTE e a câmara CONTROLE. Feche o Dispositivo de Teste Alethia e feche a trava com segurança;
4. Agite o Dispositivo de Teste gentilmente batendo suavemente com os dedos ou misture para remover bolhas de ar. Cuidadosamente examine os Dispositivos de teste para re-hidratação das Esferas de Controle/Teste, em busca de bolhas restantes da câmara ou presença de líquido na tampa. Caso note a presença esferas não dissolvidas, bolhas de ar ou líquido na tampa, bata o dispositivo na superfície da bancada e repita a inspeção visual. Amplificação e detetecção devem ser iniciados dentro de 15 minutos;
5. Insira o Dispositivo de Teste Alethia no Alethia e inicie a reação de amplificação e detecção. Os resultados serão exibidos ao final do teste.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

ID Amostra	Resultado reportado	Interpretação
Amostra do Paciente	POSITIVE (Positivo)	**Amostra não tratada ou pré tratada:** Amostras contendo DNA alvo de *B. pertussis* IS481.[a]
	NEGATIVE (Negativo)	**Amostra não tratada ou pré tratada:** DNA de *B. pertussis* não detectado.
	INVALID (Invalido)	**Amostra não-tratada: Sem resultado reportável. Repita o teste com uma amostra de reagente de prétratamento tratado/eluído.** Amostra do paciente inibindo a reação, preparação imprópria da amostra, falha do reagente, falha do instrumento ou do controle interno. **Amostra pré-tratada: Sem resultado relatável. NÃO trate novamente amostras já tratadas com Reagente de Prétratamento.** As amostras INVÁLIDAS pré-tratadas podem ser testadas novamente, se desejado, e devem ser reportadas como INVÁLIDAS se o teste novamente gerar o mesmo resultado. As amostras que produzem resultados INVÁLIDOS antes e após o pré-tratamento devem ser reportadas como INVÁLIDAS.
Controle Positivo	POSITIVE (Positivo)	**Resultado válido do controle positivo.** Reagentes ativos na execução do teste, Alethia operando corretamente.
	NEGATIVE (Negativo)	**Resultado incorreto do controle.** Repita o ensaio com o controle a partir do primeiro passo para identificar a origem do problema. Caso a falha no controle se repita, contate a assessoria científica da NL Diagnóstica reportando o erro.
	INVALID (Invalido)	**Sem resultado reportável. Repita o teste inteiro usando as amostras originais.** Caso o resultado do controle seja INVÁLIDO, contate a Assessoria Científica da NL Diagnóstica reportando o erro. Preparação imprópria da amostra, falha do reagente, falha do instrumento ou do controle interno.
Controle Negativo	POSITIVE (Positivo)	**Resultado incorreto do controle.** Repita o ensaio com o controle a partir do primeiro passo para identificar a origem do problema. Caso a falha no controle se repita, contate a assessoria científica da NL Diagnóstica reportando o erro.
	NEGATIVE (Negativo)	**Resultado válido do controle negativo**. Reagentes ativos na execução do teste, Alethia operando corretamente.
	INVALID (Invalido)	**Sem resultado reportável. Repita o teste inteiro usando as amostras originais. usando as amostras originais.** Caso o resultado do controle seja INVÁLIDO, contate a Assessoria Científica da NL Diagnóstica reportando o erro. Preparação imprópria da amostra, falha do reagente, falha do instrumento ou do controle interno.
POÇO VAZIO	NONE (Nenhum)	Não há Dispositivo de Teste Alethia inserido no poço do Alethia. **OU** O Dispositivo de Teste Alethia está comprometido em razão de falha no preparo da amostra, sujidades no instrumento ou colocação imprópria no instrumento. Neste caso, **repita o ensaio utilizando a amostra original**.

[a] IS481 é encontrada em múltiplas cópias em *B. pertussis* (50 a 238 cópias/genoma), em *B. holmesii* (8 a 10 cópias/genoma) e menos frequentemente em *B. bronchiseptica*.

PRETRATAMENTO/TRATAMENTO DE AMOSTRA OPCIONAL PARA ELIMINAR INIBIDORES DE REAÇÃO

O método a seguir pode ser usado para remover a atividade inibitória de substâncias biológicas na amostra do paciente.

