

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Bordetella
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Denne brugsanvisning gælder for følgende reference:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERENCE
VIASURE <i>Bordetella</i> Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444204 / VS-BDT124

Table A 1. Reference for product to be used with the BD MAX™ System. / Reference til produkt, der skal bruges med BD MAX™ System.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Brugsanvisningen er på engelsk/spansk og inkluderet i sættet.

EN For download IFUs from other languages, please enter in **certest.es/viasure/labeling**. Once you be there, follow the instructions for access to the language that you need. If you need additional information, please contact: viasure@certest.es.

ES Para descargar las IFUS en otros idiomas, por favor, entre en **certest.es/viasure/labeling**. Una vez esté allí, siga las instrucciones para acceder al idioma que necesite. Si necesita información adicional, contacte: viasure@certest.es.

DA For at downloade IFUS fra andre sprog, skal du gå ind på **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, skal du følge instruktionerne for at få adgang til det sprog, du har brug for. Hvis du har brug for yderligere oplysninger, bedes du kontakte: viasure@certest.es.

DE Um den IFUS in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu **certest.es/viasure/labeling**. Wenn Sie dort sind, folgen Sie den Anweisungen, um auf die gewünschte Sprache zuzugreifen. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich an: viasure@certest.es.

FR Pour télécharger l'IFUS dans d'autres langues, veuillez vous rendre sur **certest.es/viasure/labeling**. Une fois sur place, suivez les instructions pour accéder à la langue dont vous avez besoin. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, contactez: viasure@certest.es.

IT Per scaricare l'IFUS in altre lingue, vai su **certest.es/viasure/labeling**. Una volta che sei lì, segui le istruzioni per accedere alla lingua di cui hai bisogno. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta: viasure@certest.es.

NO For å laste ned IFUS fra andre språk, vennligst skriv inn i **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, følg instruksjonene for tilgang til språket du trenger. Hvis du trenger ytterligere informasjon, vennligst kontakt: viasure@certest.es.

PT Para baixar o IFUS em outros idiomas europeus, acesse **certest.es/viasure/labeling**. Uma vez lá, siga as instruções para acessar o idioma que você precisa. Se você precisar de informações adicionais, entre em contato: viasure@certest.es.

SV För att ladda ner IFUS från andra språk, vänligen gå in på **certest.es/viasure/labeling**. När du är där följer du instruktionerna för att få tillgång till det språk du behöver. Om du behöver ytterligare information kan du kontakta: viasure@certest.es.

TR IFUS'u diğer dillerden indirmek için lütfen **certest.es/viasure/labeling** adresine girin. Oraya girdikten sonra, lütfen ihtiyacınız olan dile erişim için talimatları takip edin. Daha fazla bilgiye ihtiyacınız varsa, lütfen viasure@certest.es adresinden iletişime geçin.

Contact viasure@certest.es if your language is not on the list / Kontakt viasure@certest.es, hvis dit sprog ikke er med på listen..

Note: The user should notify the manufacturer and the competent authority of the Member State in which he is established as a user and/or patient of any serious incident related to the product.

Bemærk: Brugeren skal underrette fabrikanten og den kompetente myndighed i landet, hvor den pågældende er bosiddende som bruger og/eller patient, om enhver alvorlig hændelse i forbindelse med produktet.

Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	5
4.	Reagents provided	6
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	6
6.	Transport and storage conditions.....	7
7.	Precautions for users	7
8.	Test procedure	8
8.1.	Sample collection, storage and transport.....	8
8.2.	Sample preparation and DNA extraction	8
8.3.	PCR protocol	9
9.	Result interpretation	12
10.	Limitations of the test	14
11.	Quality control	15
12.	Performance characteristics.....	15
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	15
12.2.	Analytical sensitivity	16
12.3.	Analytical specificity	18
12.4.	Analytical reactivity	18

Indhold

1.	Anvendelsesformål	19
2.	Oversigt og forklaring.....	19
3.	Procedurens princip.....	19
4.	Leverede reagenser	20
5.	Reagenser og udstyr, der skal leveres af brugeren	20
6.	Transport- og opbevaringsforhold.....	21
7.	Særlige forholdsregler for brugere	21
8.	Analysemetode.....	22
8.1.	Prøveindsamling, opbevaring og transport.....	22
8.2.	Prøveklargøring og DNA-ekstraktion	22
8.3.	PCR-protokol.....	23

9.	Tolkning af resultater	26
10.	Begrænsninger i testen.....	28
11.	Kvalitetskontrol.....	29
12.	Ydelseskarakteristika	29
12.1.	Klinisk sensitivitet og specificitet	29
12.2.	Analytisk sensitivitet	30
12.3.	Analytisk specificitet.....	32
12.4.	Analytisk reaktivitet	32
	Bibliography/ Bibliografi.....	33
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboler for IVD-komponenter og -reagenser.....	33
	Trademarks.....	33

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated real-time PCR test designed for the qualitative detection and differentiation of DNA from *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and/or *Bordetella holmesii* in respiratory samples (nasopharyngeal swabs and nasopharyngeal aspirates) from patients suspected of respiratory infection by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used as an aid in the identification of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and/or *Bordetella holmesii*, in combination with patient's clinical signs and symptoms and epidemiological risk factors. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of DNA and subsequent real-time PCR, employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. DNA is extracted from respiratory samples, amplified using real-time PCR, and detected with fluorescent reporter dye probes specific for *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella holmesii*.

2. Summary and Explanation

The genus *Bordetella* is comprised of 8 species, 4 of which are known to infect humans: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*, and *B. bronchiseptica*. The most important cause for whooping cough (pertussis) is *B. pertussis* infection, followed by *B. parapertussis*. *B. holmesii* has been isolated from patients with a serious underlying disease, whereas *B. bronchiseptica* is usually restricted to animals but occasionally has also been isolated from immunocompromised patients.

Whooping cough is a very contagious disease which spreads from person to person usually by coughing or sneezing, or by close contact with an infected person in a common breathing space. The clinical course of the illness is divided into three stages, which include the following clinical features: catarrhal (coryza, low-grade fever, mild and occasional cough), paroxysmal (paroxysms of numerous and rapid coughs, cyanosis, vomiting and exhaustion) and convalescent (gradual recovery and less persistent paroxysmal coughs).

Despite vaccination, pertussis remains endemic in most areas of the world. Reliable diagnosis is required to start appropriate treatment and prophylaxis of contacts if needed, particularly unvaccinated infants in whom pertussis might present as a life-threatening disease. Nucleic acid amplification tests, including PCR and more recently real-time PCR, overcome some of the limitations of culture and serological methods for the diagnosis of *Bordetella* infections. Most of the PCR tests are based on detection of insertion sequences (IS) present in multiple copies per genome, increasing the sensitivity of PCR tests.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the qualitative detection and differentiation of DNA from *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and/or *Bordetella holmesii* in respiratory samples. After DNA isolation, the identification of these strains of *Bordetella* is performed by the amplification of a conserved region of the insertion sequences IS481 for *Bordetella pertussis/holmesii*, pIS1001 for *Bordetella parapertussis* and hIS1001 for *Bordetella holmesii*, using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence is measured on the BD MAX™ System.

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains in each tube all the components necessary for real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i>	475/520	IS481 sequence
<i>B. holmesii</i>	585/630	hIS1001 sequence
<i>B. parapertussis</i>	630/665	pIS1001 sequence
Internal control (IC)	530/565	-

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System includes the following materials and reagents detailed in Table 2:

Reagent/Material	Description	Barcode	Amount
<i>Bordetella</i> reaction tube	A mix of enzymes, primers-probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	1C foil	2 pouches of 12 transparent tubes
Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	11 foil	1 pouch of 24 transparent tubes

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°. VS-BDT124 (444204).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 or 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).
- Nuclease-free water.
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- After opening the aluminum pouches which contain the reaction tubes, the product can be used up to 28 days.

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health care professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, or any additional reagents required for testing and the BD MAX™ System are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges (BD MAX™ PCR Cartridge).
- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles, and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.

- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. Sample collection, storage and transport

The VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been tested on respiratory samples (nasopharyngeal swabs and aspirates). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage, and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The nasopharyngeal aspirates should be transported at 2-8 °C for up to 72 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 72 hours), we recommend shipping at -20°C or lower. However, nasopharyngeal swabs in Universal Transport media (UTM) should be transported frozen at -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2-8°C for up to 72 hours (nasopharyngeal aspirates) or frozen at -20°C or ideally at -70°C (in UTM) for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The respiratory samples must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (CDC's Infectious diseases laboratory test directory (2022). Website <https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/cdc-lab-tests.pdf>) and the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

If sputum samples are used, they can be tested according to recommendations cited below.

8.2. Sample preparation and DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations in the instructions for use of extraction kit used, BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipette 200 µL of sample into a BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

Note that application-specific extraction preparation procedures should be developed and validated by the user and that some other samples may require pre-processing. For example, sputum samples, add acetylcysteine (recommended N-Acetyl-L-cysteine Ref. A7250, Merck KGaA) to the sample at a 1:1 ratio (i.e. 250 µl of sputum and 250 µl of acetylcysteine 100 mg/ml), mix by vortexing and heat 95°C for 10 minutes. Pipette 200 µl of the pre-treated sputum into a BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR protocol

Note: Please, refer to the BD MAX™ System User's Manual for detailed instructions.

8.3.1. Creating PCR test program for VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Note: If you have already created the test for the VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the Basic Information tab, within the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE *Bordetella*.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to 350 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) If running software version 5.00 or higher and have barcoded foil snap-in tubes, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
 - a. Snap-In 2 Barcode: 1C (concerning *Bordetella* reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 Barcode: another VIASURE reaction tube (different foil) if you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1).
- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).

- a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	50	200	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	200	0	35
585/630 (ROX)	<i>B. holmesii</i>	50	200	0	40
630/665 (Cy5)	<i>B. parapertussis</i>	50	200	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	-	-	-	-

Table 3. PCR settings.

Note: It is recommended to set the minimum threshold values listed above for each channel as a starting point, but the final settings must be determined by the end-user during the result interpretation, in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

- 10) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 4), as well.

		False Receiving Channel				
Channel		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	1.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	2.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	3.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

- 11) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 5).

Step Name	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			41	63°C	✓

Table 5. PCR protocol.

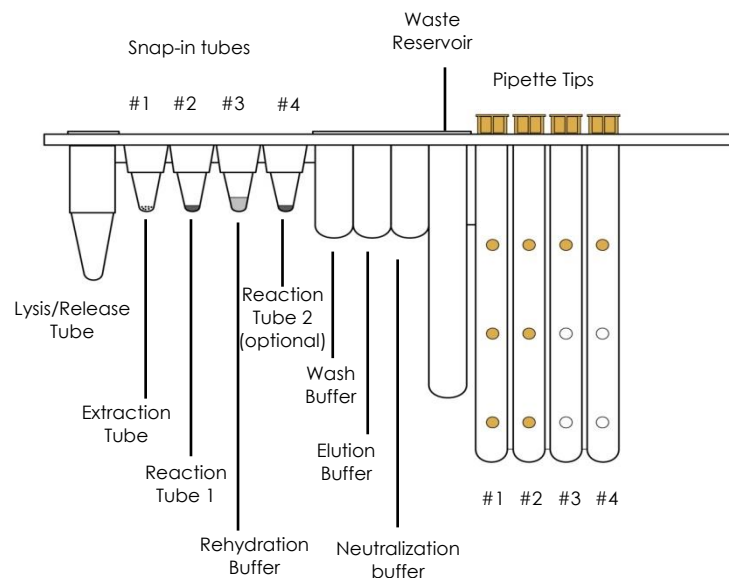
- 12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- Determine and separate the appropriate number of *Bordetella* reaction tubes (1C foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
 - Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.

- b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- i. Note: If you choose the format “Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Section 8.3.1), determine, and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (11 foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
- a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the “Work List” tab on the “Run” screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the “Test” drop down menu, select VIASURE *Bordetella* (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull-down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Work List, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Work List and click the “Save” button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).

- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

8.3.4. BD MAX™ report

- 1) In main menu, click the "Results" button.
- 2) Either double click on your run in the list or press the "view button".
- 3) Click on "Print", select: "Run Details, Test Details and Plot...".
- 4) Click on "Print or Export button" on the "Run Reports" screen.

9. Result interpretation

For a detailed description on how to analyze data, refer to the BD MAX™ System User's manual.

The analysis of the data is done by the BD MAX™ software according to the manufacturer's instructions. The BD MAX™ software reports Ct values and amplification curves for each detector channel of each sample tested in the following way:

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 3). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 6.

Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. In addition, check that there is no report of BD MAX™ System failure.

Results should be read and analyzed using the following table:

<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i> (475/520)	<i>B. holmesii</i> (585/630)	<i>B. parapertussis</i> (630/665)	Internal Control (530/565)	Interpretation
+	+	+	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> and/or <i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Detected ¹
-	-	-	+ ²	<i>B. pertussis</i> , <i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Not Detected ²
+	-	-	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> DNA Detected, <i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Not Detected ¹
+	+	-	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> and/or <i>B. holmesii</i> DNA Detected, <i>B. parapertussis</i> DNA Not Detected ¹
+	-	+	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Detected, <i>B. holmesii</i> DNA Not Detected ¹
-	+ ³	-	+/- ¹	<i>B. holmesii</i> DNA Detected, <i>B. pertussis</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Not Detected ¹
-	+ ³	+	+/- ¹	<i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Detected, <i>B. pertussis</i> DNA Not Detected ¹
-	-	+	+/- ¹	<i>B. parapertussis</i> DNA Detected, <i>B. pertussis</i> and <i>B. holmesii</i> DNA Not Detected ¹
-	-	-	- ²	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs. ²
IND	IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

1 A sample is considered positive if the Ct value obtained is ≤ 40. The Internal Control (IC) may or may not show an amplification signal. Sometimes, the IC detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 A sample is considered negative if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive (Ct ≤ 35). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control. In case of unresolved results (UNR), absence of internal control signal in negative sample it is recommended to repeat the assay following the indications below.

3 *B. holmesii* DNA is detected in two different channels, 475/520 (FAM) and 585/630 (ROX), but due to higher sensitivity of 585/630 (ROX) in positive samples around the LoD it is possible to obtain signal only in that channel.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user; to verify the correct performance of each PCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

NOTE: Sufficient volume is available for one repeat test from the Sample Buffer Tube. For prepared BD MAX™ Sample Buffer Tubes stored at 2–8 °C or 25°C, retesting must be performed within 24 hours.

The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated with nasopharyngeal swabs and nasopharyngeal aspirates. If sputum samples are used, they can be tested with the recommendations cited above.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; nucleic acid must be properly extracted from clinical samples.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Bordetella* suspicious samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for detection of the IS481, hIS1001 and pIS1001 sequences, used in VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, or other respiratory microorganisms, which might result in predictable false positive.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Degradation of the DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown *Bordetella* strains.
 - Organism levels in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable bacteria and does not imply that these bacteria are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of *Bordetella* targets sequences.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that infection by *B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii* is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- A negative result does not preclude the presence of *B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii* DNA in a clinical specimen. If clinical observations, patient history and epidemiological information suggest *B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii* infection, re-testing increasing sample volume should be considered.

- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

11. Quality control

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains an Internal Control (IC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using clinical and spiked nasopharyngeal swabs, and nasopharyngeal aspirates, already characterized as positive or negative for *B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii*. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	CerTest Biotec (Zaragoza, Spain)	Nasopharyngeal swabs (Cerba Xpert)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>B. pertussis</i>
2		Nasopharyngeal aspirates (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
3		Nasopharyngeal swabs and aspirates (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
4		Nasopharyngeal swabs (Eurofins)		<i>B. pertussis</i>
5		Nasopharyngeal swabs (Cerba Xpert + Eurofins + simulated samples)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>

Table 7. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, and specificity for VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
1	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	33	100	0	1	0.971 (0.84 – 0.99)	1 (0.96 – 1)
2	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	43	34	1	0	1 (0.91 – 1)	0.971 (0.85 – 0.99)
		<i>B. parapertussis</i>	28	48	0	2	0.933 (0.77-0.99)	1 (0.92-1)
	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	76	0	1	0.5 (0.01-0.98)	1 (0.95-1)
3	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	76	134	1	1	0.987 (0.93-1)	0.993 (0.95-1)
		<i>B. parapertussis</i>	28	182	0	2	0.933 (0.77-0.99)	1 (0.98-1)
		SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	210	0	1	0.5 (0.01-0.987)
4	Validated in-house mix pertussis/parapertussis assay	<i>B. pertussis</i>	43	54	0	3	0.935 (0.821-0.986)	1 (0.966-1)
5	Initial characterization*	<i>B. pertussis</i>	98	186	0	4	0.961 (0.903-0.989)	1 (0.980-1)
		<i>B. parapertussis</i>	12	276	0	0	1 (0.735-1)	1 (0.987-1)
		<i>B. holmesii</i>	20	268	0	0	1 (0.832-1)	1 (0.986-1)

Table 8. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity for VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

* Initial characterization includes SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) and validated in-house mix pertussis/parapertussis assay for *B. pertussis* and *B. parapertussis* detection, and SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm) for *B. holmesii* detection, in Cerba Xpert samples.

Results show high agreement to detect *B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii* using VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of 1.2 CFU/mL of sample for *B. pertussis*, 4×10^{-2} CFU/mL of sample for *B. holmesii*, and 12 CFU/mL of sample for *B. parapertussis*, with a positive rate of $\geq 95\%$, on nasopharyngeal swab samples.

Figure 1. Dilution series of *Bordetella pertussis* (7.07×10^4 - 7.07×10^{-3} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

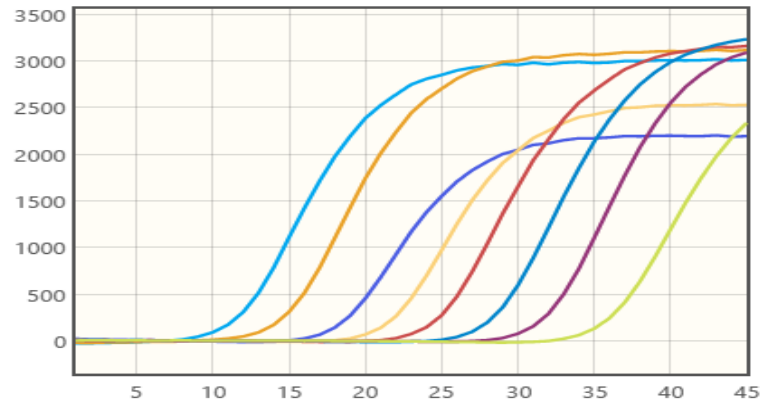


Figure 2. Dilution series of *Bordetella holmesii* (2.42×10^3 - 2.42×10^{-4} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

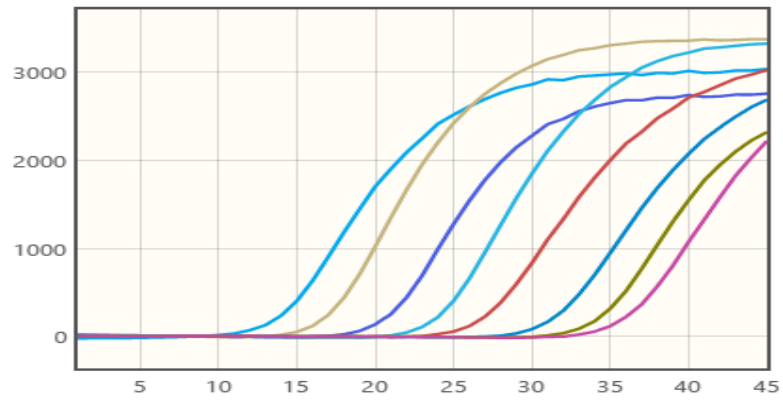


Figure 3. Dilution series of *Bordetella holmesii* (2.42×10^3 - 2.42×10^{-4} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

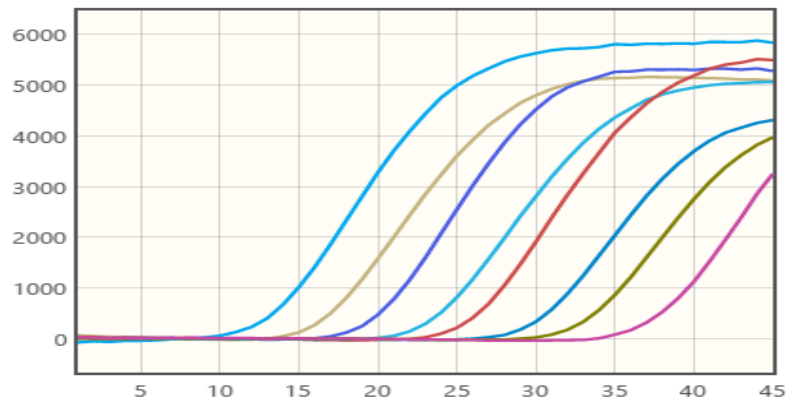
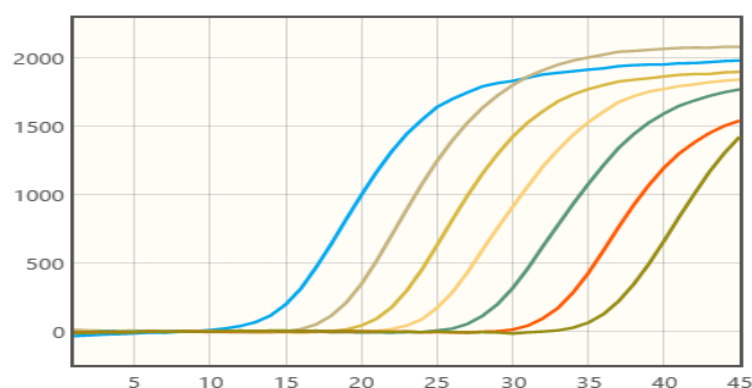


Figure 4. Dilution series of *Bordetella parapertussis* (7.07×10^4 - 7.07×10^{-2} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Bordetella* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms associated to respiratory diseases. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
Bocavirus	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> strain CM-1	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus (Clade 3C2a.1)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Human coronavirus 229E, OC43 and NL63	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Respiratory syncytial virus (RSV) types A and B	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	Human rhinovirus	-
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella bozemanii</i> serovar 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-		

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was evaluated against DNA extracted from *B. pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. holmesii* as templates, showing positive results.

DANSK

1. Anvendelsesformål

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er en automatiseret PCR-test i realtid, der er designet til kvalitativ påvisning og differentiering af DNA fra *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* og/eller *Bordetella holmesii* i respirationsprøver (nasofaryngeale podninger og nasofaryngeale aspirater) fra patienter, som ifølge deres læge (HCP) har en mulig luftvejsinfektion. Testen er beregnet til at blive anvendt som en hjælp til identifikation af *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* og/eller *Bordetella holmesii* og skal sammenholdes med patientens kliniske tegn og symptomer og epidemiologiske risikofaktorer. Analysen anvender BD MAX™ System til automatisk ekstraktion af DNA og efterfølgende realtids-PCR med anvendelse af de medfølgende reagenser kombineret med universelle reagenser og engangsartikler til BD MAX™ System. DNA ekstraheres fra respirationsprøver, forstærkes med realtids-PCR og påvises med fluorescensmærkede reporter-farveprober, der er specifikke for *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* og *Bordetella holmesii*.

2. Oversigt og forklaring

Slægten *Bordetella* består af 8 arter af hvilke 4 vides at kunne inficere mennesker: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* og *B. bronchiseptica*. Den vigtigste årsag til kighoste (pertussis) er infektion med *B. pertussis* efterfulgt af *B. parapertussis*. *B. holmesii* er blevet isoleret fra patienter med en alvorlig underliggende sygdom, mens *B. bronchiseptica* oftest er begrænset til dyr, men i nogle tilfælde også er blevet isoleret fra immunsvækkede patienter.

Kighoste er en meget smitsom sygdom, som normalt spredes fra person til person ved hoste eller nysen eller ved tæt kontakt med en smittet person i et fælles indåndingsrum. Sygdommens kliniske forløb er opdelt i tre stadier, som omfatter følgende kliniske træk: kataralsk (forkølelse, let feber, mild og lejlighedsvis hoste), paroxysmal (paroxysmer med talrige og hurtige hosteanfald, cyanose, opkastning og udmattelse) og rekonvalescens (gradvis bedring og mindre vedvarende paroxysmale hosteanfald).