Preparação do Reagente de Pré-Tratamento

1. Reconstitua o Reagente de Pré-Tratamento liofilizado adicionando 2,5 ml de água deionizada ao frasco. Tampe novamente o frasco;
2. Permita que o Reagente de Pré-tratamento reconstituído permaneça a 21-30°C durante 30 minutos, depois misture suavemente para evitar a formação de espuma;
3. Armazene o Reagente de Pré-Tratamento reconstituído de uma das duas maneiras:
   a. Armazene o Reagente de Pré-Tratamento reconstituído em seu frasco original a 2-8ºC por até um mês. Rotule o frasco com a sua nova data de validade, ou
   b. Transfira imediatamente alíquotas de 0,1 mL ou mais do reagente reconstituído para tubos de microcentrífuga rotulados, tampe-os adequadamentee congele as alíquotas em um freezer não descongelante a ≤ -20°C. As alíquotas congeladas são estáveis à expiração original do material liofilizado. Descongele cada alíquota congelada não mais do que uma vez antes de usar. As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas a 2-8°C por até uma semana.
4. Aqueça o reagente de pré-tratamento reconstituído a 21-30ºC antes do uso. Misture suavemente para evitar a formação de espuma. Não use a solução Reagente de pré-tratamento se parecer turva.

Tratamento de amostras previamente preparadas para retestagem:

1a. Swabs (rayon, nylon ou flocados):
   i. Adicione 50 µL de Reagente de Pré-Tratamento reconstituído ao Tubo Tampão contendo a amostra do paciente (restante de PREPARAÇÃO DE ESPECIFICAÇÃO etapa 1.a.i.) e misture no vórtex por 10-15 segundos para misturar o conteúdo. A amostra tratada não deve ser armazenada além do tempo de espera de amostra eluída original descrito no passo 1 da seção de PREPARAÇÃO DE AMOSTRA acima;
   ii. Transfira 50 µL do meio para um tubo e tampa de Controle de Ensaio/Controle Negativo rotulado.

1b. Meio ESwab:
   i. Transfira 500 µL de meio ESwab inoculado com a amostra do paciente (do tubo de coleta ESwab) para um tubo vazio;
   ii. Adicione 50 µL de Reagente de Pré-tratamento reconstituído ao tubo e misture no vórtex por 10-15 segundos para misturar o conteúdo. A amostra tratada não deve ser armazenada além do tempo de espera de amostra eluída original descrito no passo 1 da seção de PREPARAÇÃO DE AMOSTRA acima;
   iii. Transfira 25 µL do meio para um tubo e tampa de Controle de Ensaio/Controle Negativo rotulado.

2. Complete as Etapas 2-5 da seção PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS e prossiga para o teste.

Pretratamento de amostras não testadas:

1a. Swabs (rayon, nylon or flocado):
   i. Adicione 50 µL de Reagente de Pré-Tratamento reconstituído a um Tubo de Tampão de amostra rotulado;
   ii. Coloque a amostra de swab no tubo do tampão de amostra. Corte o eixo do swab para garantir que a amostra se encaixa no tubo. Elua a amostra misturando no vórtex por 45-60 segundos. A amostra tratada e eluída pode ser mantida a temperatura ambiente (21-30ºC) por até 48 horas ou refrigerada (2-8ºC) por até 7 dias antes do teste;
   iii. Transfira 50 µL do meio para um tubo e tampa de Controle de Ensaio/Controle Negativo rotulado.

1b. Meio ESwab:
   i. Misture no vórtex o tubo ESwab contendo a amostra de swab durante um mínimo de 10 segundos para eluir a amostra;
   ii. Transfira 500 µL de meio ESwab inoculado com a amostra do paciente para um tubo vazio;
   iii. Adicione 50 µL de Reagente de Pré-tratamento reconstituído ao tubo e vortex por 10-15 segundos para misturar o conteúdo. A amostra tratada não deve ser armazenada além do tempo de espera de amostra eluída original descrito no passo 1 da seção de PREPARAÇÃO DE AMOSTRA acima;
   iv. Transfira 25 µL do meio para um tubo e tampa de Controle de Ensaio/Controle Negativo rotulado.

2. Complete as Etapas 2-5 da seção PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS e prossiga para o teste.

CONTROLE DE QUALIDADE

Este teste deve ser executado com adesão às Normas Regulatórias e outras exigências de Acreditação aplicáveis para sua região.

1. Cada Dispositivo de Teste contém um poço de controle interno, que provê o controle da atividade inibitória da amplificação, reagentes do ensaio e efetividade do processamento da amostra;
2. O passo de tratamento térmico da amostra é monitorado pelo cronômetro e termômetro externo. Use o recurso de memória do termômetro (Max/Min) para assegurar-se de que a temperatura de 95 ± 5°C é mantida. Use a função "timer" ou "temporizador" do cronômetro para assegurar-se de que o tempo de duração do tratamento térmico do ensaio seja de 10 ± 2 minutos;
3. As Boas Práticas de Laboratório recomenda o emprego de Controles. Providencie a aderência às Normas Regulatórias exigidas em sua localidade no uso de Controles Externos para testar o desempenho do kit;
4. O Kit de Controle Externo Alethia Pertussis (Catálogo #479930) é fornecido separadamente. É recomendado que a reatividade de cada novo lote de reagentes Alethia Pertussis e cada nova remessa seja verificada ao recebimento e antes do uso. O uso do Controle Externo deve ser aplicado de acordo com a Legislação vigente na sua localidade. O kit de teste Alethia Pertussis não deve ser empregado para laudar amostras de pacientes caso não se obtenham os resultados corretos com os controles externos;
5. Cada reagente do controle externo deve ser usado com um Dispositivo de Teste em separado.