På trods af vaccinerings, er pertussis endemisk i de fleste områder i verden. Pålidelig diagnosticering er påkrævet for at starte en passende behandling og profylakse hos kontakter, hvis det er nødvendigt, især uvaccinerede spædbørn, hos hvem kighoste kan være en livstruende sygdom. Nukleinsyreforstærkningstests, herunder PCR og den senere udviklede realtids-PCR, overvinder nogle af begrænsningerne i cellekultur- og serologiske metoder til diagnosticering af infektioner med *Bordetella*. De fleste PCR-tests er baseret på påvisning af insertionssekvenser (IS), der er til stede i et stort antal kopier pr. genom, hvilket øger PCR-testens sensitivitet.

3. Procedurens princip

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er designet til kvalitativ påvisning og differentiering af DNA fra *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* og/eller *Bordetella holmesii* i respirationsprøver. Efter DNA-isolering udføres identifikationen af disse stammer af *Bordetella* ved forstærkning af en konserveret region i insertionssekvenserne IS481 hos *Bordetella pertussis/holmesii*, pIS1001 hos *Bordetella parapertussis* og hIS1001 hos *Bordetella holmesii* ved brug af specifikke primere og en fluorescensmærket probe.

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit til BD MAX™ System er baseret på DNA-polymerasens 5' exonucleaseaktivitet. Under DNA-forstærkningen spalter dette enzym proben, som er bundet til den komplementære DNA-sekvens, og adskiller quencher-farvestoffet fra reporteren. Denne reaktion genererer en stigning i det fluorescerende signal, som er proportional med mængden på målsabelonen. Denne fluorescens måles af BD MAX™ System.

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System indholder alle de komponenter, der er nødvendige for PCR-analysen i realtid i hvert rør (specifikke primere/prober, dNTP'er, buffer, polymerase) i et stabiliseret format, såvel som en intern kontrol til monitorering af ekstraktionsprocessen og/eller hæmning af polymeraseaktiviteten.

Mål	Kanal	Gen
<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	475/520	IS481-sekvens
<i>B. holmesii</i>	585/630	hIS1001-sekvens
<i>B. parapertussis</i>	630/665	pIS1001-sekvens
Internal control (IC)	530/565	-

Tabel 10. Mål, kanal og gener.

4. Leverede reagenser

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System omfatter følgende materialer og reagenser, som er angivet i tabel 2:

Reagens/Materiale	Beskrivelse	Stregkode	Mængde
<i>Bordetella</i> reaction tube	En blanding af enzymer, primerprober, buffere, dNTP'er, stabilisatorer og interne kontroller i stabiliseret format	1C folie	2 poser med 12 transparente rør
Rehydration Buffer tube	Opløsning til rekonstitution af det stabiliserede produkt	11 folie	1 pose med 24 transparente rør

Tabel 11. Reagenser og materialer leveret i VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med kat. nr. VS-BDT124 (444204).

5. Reagenser og udstyr, der skal leveres af brugeren

Følgende angiver materialer og udstyr, der er nødvendige til brug, men ikke er inkluderet i VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Realtids-PCR-instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 eller 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- vortex.
- Mikropipetter (nøjagtighed mellem 2 og 1000 µl).
- Nukleasefrit vand.
- Filterspidser.
- Pulverfrie engangshandsker.

6. Transport- og opbevaringsforhold

- Sættene kan sendes og opbevares ved 2 - 40 °C, indtil den udløbsdato, der er angivet på etiketten.
- Efter åbning af aluminiumsposerne, der indeholder reaktionsrørene, kan produktet bruges i op til 28 dage.

7. Særlige forholdsregler for brugere

- Produktet er kun beregnet til brug af professionelle brugere, f.eks. laboratorie- eller sundhedspersonale og teknikere, der er uddannet i molekylærbiologiske teknikker.
- Til *in vitro*-diagnostisk brug.
- Brug ikke reagenser og/eller materialer, hvis udløbsdatoen er overskredet.
- Brug ikke sættet, hvis etiketten, der forsejler den ydre æske, er i stykker.
- Brug ikke reagenser, hvis beskyttelsesæskan er åben eller i stykker ved ankomsten.
- Brug ikke reagenser, hvis beskyttelsesposerne er åbne eller i stykker ved modtagelsen.
- Brug ikke reagenser, hvis tørremidlet ikke er til stede eller er i stykker inden i reagensposerne.
- Tørremidlet må ikke fjernes fra reagensposerne.
- Luk straks de beskyttende poser med reagenser med lynlåsforseglingen efter hver brug. Fjern eventuel overskydende luft i poserne inden forsejling.
- Brug ikke reagenser, hvis folien er blevet ødelagt eller beskadiget.
- Reagenser fra forskellige poser og/eller sæt og/eller partier må ikke blandes.
- Beskyt reagenser mod fugt. Længerevarende eksponering for fugt kan påvirke produktets ydeevne.
- Hold komponenterne væk fra lys.
- I tilfælde, hvor andre PCR-tests udføres i det samme område i laboratoriet, skal der udvises forsigtighed for at sikre, at VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3-ekstraktionssættet eller eventuelle yderligere reagenser, der kræves til testning samt BD MAX™ System, ikke kontamineres. Undgå altid mikrobiel og ribonuklease (RNase)/deoxyribonuklease (DNase) kontaminering af reagenser. Det anbefales at anvende sterile RNase/DNase-fri aerosolresistente engangspipettespidser eller positive fortrængningspipettespidser. Brug en ny spids til hver prøve. Handsker skal udskiftes før håndtering af reagenser og kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge).
- For at undgå kontaminering af miljøet med amplikoner må BD MAX™ PCR Cartridge ikke brydes fra hinanden efter brug. Forsejlingerne på BD MAX™ PCR Cartridge er designet til at forhindre kontaminering.
- Tilrettelæg en ensrettet arbejdsgang. Den skal begynde i ekstraktionsområdet og derefter flyttes til forstærknings- og detektionsområdet. Prøver, udstyr og reagenser må ikke returneres til det område, hvor det foregående trin blev udført.
- Følg god laboratoriepraksis. Bær beskyttelsesbeklædning, anvend engangshandsker, beskyttelsesbriller og maske. Man må ikke spise, drikke, ryge eller lægge makeup i arbejdsområdet. Vask hænder efter endt test.
- Prøverne skal behandles som potentielt smitsomme og/eller biologisk farlige, samt alle reagenser og materialer, der er blevet eksponeret for prøverne, og skal håndteres i overensstemmelse med de nationale sikkerhedsforskrifter. Træf de nødvendige forholdsregler under indsamling, opbevaring, behandling og bortskaffelse af prøver.

- Prøver og reagenser skal håndteres i et biologisk sikkerhedsskab. Anvend personlige værnemidler (PPE) i overensstemmelse med gældende retningslinjer for håndtering af potentielt smitsomme prøver. Affald bortskaffes i overensstemmelse med lokale retningslinjer.
- Regelmæssig dekontaminering af almindeligt anvendt udstyr anbefales, især mikropipetter og arbejdsflader.
- I overensstemmelse med Forordning (EF) nr. 1907/2006 (REACH), kræver VIASURE Real Time PCR Detection Kits ikke materialesikkerhedsdatablade (Material Safety Data Sheets) som en del af deres klassificering som værende ufarlige for helbredet og miljøet, fordi de ikke indeholder stoffer og/eller blandinger, som opfylder kriterierne for fareklassificering iht. forordning (EF) nr. 1272/2008 (CLP), eller forefindes i koncentrationer, der er højere end den værdi, der er angivet i den nævnte forordning til deres erklæring.
- Se brugervejledningen til BD MAX™ System for yderligere advarsler, forholdsregler og procedurer.

8. Analysemetode

8.1. Prøveindsamling, opbevaring og transport

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er blevet testet på respirationsprøver (nasofaryngeale podninger og aspirater). Andre typer prøver skal valideres af brugeren.

Indsamling, opbevaring og transport af prøver skal foregå i overensstemmelse med de betingelser, som er godkendt af brugeren. Samlet set skal luftvejsprøver indsamles og mærkes på passende vis i rene beholdere med eller uden transportmidler (afhængigt af prøvetype) og behandles så hurtigt som muligt for at garantere testens kvalitet. De nasofaryngeale aspirater skal transporteres ved 2-8 °C i op til 72 timer ifølge lokale og nationale retningslinjer for transport af patogen materiale. Ved længerevarende transport (over 72 timer) anbefaler vi forsendelse ved -20 °C eller derunder. Dog skal nasofaryngeale podninger i universelt transportmedie (UTM) transporteres i nedfrosen tilstand ved -20 °C eller derunder. Det anbefales at anvende friske prøver til testen. Prøverne kan opbevares ved 2-8 °C i op til 72 timer (nasofaryngeale aspirater) eller i nedfrosen tilstand ved -20 °C eller optimalt ved -70 °C (i UTM) med henblik på konservering. Gentagne fryse-tø-cykler bør undgås for at forhindre nedbrydning af prøven og nukleinsyrer.

Respirationsprøverne skal indsamles, transporteres og opbevares i overensstemmelse med relevante laboratorieretningslinjer. Der henvises til CDC-vejledningen (CDC's Infectious diseases laboratory test directory (2022) (CDC's testdirektiv for laboratorier for infektiøse sygdomme, 2022). Websted <https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/cdc-lab-tests.pdf>) og IDSA-vejledningen (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). En vejledning i anvendelse af mikrobiologilaboratoriet til diagnosticering af smitsomme sygdomme: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Kliniske infektionssygdomme*, 67(6), e1-e94).

Hvis der anvendes sputumprøver, kan de testes i henhold til anbefalingerne, der er nævnt herunder.

8.2. Prøveklargøring og DNA-ekstraktion

Udfør prøveforberedelsen i overensstemmelse med anbefalingerne i brugsanvisningen til det anvendte ekstraktionssæt, BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipettér 200 µl prøve i BD MAX™ ExK™ TNA-3 prøvebufferrør, og luk røret med en septumhætte. Der sikres fuldstændig blanding ved at vortex'e prøven ved høj hastighed i 1 minut. Fortsæt til BD MAX™ System Operation betjening.

Bemærk, at applikationsspecifikke forberedende ekstraktionsprocedurer bør udvikles og valideres af brugeren, og at visse andre typer prøver kan kræve forbehandling. Til eksempelvis sputumprøver tilsættes acetylcystein (N-Acetyl-L-cystein, ref. A7250, Merck KGaA anbefales) til prøven i forholdet 1:1 (dvs. 250 µl sputum og 250 µl acetylcystein 100 mg/ml); bland ved at vortex'e og opvarm ved 95 °C i 10 minutter. Pipettér 200 µl af det forbehandlede sputum i et BD MAX™ ExK™ TNA-3 prøvebufferrør, og luk røret med en septumhætte. Der sikres fuldstændig blanding ved at vortex'e prøven ved høj hastighed i 1 minut. Fortsæt til BD MAX™ System Operation betjening.

8.3. PCR-protokol

Bemærk: Der henvises til brugervejledningen til BD MAX™ System User's Manual for at få detaljerede instruktioner.

8.3.1. Oprettelse af et PCR-testprogram til VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Bemærk: Hvis du allerede har oprettet testen for VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, kan du springe trin 8.3.1 over og gå direkte til 8.3.2.

- 1) Vælg fanen "Test Editor" (Testredigering) på skærmen "Run" (Kør) på BD MAX™ System.
- 2) Klik på knappen "Create" (Opret).
- 3) På fanen Basic Information (Grundlæggende oplysninger) i vinduet "Test Name" (Navn på test), skal du navngive din test: dvs. VIASURE *Bordetella*.
- 4) I rullemenuen "Extraction Type" (Ekstraktionstype), vælg "ExK TNA-3".
- 5) Vælg "Type 5" i rullemenuen "Master Mix Format".
 - a. Bemærk: Produktet kan anvendes sammen med en yderligere VIASURE for BD MAX™-test. Vælg derefter "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (type 5)".
- 6) I "Sample extraction parameters" (Parametre for prøveekstraktion) vælges "User defined" (Brugerdefineret), og prøvevolumen justeres til 350 µl.
- 7) I "Ct Calculation" (Ct-beregning) vælges "Call Ct at Threshold Crossing" (Beregn Ct når tærsklen krydses).
- 8) Hvis du kører softwareversion 5.00 eller nyere og har snap-in-rør med stregkodet folie, skal du vælge følgende konfiguration i "Custom Barcodes" (Brugerdefinerede stregkoder):
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Snap-In 2-stregkode): 1C (vedrørende *Bordetella* reaction tube (reaktionsrør)).
 - b. "Snap-In 3 Barcode" (Snap-In 3-stregkode): 11 (vedrørende Rehydration Buffer tube).
 - c. "Snap-In 4 Barcode" (Snap-In 4-stregkode): et andet VIASURE reaction tube (forskellig folie), hvis du vælger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Afsnit 8.3.1).

9) Indtast følgende parametre på fanen "PCR settings" (PCR-indstillinger): "Channel Settings" (Kanalindstillinger), "Gains" (Stigninger) og "Threshold" (Tærskel) (Tabel 3).

a. Bemærk: Produktet kan anvendes i kombination med en ekstra VIASURE til BD MAX™-test, PCR-indstillinger og testtrin skal gennemføres for position 2 (grøn) og position 4 (blå).

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Gevinst)	Threshold (Tærskel)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	50	200	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	200	0	35
585/630 (ROX)	<i>B. holmesii</i>	50	200	0	40
630/665 (Cy5)	<i>B. parapertussis</i>	50	200	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	-	-	-	-

Tabel 12. "PCR settings" (PCR-indstillinger).

Bemærk: Det anbefales at angive minimumsgrænseværdierne angivet ovenfor for hver kanal som udgangspunkt, men de endelige indstillinger bør bestemmes af slutbrugeren ved fortolkning af resultaterne for at sikre, at tærskler falder inden for eksponentiel fase af fluorescenskurverne og over ethvert baggrundssignal. Tærskelværdien for forskellige instrumenter kan variere på grund af forskellige signalintensiteter.

10) I fanen "PCR settings" (PCR-indstillinger) indtastes følgende parametre samt "Spectral Cross Talk" (Spektral krydstale) (tabel 4).

		False Receiving Channel (Falsk modtagekanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Excitationskanal)	475/520	-	0,0	0,0	0,0	0,0	
	530/565	1,0	-	0,0	0,0	0,0	
	585/630	0,0	0,0	-	2,0	0,0	
	630/665	0,0	0,0	3,0	-	0,0	
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	

Tabel 13. Parametre for "Spectral Cross Talk" (spektral krydstale).

11) Indtast PCR-protokollen (tabel 5) på fanen "Test Steps" (Testtrin).

Step Name (Trinnavn)	Profile Type (Profiltype)	Cycles (Cyklusser)	Time (s) (Tid (er))	Temperature (Temperatur)	Detect (Registrering)
Initial denaturation (Indledende denaturering)	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturering og annotering/udvidelse (dataindsamling))	2-temperatur	45	10	95°C	-
			41	63°C	✓

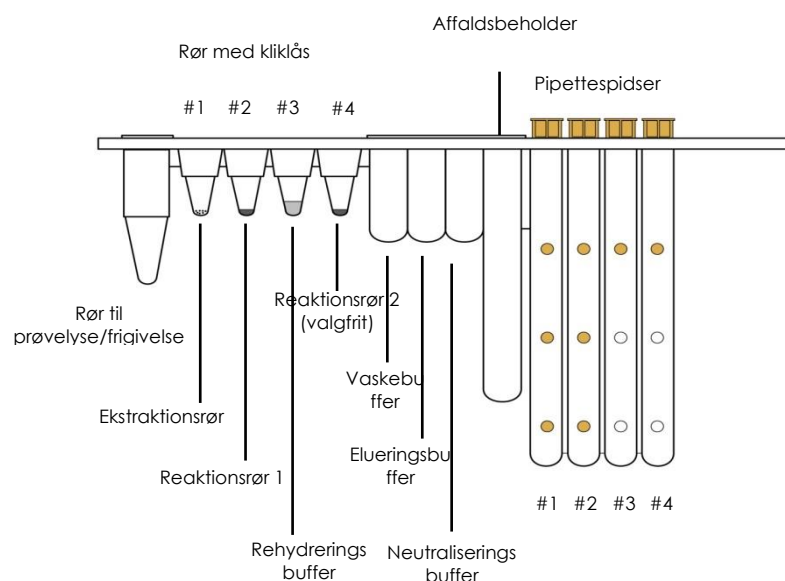
Tabel 14. PCR-protokol.