VALORES ESPERADOS

A incidência global de *B. pertussis*, tal como detectada pelo ensaio Alethia Pertussis, coletados prospectivamente e retrospectivamente, de amostras não selecionadas (todas as participantes) durante o período deste estudo foi de 8,2% (57/692).

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

1. O ensaio Alethia Pertussis visa o elemento de inserção IS481 do genoma de Bordetella. O elemento de inserção IS481 está presente em *B. pertussis, B. holmesii* e algumas cepas de *B. bronchiseptica*;
2. Este produto só pode ser usado com o equipamento Alethia*;*
3. O ensaio de DNA Alethia Pertussis é um ensaio qualitativo e não fornece valores quantitativos ou informações sobre a carga do organismo;
4. Este dispositivo não foi avaliado para monitorar o tratamento de infecções por *B. pertussis*;
5. Este teste não foi avaliado para amostras que não sejam amostras de swab nasofaríngeos, para indivíduos imunocomprometidos ou de pacientes que não são suspeitos de infecção por *B. pertussis*;
6. Os resultados deste teste devem estar correlacionados com a história clínica, dados epidemiológicos e quaisquer outros dados disponíveis para o médico;
7. A prevalência de *B. pertussis* afetará os valores preditivos positivos e negativos para o ensaio;
8. *B. parapertussis* que provoca uma doença semelhante a pertussis não é detectada pelo ensaio de DNA Alethia Pertussis. A doença causada por *B. parapertussis* é geralmente mais suave do que a doença causada por *B. pertussis* porque as bactérias não produzem toxina pertussis;
9. As infecções respiratórias podem ser causadas por *B. pertussis* e outros agentes patogênicos. Resultados positivos não impedem a coinfecção com outros agentes patogênicos respiratórios. Os resultados falso-negativos de *B. pertussis* são mais prováveis se os pacientes forem testados mais tarde no curso da doença (mais de duas semanas após o início dos sintomas), devido ao declínio do DNA de Bordetella. Resultados falsos negativos também podem ser aumentados em pacientes tratados com antibióticos;
10. A contaminação ambiental de uma sala de exame de um paciente anterior ou uma administração recente de vacinação contra a conqueluche pode resultar em resultados de testes falsos positivos.
11. A detecção de ácido nucleico depende da coleta, manuseio, transporte, armazenamento e preparação adequados da amostra. O não cumprimento do procedimento adequado em qualquer uma dessas etapas pode levar a resultados incorretos;
12. Os ácidos nucleicos do organismo podem persistir *in vivo*, independentemente da viabilidade do organismo. O ensaio Alethia Pertussis não faz distinção entre organismos viáveis e não viáveis.
13. Tal como acontece com todos os testes de diagnóstico baseados em moléculas, (A) Podem ocorrer resultados falsos negativos a partir da presença de inibidores, erro técnico, mistura de amostras ou baixo número de organismos na amostra clínica; (B) Podem ocorrer falsos resultados positivos a partir da presença de contaminação cruzada por organismos alvo, seus ácidos nucleicos ou produto amplificado e de sinais não específicos.
14. O ácido acetil salicílico, como encontrado na aspirina, produziu resultados inválidos quando testados em concentrações acima de 5 mg/mL durante o teste de replicação de Limite de Detecção BAA-589 de *B. pertussis*.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

O ensaio de amplificação de DNA Alethia Pertussis foi avaliado de dezembro de 2012 a julho de 2013 por locais de testes clínicos independentes que representam regiões geograficamente distintas em todo os Estados Unidos. Um total de 729 amostras de swab nasofaríngeos qualificados coletados de pacientes suspeitos de infecção respiratória por *B. pertussis* foram avaliados com o dispositivo de teste para estabelecer características de desempenho. As amostras eram sobressalentes e desidentificadas que haviam sido previamente submetidos ao teste de *B. pertussis* de rotina. As amostras incluídas na avaliação do desempenho foram prospectivas (nunca congeladas) e retrospectivas (congeladas antes do teste Alethia). A população retrospectiva incluiu não selecionados (todas as submissões) e amostras selecionadas.