12) Klik på knappen "Save Test" (Gem test).

8.3.2. Opsætning af BD MAX™-stativ

- 1) For hver prøve, der skal testes, fjernes en Unitized Reagent Strips (samlet reagensstrimmel) fra BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Bank forsigtigt hver strimmel mod en hård overflade for at sikre, at alle væskerne ligger i bunden af rørene, og anbring dem i BD MAX™ Systems prøvestativer.
- 2) Fjern det nødvendige antal BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (hvid folie) fra deres beskyttelsespose. Sæt udtærksrøret(-rørene) (hvid folie) i de tilsvarende positioner i TNA-strimlen (fastgør position 1, hvid farvekodning på stativet. Se Figur 1). Fjern overskydende luft, og luk posen med lynlåsforseglingen.
- 3) Beregn antallet, og adskil et passende antal *Bordetella* reaction tube reaktionsrør (1C folie) og klik dem på plads i deres tilhørende positioner på strimlen (snap-position 2, grøn farvekodning på stativet. Se Figur 1).
 - a. Fjern overskydende luft, og luk aluminiumsposerne med lynlåsforseglingen.
 - b. Rehydreringen udføres korrekt ved at sørge for, at det frysetørrede produkt ligger i bunden af røret og ikke er i kontakt med rørets top eller folieforsøglingen. Bank forsigtigt hvert rør mod en hård overflade for at sikre, at alt produktet er i bunden af røret.
 - i. Bemærk: Hvis du vælger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (type 5)" (afsnit 8.3.1), skal du beregne antallet og adskille et passende antal VIASURE reaktionsrør (anden folie) og klikke dem på plads i deres tilhørende positioner på strimlen (snap-position 4, blå farvekodning på stativet. Se Figur 1). Fjern overskydende luft, og luk aluminiumsposerne med lynlåsforsøglingen.
- 4) Fjern det nødvendige antal Rehydration Buffer tubes (11 folie), og klik dem fast på deres tilsvarende pladser på strimlen (klik-position 3, ikke-farvet kodning på stativet. Se Figur 1). Fjern overskydende luft, og luk posen med lynlåsforsøglingen.
 - a. For at sikre, at overførslen udføres korrekt, skal man sørge for, at væsken ligger i bunden af røret og ikke er i kontakt med rørets top eller folieforsøglingen. Bank forsigtigt på hvert rør på en hård overflade for at sikre, at al bufferen er i bunden af røret.

Figur 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) fra BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. BD MAX™ Instrumentopsætning

- 1) Vælg fanen "Work List" (Arbejdsliste) på skærmen "Run" (Kør) på BD MAX™ Systemssoftware v4.50A eller nyere.
- 2) I rullemenuen "Test" (Test) vælges VIASURE *Bordetella* (hvis ikke allerede oprettet, se afsnittet 8.3.1).
- 3) Vælg det relevante lotnummer for sættet (fremgår af ekstraktionssættets udvendige æske) fra rullemenuen (valgfrit).
- 4) Indtast prøvebufferrørets identifikationsnummer i vinduet Sample tube (Prøverør) på Worklist (Arbejdsliste), enten ved at scanne strekkoden med scanneren eller ved manuel indtastning.
- 5) Udfyld prøven/patient-id'et og/eller adgangsvinduet på arbejdslisten, og klik på knappen "Save" (Gem). Fortsæt, indtil alle Sample Buffer Tubes (prøvebufferrør) er indtastet. Sørg for, at prøve-/patient-id'et og Sample Buffer Tubes matcher nøjagtigt.
- 6) Anbring det klargjorte Sample Buffer Tube i BD MAX™ Rack(s) (stativet/stativerne).
- 7) Sæt stativet/stativerne i BD MAX™ System (stativ A er placeret i venstre side af BD MAX™ System og stativ B i højre side).
- 8) Anbring det nødvendige antal BD MAX™ PCR Cartridges i BD MAX™ System.
- 9) Luk lågen til BD MAX™ System.
- 10) Klik på "Start Run" (Start procedure) for at starte proceduren.

8.3.4. BD MAX™ rapport

- 1) Klik på knappen "Results" (Resultater) i hovedmenuen.
- 2) Dobbeltklik enten på din kørsel på listen, eller tryk på knappen "View" (Vis).
- 3) Klik på "Print" (Udskriv), vælg: "Run Details, Test Details and Plot..." (Kør detaljer, testdetaljer og tegn grafik).
- 4) Klik på knappen "Print or Export" (Udskriv eller eksportér) på skærmbilledet Run Reports (Kør rapporter).

9. Tolkning af resultater

For en detaljeret beskrivelse af, hvordan man analyserer data, se BD MAX™ Systems brugervejledning.

Analysen af dataene udføres af BD MAX™-softwaren i henhold til producentens anvisninger. BD MAX™-softwaren rapporterer Ct-værdier og stigningskurver for hver detektorkanal for hver prøve, som er testet på følgende måde:

- En Ct-værdi på 0 angiver, at der ikke blev beregnet nogen Ct-værdi af softwaren ved den angivne tærskelværdi (se tabel 3). En forstærkningskurve for prøven, der viser en Ct-værdi på "0", skal kontrolleres manuelt.

- Ct-værdien -1 angiver, at ingen forstærkningskurve er forekommet.

- Enhver anden Ct-værdi skal fortolkes i sammenhæng med forstærkningskurve og i overensstemmelse med retningslinjerne for tolkning af prøven som anført i Tabel 6.

Kontrollér, at det indvendige styresignal fungerer korrekt for amplifikationsblandingen. Desuden skal du kontrollere, at der ikke foreligger nogen rapport over BD MAX™ Systemfejl.

Resultaterne skal læses og analyseres ved hjælp af følgende tabel:

<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i> (475/520)	<i>B. holmesii</i> (585/630)	<i>B. parapertussis</i> (630/665)	Intern kontrol (530/565)	Fortolkning
+	+	+	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> og/eller <i>B. holmesii</i> og <i>B. parapertussis</i> DNA påvist ¹
-	-	-	+ ²	<i>B. pertussis</i> , <i>B. holmesii</i> og <i>B. parapertussis</i> DNA ikke påvist ²
+	-	-	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> DNA påvist, <i>B. holmesii</i> og <i>B. parapertussis</i> DNA ikke påvist ¹
+	+	-	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> og/eller <i>B. holmesii</i> DNA påvist, <i>B. parapertussis</i> DNA ikke påvist ¹
+	-	+	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> og <i>B. parapertussis</i> DNA påvist, <i>B. holmesii</i> DNA ikke påvist ¹
-	+ ³	-	+/- ¹	<i>B. holmesii</i> DNA påvist, <i>B. pertussis</i> og <i>B. parapertussis</i> DNA ikke påvist ¹
-	+ ³	+	+/- ¹	<i>B. holmesii</i> og <i>B. parapertussis</i> DNA påvist, <i>B. pertussis</i> DNA ikke påvist ¹
-	-	+	+/- ¹	<i>B. parapertussis</i> DNA påvist, <i>B. pertussis</i> og <i>B. holmesii</i> DNA ikke påvist ¹
-	-	-	- ²	Resultatet Unresolved (Uløst) (UNR) fremkommer under tilstedeværelse af hæmmere i PCR-reaktionen, eller når der opstår et generelt problem (der ikke rapporteres med en fejlkode) under prøvekørslen og/eller forstærkningstrinnene. ²
IND	IND	IND	IND	Analyseresultatet er Indeterminate (ubestemmeligt) (IND). Skyldes en fejl i BD MAX™ System. Analyseresultat, der vises i tilfælde af en instrumentfejl, der er knyttet til en fejlkode.
INC	INC	INC	INC	Analyseresultatet er Incomplete (ufuldstændigt) (INC). Skyldes en fejl i BD MAX™ System. Analyseresultatet vises, hvor en fuldstændig kørsel ikke kunne gennemføres.