O desempenho Alethia Pertussis foi comparado a um Método de Referência Composta que incluiu dois ensaios de PCR em tempo real (PCR1 e PCR2) com alvo em IS481, validados pelo fabricante, seguidos de sequenciamento bidirecional de amplicon a partir de amostras PCR positivas.

Os protocolos de ensaio PCR1 e PCR2 incluíram 40 ciclos de amplificação. A sequenciação bidirecional foi realizada para todas as amostras produzindo amplicon antes do final da amplificação de 40 ciclos. As amostras foram consideradas positivas quando os resultados da sequenciação bidirecional de ambos os ensaios de PCR comparados confirmaram a presença de amplicon *B. pertussis*. As amostras foram consideradas negativas quando nenhum dos dois ensaios comparativos de PCR produziu amplicon no final da amplificação de 40 ciclos.

Um total de 508 (69,7%) prospectivo e 221 (30,3%) amostras retrospectivas foram testadas. Foram obtidos resultados inválidos para 13 amostras (1,8%); Duas amostras permaneceram inválidos após o teste de repetição. Duas amostras prospectivas e duas retrospectivas produziram resultados de PCR de comparação indeterminado. A Tabela 1 resume as características de desempenho Alethia.

Tabela 1. Desempenho de ensaio Alethia

Descrição da Amostra	Amostras Positivas			Amostras Negativas			Resultados Inválidos[b]
	Alethia vs. Comparativo	PPA[a]	95% CI	Alethia vs. Comparativo	NPA	95% CI	
Comparativo de Método Composto, Todas as Submissões							
Prospectivo	39/45	86.7%	73.8 – 93.7%	447/459	97.4%	95.5 – 98.5%	2 (13)
Retrospectivo	4/4	100.0%	51.0 – 100.0%	176/178	98.9%	96.0 – 99.7%	0
Total:	**43/49**	**87.8%**	**75.8 – 94.3%**	**623/637**	**97.8%**	**96.3 – 98.7%**	**2 (13)**
Comparativo de Método Composto, AmostrasSelecionadas							
Retrospectivo	19/21	**90.5%**	71.1 – 97.3%	14/16	**87.5%**	64.0 – 96.5%	0

[a] *Oito amostras produziram resultados* Alethia *falso-negativo quando comparados ao Método do Comparador Composto. Seis das oito amostras produziram níveis detectáveis de DNA entre 35 e 40 ciclos de amplificação do ensaio comparativo e foram confirmados positivos por sequenciamento bidirecional. Três dessas seis amostras deram resultados positivos em apenas um dos dois ensaios de comparação de PCR/Sequenciamento.*
[b] *11/13 amostras inválidas iniciais produziram resultados válidos após testes repetidos.*

Os resultados Alethia falso-negativo foram avaliados individualmente na conclusão dos testes clínicos. Os valores do limiar de ciclo (Ct) produzidos durante o ensaio de comparação foram superiores a 35 para um ou ambos os ensaios PCR/sequencial Bi-direcional para seis das oito amostras avaliadas. Os valores elevados de Ct nos ensaios de PCR podem indicar que estão presentes níveis baixos de DNA.[8] Os resultados Alethia falso-negativo e os dados correspondentes do Comparador Composto são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Amostras falsas-negativas Alethia, Resultados de Comparativos de Ensaio

Designação da Amostra	Status da Amostra	PCR1		PCR2	
		Valor Ct	Resultado Sequencial Bi-Direcional	Valor Ct	Resultado Sequencial Bi-Direcional
1-19	**Prospectivo**	**34.90**	**+**	**33.85**	**+**
1-29	Prospectivo	Negativo	N/A	37.69	+
1-259	**Prospectivo**	**34.07**	**+**	**35.09**	**+**
1-269	Prospectivo	35.72	+	Negativo	N/A
1-275	Prospectivo	Negativo	N/A	39.13	+
3-33	Prospectivo	39.28	+	35.80	+
4-710	Retrospectivo	36.87	+	36.06	+
4-712	Retrospectivo	37.44	+	38.41	+

As características de desempenho para o ensaio Alethia foram avaliadas de acordo com o centro de teste clínico. A Tabela 3 mostra características de desempenho pelo centro de Teste Clínico.