Tabel 15. Prøvefortolkning.

+: Der opstod forstærkning.

-: Der opstod ingen forstærkning.

1 En prøve anses for positiv, hvis den opnåede Ct-værdi er ≤ 40 . Den interne kontrol (IC) kan både vise et forstærkningssignal eller intet forstærkningssignal. Sommetider er IC-detektionen ikke nødvendig, fordi et højt kopinumner for målet kan forårsage præferenceamplifikation af mål-specifikke nukleinsyrer.

2 En prøve anses for negativ, hvis prøven ikke viser noget forstærkningssignal i påvisningssystemet, men den interne kontrol er positiv (Ct ≤ 35). En hæmning af PCR-reaktioner kan udelukkes ved forstærkning af den interne kontrol. I tilfælde af uløste resultater (UNR), manglende internt kontrolsignal i en negativ prøve anbefales det at gentage analysen ved følgende indikationer angivet.

3 *B. holmesii* DNA detekteres i to forskellige kanaler, 475/520 (FAM) og 585/630 (ROX), men på grund af den højere sensitivitet af 585/630 (ROX) omkring LoD i positive prøver, er der mulighed for, at der kun opnås et signal i denne kanal.

I tilfælde af et fortsat tvetydigt resultat anbefales det at gennemgå brugsanvisningen, den ekstraktionsproces, som brugeren anvender; til at verificere den korrekte ydeevne for hvert PCR-trin og gennemgå parametrene og kontrollere kurvens sigmoide form og fluorescensintensiteten.

BEMÆRK: Der er tilstrækkelig volumen i prøvebufferrøret til at gentage testen én gang. For forberedte BD MAX™ prøvebufferrør, der opbevares ved 2–8 °C eller 25 °C, skal gentestning udføres inden for 24 timer.

Resultaterne af testen bør evalueres af en sundhedsperson og sammenholdes med sygehistorie, kliniske symptomer og andre diagnostiske tests.

10. Begrænsninger i testen

- Resultaterne af testen bør evalueres af en sundhedsperson og sammenholdes med sygehistorie, kliniske symptomer og andre diagnostiske tests.
- Selvom denne analyse kan anvendes til andre prøvetyper, er den blevet valideret med nasofaryngeale podninger og nasofaryngeale aspirater. Hvis der anvendes sputumprøver, kan disse testes ved hjælp af ovenstående anbefalinger.
- For at opnå en tilfredsstillende testydeevne skal det frysetørrede produkt ligge i bunden af røret og ikke klæbe til det øverste område af røret eller folieforseglingen. Bank forsigtigt hvert rør mod en hård overflade for at sikre, at alt produktet er i bunden af røret.
- Et udseende af reaktionsblandingen i stabiliseret format, som normalt findes i bunden af røret, forskelligt fra det sædvanlige (uden konisk form, inhomogent, mindre/større i størrelse og/eller farve forskellig fra hvidlig) ændrer ikke testens funktionalitet.
- Kvaliteten af testen afhænger af prøvens kvalitet; nukleinsyrerne skal ekstraheres omhyggeligt fra kliniske prøver.
- Denne test er en kvalitativ test og giver ikke kvantitative værdier eller angiver antallet af tilstedeværende organismer.
- Meget lave målniveauer under detektionsgrænsen kan påvises, men resultaterne er muligvis ikke reproducerbare.
- Der kan opnås falske positive resultater på grund af krydskontaminering med prøver med muligt indhold af *Bordetella* og høje koncentrationer af mål-DNA, eller med prøver som er kontamineret som følge af PCR-produkter fra foregående reaktioner.
- De specifikke kombinationer af primere og prober til detektion af sekvenserne IS481, hIS1001 og pIS1001, der anvendes i VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, har ingen betydende homologi med det humane genom, den humane mikroflora eller andre mikroorganismer i luftvejene, når de kombineres. Det ville resultere i, at der kunne fremkomme falske positive.
- Falsk-negative resultater kan skyldes flere faktorer og kombinationer heraf, herunder:
 - Forkerte metoder til indsamling, transport, opbevaring og/eller håndtering af prøver.
 - Forkerte behandlingsprocedurer (herunder DNA-ekstraktion).
 - Nedbrydning af DNA under forsendelse/opbevaring og/eller behandling af prøver.
 - Mutationer eller polymorfisme i de primer- eller probe-bindende regioner kan påvirke detektionen af nye eller ukendte stammer af *Bordetella*.
 - Antal mikroorganismer, som er under analysens detektionsgrænse.
 - Tilstedeværelsen af qPCR-hæmmere eller andre typer interfererende stoffer.
 - Manglende overholdelse af brugsanvisningen og analyseproceduren.
- Et positivt testresultat indikerer ikke nødvendigvis tilstedeværelse af levende bakterier, og det betyder ikke, at disse bakterier er infektiøse, eller at de er den underliggende årsag til kliniske symptomer. Dog er et positivt resultat indikativt for tilstedeværelsen af *Bordetella* i målsekvenser.

- Hvis diagnostiske tests for andre luftvejssygdomme er negative, og patientens kliniske fremtoning og de epidemiologiske oplysninger antyder en mulig infektion med *B. pertussis*, *B. parapertussis* og/eller *B. holmesii*, skal et falsk negativt resultat overvejes og gentestning af patienten tages op til revision.
- Et negativt resultat udelukker ikke tilstedeværelsen af *B. pertussis*, *B. parapertussis* og/eller *B. holmesii* DNA i en klinisk prøve. Hvis kliniske observationer, patienthistorik og epidemiologiske oplysninger antyder, at der er infektion med *B. pertussis*, *B. parapertussis* og/eller *B. holmesii*, bør gentestning med et større prøvevolumen overvejes.
- Gentestning vil være nødvendig, hvis der opnås uløste, ubestemmelige eller ufuldstændige resultater under brug af VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Uløste resultater kan skyldes tilstedeværelsen af hæmmere i prøven eller forkert rehydrering af frysetørrede reaktionsblandingsrør. Hvis der opstår en instrumentfejl, kan det medføre ubestemmelige eller ufuldstændige resultater.

11. Kvalitetskontrol

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System indeholder en intern kontrol (IC) i hvert reaktionsrør, som bekræfter korrekt præstation af teknikken.

12. Ydelseskarakteristika

12.1. Klinisk sensitivitet og specificitet

Den kliniske præstation af VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System blev testet ved brug af kliniske og spikede nasofaryngeale podninger og nasofaryngeale aspirater, som allerede var testet positive eller negative for *B. pertussis*, *B. parapertussis* og/eller *B. holmesii*. Resultaterne var følgende:

	Center	Prøvetype	Arbejdsgang	Mål
1	CerTest Biotec (Zaragoza, Spanien)	Nasofaryngeale podninger (Cerba Xpert)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>B. pertussis</i>
2		Nasofaryngeale aspirater (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
3		Nasofaryngeale podninger og aspirater (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
4		Nasofaryngeale podninger (Eurofins)		<i>B. pertussis</i>
5		(Eurofins) (Cerba Xpert + Eurofins + simulerede prøver)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>

Tabel 16. Sted, prøvetype, arbejdsgang og mål.