Tabela 3. Desempenho clínico do ensiao Alethia por local

Descrição da Amostra	Amostras Positivas			Amostras Negativas			Resultados Inválidos[b]
	Alethia vs. Comparativo	PPA	95% CI	Alethia vs. Comparativo	NPA	95% CI	
Comparativo de Método Composto, Todas as Submissões							
Local 1	35/40	**87.5%**	73.9 – 94.5%	440/450	**97.8%**	96.0 – 98.8%	2 (13)
Local 2	4/4	**100.0%**	51.0 – 100.0%	67/69	**97.1%**	90.0 – 99.2%	0 (2)
Local 3	0/1	**0.0%**	0.0 – 79.3%	7/7	**100.0%**	64.6 – 100.0%	0 (0)
Local 4	4/4	**100.0%**	51.0 – 100.0%	109/111	**98.2%**	93.7 – 99.5%	0 (0)
Comparativo de Método Composto, AmostrasSelecionadas							
Local 1	**15/15**	**100.0%**	79.6% - 100.0%	**6/8**	**75.0%**	40.9 – 92.9%	0 (0)
Local 4	**4/6**	**66.7%**	30.0 – 90.3%	**8/8**	**100.0%**	67.6 – 100.0%	0 (0)

Estudos clínicos foram conduzidos com múltiplas amostras de swabs nasofaríngeos e tipos de tampão de eluição da amostra. Os tampões de amostras testados durante os estudos clínicos incluíram solução salina a 0,85% (n=30 ou 4,1%), Tris EDTA (n=8 ou 1,1%) e Água Ultra Pura (n=687 ou 94,2%). Todos os tampões de amostra foram utilizados em volumes de 0,5 mL. Estudos analíticos foram realizados com salina a 0,85%, Tris EDTA, solução Tampão salina com fosfato (PBS) e Água Ultra Pura. Estudos analíticos estabeleceram equivalência entre todos os tipos de tampão de eluição da amostra.

A informação da idade era conhecida por 723 (99,2%) dos pacientes dos quais as amostras foram testadas. A idade do paciente variou de 1 mês a 88 anos. Trinta e oito (5,2%) pacientes tinham menos de 1 ano de idade; 13 (1,8%) tinham entre 1 e 2 anos de idade; 296 (40,6%) foram entre 2 e até 12 anos, 157 (21,5%) foram entre 12 e 21 anos, 190 (26,0%) foram acima de 21, mas abaixo de 65 anos, e os restantes 29 (4,0%) pacientes tinham mais de 65 anos de idade.

A população estudada incluiu 413 (56,7%) pacientes do sexo feminino e 308 (42,2%) pacientes do sexo masculino. O gênero era desconhecido para 8 (1,1%) pacientes incluídos no estudo. Não há expectativa de que as características de desempenho do ensaio Alethia Pertussis sejam influenciadas pelo gênero do paciente.

Estudos Usando Reagente Pré-tratado
O uso do Reagente de Pré-tratamento foi avaliado em estudos externos realizados de abril a junho de 2015 em quatro locais de teste selecionados com amostras coletadas prospectivamente de pacientes sintomáticos. Das 164 amostras coletadas para este estudo, 145 atendiam os critérios do estudo. A maioria das amostras submetidas aos locais de teste foram coletadas com swabs com ponta de rayon; uma amostra foi coletada com um swab de nylon flocado e três amostras com um swab de poliéster. A maioria das amostras foram testadas no mesmo dia da coleta. As amostras coletadas foram testadas imediatamente após a coleta, primeiro usando o método de teste predicado, com verificação de todos os resultados inválidos. Após o teste com o método predicado, as mesmas amostras foram então tratadas com o Reagente de Pré-tratamento e testadas após o pré-tratamento com qualquer resultado inválido novamente. Todo o teste predicado, inválido e pré-tratamento foi concluído dentro de um período de 24 horas. Das 19 amostras que produziram resultados de teste inválidos pelo método predicado, 15 foram inválidos de forma repetida na verificação novamente; Três foram negativos e um positivo no reteste. Após a adição de Reagente de pré-tratamento, as 19 amostras que inicialmente deram resultados inválidos produziram 17 resultados negativos e dois positivos. Seis amostras deram um resultado com o método predicado, mas produziram um resultado inválido após o tratamento com o Reagente de pré-tratamento. Os dados são apresentados na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Método de Comparação: Reagente de Pré-tratamento versus Método Predicado (sem Reagente de Pré-tratamento)

	Acordo de Percentual)dos Locais de Teste (Amostras no acordo/Total Testadp)				
	Local 1	Local 2*	Local 3	Local 4	Total
PPA	87.5% (6/7) (CI: 48.7-97.4%)	0% (0/0)	100% (2/2) (CI: 34.2-100%)	100% (6/6) (CI: 61.8-100%)	93.3% (14/15) (CI: 70.2-98.8%)
NPA	94.3% (50/53) (CI: 84.6-98.1%)	93.3% (14/15) (CI: 70.2-98.8%)	100% (15/15) (CI: 79.6-100%)	100% (26/26) (CI: 87.1-100%)	96.3% (105/109) (CI: 90.9-98.6%)
Taxa Inválida Inicial sem Reagente de Pré-Tratamento	1.6% (1/63)	0% (0/16)	37.0% (10/27)	20.5% (8/39)	13.1% (19/145)
Taxa Inválida Inicial com Reagente de Pré-Tratamento	4.8% (3/63)	6.25% (1/16)	3.7% (1/27)	2.6% (1/39)	4.1% (6/145)

***** Os dados do Local 2 representam dados de primeira passagem apenas quando este local não testou novamente amostras não tratadas INVÁLIDAS, conforme exigido pela instrução de uso, e antes de tratar amostras INVÁLIDAS com Reagente de pré-tratamento. Todos os outros locais repetiram amostras de teste inválidas antes de pré-tratar amostras.

SENSIBILIDADE ANALÍTICA
A sensibilidade analítica ou Limite de Detecção para o ensaio Alethia Pertussis foi determinada para a cepa de *B. pertussis* ATCC BAA-589, Tahoma I.

O limite de detecção foi determinado usando 60 réplicas de cepa *B. pertussis* ATCC BAA-589 e uma probabilidade declarada (por exemplo, 95%, onde 57/60 repetições são positivas) de obter respostas positivas. O teste analítico de sensibilidade está resumido abaixo.

Descreção da Cepa *B. pertussis*	UFC/mL	UFC/Teste
ATCC BAA-589 (Tahoma I)	3265	1.48

REATIVIDADE DO ENSAIO
As seguintes cepas de *B. pertussis* foram testadas e produziram reações positivas a 3265 UFC/mL ou 1,48 UFC/Teste com Alethia Pertussis: ATCC 12743; ATCC 8478; ATCC 8467; ATCC 9797; ATCC 53894; ATCC 10380; ATCC 12742; e A639. As seguintes cepas de *B. pertussis* foram testadas e produziram reações positivas a 3500 UFC/mL ou 1,59 UFC/teste com Alethia Pertussis: ATCC 51445 e ATCC BAA-1335.

REPRODUTIBILIDADE
Estudos de reprodutibilidade foram desenvolvidos em três dos quatro centros clínicos participantes. Painéis cegos codificados com 10 amostras foram fornecidos para os laboratórios participantes. As amostras foram ordenadas aleatoriamente em cada painel para mascarar a identidade das amostras. Os painéis incluíram amostras artificiais fabricadas como amostras positivas moderadas (1,31 x 10^4 UFC/mL ou 6 UFC/teste), amostras positivas baixas (4,89 x 10^3 UFC/mL ou 2 UFC/teste); e amostras negativas altas (8.2 UFC/mL ou 0.004 UFC/teste). O painel também incluiu uma amostra negativa, controle positivo e controle negativo. O teste foi realizado por diferentes operadores em cada centro no mesmo dia (variabilidade intra-ensaio) durante cinco dias (variabilidade inter-ensaio). Foram utilizados três lotes de Alethia Pertussis e seis instrumentos Alethia neste estudo. Os controles positivos e negativos foram testados todos os dias de testes. Os resultados são fornecidos na tabela abaixo:

Tipo de Amostra	Local 1		Local 2		Local 4		Total	
	Percentual de concordância		Percentual de concordância		Percentual de concordância		Percentual de concordância	
Positivo Moderado	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Baixo Positivo	27/30	90.0%	29/30	96.7%	30/30	100.0%	86/90	95.6%
Alto Negativo	26/30	86.7%	23/30	76.7%	29/30	96.7%	78/90	86.7%
Negativo	10/10	100.0%	9/10	90.0%	10/10	100.0%	29/30	96.7%
Controle Negativo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Controle Positivo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

ESTUDOS DE REAÇÃO CRUZADA
Estudos de reatividade cruzada foram realizados com amostras de lavagem nasais positivas e negativas inoculadas com organismos bacterianos ou fúngicos até uma concentração final de 1,0 x 10^6 UFC/mL ou vírus com um mínimo de 1,0 x 10^5 $TCID_{50}$/mL. Nenhum dos seguintes organismos reagiu com Alethia Pertussis: *Acinetobacter baumannii, Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter lwoffii, Actinomyces odontolyticus, Arcanobacterium haemolyticum, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Bordetella avium, Bordetella hinzii, Bordetella parapertussis, Bordetella petrii, Bordetella trematum, Burkholderia cepacia, Candida albicans, Candida glabrata, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Citrobacter freundii, Clostridium difficile, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium pseudodiphtheriticum, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum, Haemophilus influenzae, Haemophilus parainfluenzae, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Legionella jordanis, Legionella longbeachae, Legionella micdadei, Legionella pneumophila, Listeria monocytogenes, Moraxella catarrhalis, Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria cinerea, Neisseria elongata, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Nocardia asteroides, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Serratia liquefaciens, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Stenotrophomonas maltophilia, Streptococcus anginosus* (Grupo F), *Streptococcus bovis* (Grupo D), *Streptococcus canis* (Grupo G), *Streptococcus dysgalactiae ssp. dysgalactiae, Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis Streptococcus intermedius, Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius, Streptococcus suis, Ureaplasma urealyticum*, Adenovírus, Coronavírus, Coxsackievirus, Citomegalovírus, vírus Epstein Barr, vírus Herpes Simplex 1, vírus Herpes Simplex 2, Metapneumovírus humano, Influenza A, Influenza B, vírus do sarampo, vírus da caxumba, vírus da Parainfluenza 1, vírus da Parainfluenza 2, vírus da Parainfluenza 3, vírus Respiratório sincicial A, vírus sincitial respiratório B, rinovírus.

Cepa de *B. Bronchiseptica* 4617 e *B. holmesii* foram testadas a 1,0 x 10^6 UFC/mL e reagiram com o ensaio Alethia Pertussis.

Resultados inesperados foram observados durante o teste original de amostras contendo *B. hinzii, H. parainfluenzae* e *M. genitalium*. Uma das três repetições de amostras negativas contendo *B. hinzii* produziu um resultado falso positivo que não foi confirmado com testes adicionais (20/20 repetições). Três das três repetições de amostras negativas contendo *H. parainfluenzae* produziram resultados falso-positivos que não foram confirmados com testes adicionais (20/20 repetições). Três das três repetições de amostras positivas de *B. pertussis* produziram resultados inválidos que não foram confirmados com testes adicionais (10/10 repetições). Três das três repetições de amostras negativas contendo *M. genitalium* produziram resultados inválidos que não foram confirmados com testes adicionais (10/10 repetições). Como o teste repetido usando um número elevado de repetições não confirmou os resultados originais, *B. hinzii, H. parainfluenzae* e *M. genitalium* não são considerados reativos cruzados ou interferentes no teste Alethia Pertussis.

TESTE DE SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES
As seguintes substâncias químicas, nas concentrações especificadas de solvente/diluente, não interferem nos resultados do teste: Acetaminofeno (10 mg mL), Advil® [ibuprofeno (10 mg/mL)], Afrin® Descongestionante Nasal Spray [Oxymetazoline hydrochloride (0.0005% p/v)], Sulfato de Albuterol [sulfato de salbutamol (1% p/v)], aspirina (5mg/mL), Coricidin® HBP Comprimidos para resfriado/gripe [Acetaminofeno (3.26 mg/mL), maleato de clorfeniramina (0,02 mg/ml)], Difenhidramina HCl (0,25 mg/mL), Eritromicina (2% p/v), Mupirocina (2% p/v), Gelatina de Petróleo [vaselina branca (1% p/v)], Xarope Robitussin® para Tosse + Congestão no peito DM [dextromethorphan HBr (0,1 mg/mL), Guaifenesin (1,0 mg/mL)], PE de supedrina [HCl de fenilefrina (0,3 mg/mL)],

spray salino nasal [cloreto de sódio (0,0065% p/v)], Tobacco Smokeless (tabaco) (1% p/v), Tobramicina (0,6 mg/mL), Vicks® VaporRub® [cânfora (0,48% p/v), óleo de eucalipto (0,12% p/v), mentol (0,26 % w/v)].

O ibuprofeno (10 mg/mL) produziu resultados inválidos (3/6 repetições) durante o teste original de amostras artificiais de *B. pertussis*. Todos os testes repetidos produziram resultados positivos (10/10 repetições). Como os resultados originais não foram confirmados, o ibuprofeno (10 mg/mL) não é considerado uma substância interferente.

Verificou-se que a aspirina interfere com o ensaio Alethia Pertussis em concentrações superiores a 5 mg/mL.

As seguintes substâncias biológicas, nas concentrações especificadas de solvente/diluente saturado, não interferem nos resultados do teste: DNA humano (200 ng/µL), Mucina [glândula submaxilar bovina tipo IS (1% p/v)], sangue total (1% w/v).

REFERÊNCIAS

1. Nagamine K, Hase T, Notoni T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifications using loop primers. Mol Cell Probes 2002; 16:223-29.
2. Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notoni T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantitating template DNA. J Biochem Biophys 2004; 59:145-47.
3. Centers for Disease Control and Prevention. 2005 CDC Guidelines: Recommended Antimicrobial Agents for the Treatment and Postexposure Prophylaxis of Pertussis. 2005; 54(RR14); 1-16.
4. Centers for Disease Control and Prevention. 2012 Final Pertussis Surveillance Report. 2013; 61(52).
5. Klein NP, et al. Waning Protection after Fifth Dose of Acellular Pertussis Vaccine in Children. N Engl J Med 2012; 367: 1012-1019.
6. Misegades LK, et al. Association of Childhood Pertussis with Receipt of 5 Doses of Pertussis Vaccine by Time Since Last Vaccine Dose, California, 2010. JAMA 2012; 308(20): 2126-2132.
7. Andre P, et al. Comparison of Serological and Real-Time PCR Assays to Diagnose Bordetella pertussis Infection in 2007. J Clin Micro 2008; 46(5): 1672-1677.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Best Practices for Health Care Professionals on the use of Polymerase Chain Reaction (PCR) for Diagnosing Pertussis.
9. US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.
10. CLSI: MM3-A2 Molecular diagnostic methods for infectious disease; approved guideline, 2nd ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2006.
11. Tatti, K., Sparks, K., Boney, K., Tondella, M. Novel Multitarget Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of *Bordetella* Species in Clinical Specimens. J Clin Micro 2011; 49:4059-4066.

ALERTA AO USUÁRIO

Observar a correlação da versão indicada nas Instruções de Uso com o produto adquirido, conforme disponibilizado pelo fabricante.
Entrar em contato com o distribuidor no Brasil se desejar receber as Instruções de Uso em formato impresso sem custo adicional.

GARANTIA

Garantimos que os produtos atendem as especificações e estão livres de não conformidades. Nossa responsabilidade será limitada a substituição ou reembolso de qualquer montante que não exceda o preço de compra imputável aos produtos.

SN11025 **REV. 10/18**

Fabricado por:
Meridian Bioscience, Inc.
USA/Corporate Office
3471 River Hills Drive, Cincinnati, Ohio, 45244, USA

Importado por:
Enzytec Biotecnologia LTDA
Rua Desembargador Jorge Fontana, n° 80, 1007/1008,
Belvedere, Belo Horizonte – MG, 30320-670
CNPJ: 07.214.566/0001-65
Resp. Téc.: Márcio Henrique Lacerda Arndt – CRBIO 37928/04-D
Telefone: (31) 3658-6703
Website: enzytec.com
Atendimento ao cliente: sac@enzytec.com
Registro MS: 82444370014

USO DE SÍMBOLOS

Você verá um ou mais destes símbolos nos rótulos/embalagens deste produto:

Tabela de símbolos

	Data de expiração	CONTROL +	Controle Positivo
LOT	Número do Lote	CONTROL −	Controle negativo
IVD	Uso *IN VITRO* somente	EC REP	Representante autorizado para a Comunidade Europeia
CE	Este produto obedece ás Diretivas 98/79/EC para dispositivos destinados a ensaios *in vitro*	SMP PREP DIL SPE	Dispositivo de Preparo de Amostra contendo Diluente de Amostra
		STERILE R	Esterilização por Radiação Gama
REF	Referência ao Número de Catálogo do produto		Não congelar
	Consulte instruções para o uso do produto	RoHS	Restrição ao uso de substâncias tóxicas
	Fabricante		Cuidado! Consulte a documentação que acompanha este kit
SN	Número de Série	STERILE EO	Esterilização por Óxido de Etileno
Σ	Contém reagentes suficientes para < n > testes	BUF RXN	Tampão de reação
	Limite de temperatura do kit		Marca registrada nacional ETL
	Feminino		Reciclar – Não dispensar como resíduo comum
	Produto com uso único		
TEST	Dispositivo do teste	HT TUBE	Tubo de tratamento térmico
	Data de fabricação		Para uso em IVD / avaliação de desempenho
	Radiação LASER – Evitar exposição		Superfície quente, mantenha as mãos longe de superfícies quentes
CAUTION	CUIDADO! Radiação LASER quando em funcionamento Produto LASER Classe II	IPX-0	Atenção! Mantenha protegido do contato com água.
	Atenção! Risco / Periculosidade	CONTROL	Controle do ensaio
BUF	Tampão do ensaio		Cuidado! Atenção!
MIN OIL	Óleo mineral	MEDIA	Meio de transporte
ST TUBE	Tubo com tampa rosqueada	COL	Coluna de preparação
BUF SMP	Tampão de amostra	PRE REAG	Reagente de pré tratamento
Rx Only	Atenção! – Leis federais americanas restringem o uso deste kit e sua venda ou pedidos a instituições de análise de saúde / diagnóstico somente	SMP PREP	Preparação de amostra
TUBE	Tubo vazio		