Sande positive og negative værdier, falske positive og negative værdier, sensitivitet og specificitet af VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System blev beregnet i forhold til hver sammenligningsanalyse, som vist i følgende tabel:

Center	Komparatoranalyse	Mål	TP	TN	FP	FN	Sensitivitet	Specificitet
1	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	33	100	0	1	0,971 (0,84 – 0,99)	1 (0,96 – 1)
2	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	43	34	1	0	1 (0,91 – 1)	0,971 (0,85 – 0,99)
		<i>B. parapertussis</i>	28	48	0	2	0,933 (0,77-0,99)	1 (0,92-1)
	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	76	0	1	0,5 (0,01-0,98)	1 (0,95-1)
3	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	76	134	1	1	0,987 (0,93-1)	0,993 (0,95-1)
		<i>B. parapertussis</i>	28	182	0	2	0,933 (0,77-0,99)	1 (0,98-1)
		<i>B. holmesii</i>	1	210	0	1	0,5 (0,01-0,987)	1 (0,98-1)
4	Valideret in-house-blandet analyse af pertussis/parapertussis	<i>B. pertussis</i>	43	54	0	3	0,935 (0,821-0,986)	1 (0,966-1)
5	Indledende karakterisering*	<i>B. pertussis</i>	98	186	0	4	0,961 (0,903-0,989)	1 (0,980-1)
		<i>B. parapertussis</i>	12	276	0	0	1 (0,735-1)	1 (0,987-1)
		<i>B. holmesii</i>	20	268	0	0	1 (0,832-1)	1 (0,986-1)

Tabel 17. Sande positive (TP) og negative (TN) værdier, falske positive (FP) og negative (FN) værdier, sensitivitet, specificitet af VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

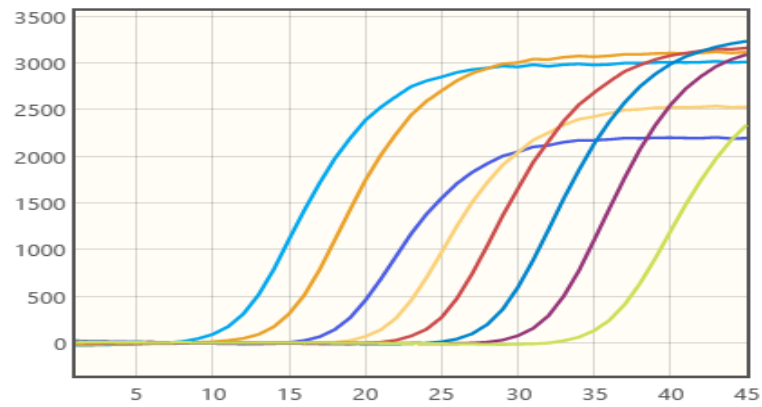
* Indledende karakterisering omfatter SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis -analyse (Cepheid) og valideret in-house-blandet pertussis/parapertussis -analyse til detektion af *B. pertussis* og *B. parapertussis* og SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis -analyse (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm) til detektion af *B. holmesii* i Cerba Xpert-prøver.

Resultaterne viser høj overensstemmelse for detektion af *B. pertussis*, *B. parapertussis* og/eller *B. holmesii* ved brug af VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

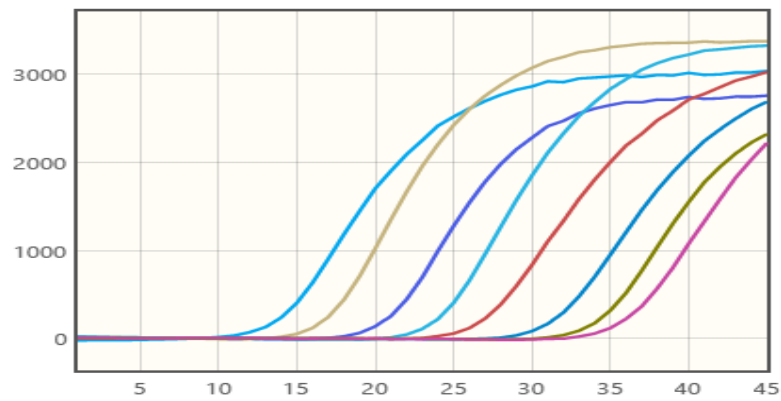
12.2. Analytisk sensitivitet

VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en detektionsgrænse (LoD) på 1,2 kolonidannende bakterier (CFU) pr. ml prøve for *B. pertussis*, 4×10^{-2} CFU/ml prøve for *B. holmesii* og 12 CFU/ml prøve for *B. parapertussis* med ≥ 95 % positive prøver for nasofaryngeale podningsprøver.

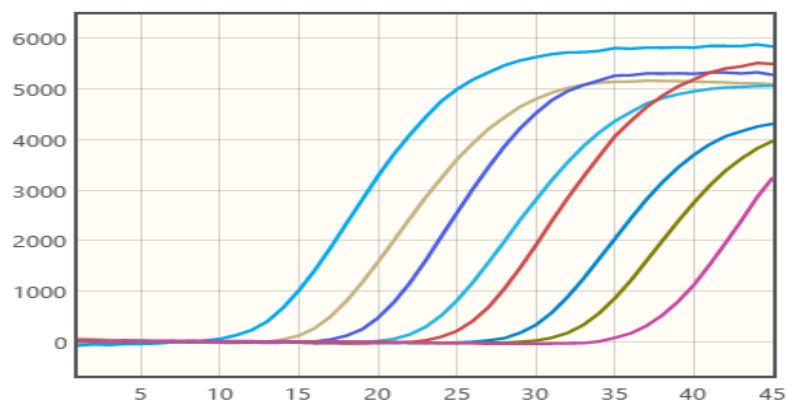
Figur 5. Fortyndingsserie af templates af *Bordetella pertussis* ($7,07 \times 10^4$ - $7,07 \times 10^{-3}$ CFU pr. reaktion) kørt på BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanal).



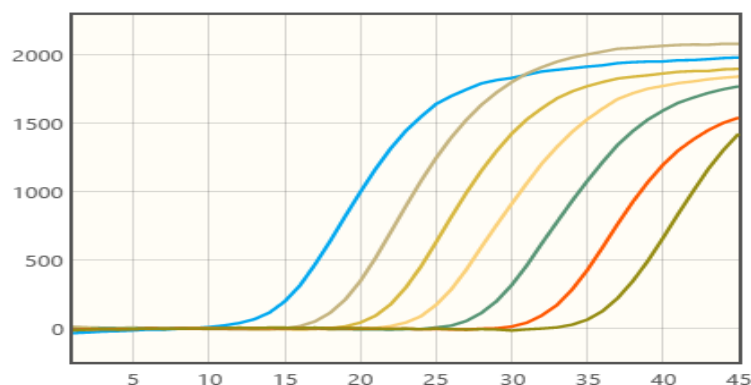
Figur 6. Fortyndingsserie af templates af *Bordetella holmesii* ($2,42 \times 10^3$ - $2,42 \times 10^{-4}$ CFU pr. reaktion) kørt på BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanal).



Figur 7. Fortyndingsserie af templates af *Bordetella holmesii* ($2,42 \times 10^3$ - $2,42 \times 10^{-4}$ CFU pr. reaktion) kørt på BD MAX™ System (585/630 (ROX) kanal).



Figur 8. Fortyndingsserie af templates af *Bordetella parapertussis* ($7,07 \times 10^4$ - $7,07 \times 10^{-2}$ CFU pr. reaktion) kørt på BD MAX™ System (630/665 (Cy5) kanal).



12.3. Analytisk specificitet

Specificiteten af *Bordetella*-analysen blev bekræftet ved at teste et panel bestående af forskellige mikroorganismer, der er forbundet med luftvejsinfektioner. Der blev ikke påvist krydsreaktivitet mellem nogen af følgende testede mikroorganismer:

Krydsreaktivitetstest					
Human Adenovirus-type 1-5, 8, 15, 31, 40 og 41	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
Bocavirus	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09-virus	-	<i>Legionella pneumophila</i> serogruppe 1	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)-virus	-	Human metapneumovirus A og B	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A og C	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> -stamme CM-1	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2)-virus (Clade 3C2a.1)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Human coronavirus 229E, OC43 og NL63	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)-virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 og 4 vira	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-virus	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> type A1 og g885652	-
Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)-virus	-	Influenza B/Florida/04/06-virus	-	Respiratorisk syncytial virus (RSV) type A og B	-
Influenza A/Ny Caledonia/20/99(H1N1)-virus	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	Human rhinovirus	-
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella bozemanii</i> serovar 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i>	-
Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)-virus	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)-virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-		

Tabel 18. Referencepatogene mikroorganismer, der blev brugt i denne undersøgelse.











12.4. Analytisk reaktivitet

Reaktiviteten af VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System blev evalueret med DNA-templates, som var ekstraheret fra *B. pertussis*, *B. parapertussis* og *B. holmesii*, og de udviste positive resultater.

Bibliography/ Bibliografi

1. K. Kösters *et al.* Real-time LightCycler PCR for detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(5): 1719-1722.
2. K.M. Tatti *et al.* Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49(12): 4059-4066.
3. L. Roorda *et al.* A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant *Bordetella* species by the presence and distribution of three Insertion Sequence elements. *BMC Research Notes* 2011; 4:11.
4. A. Tizolova *et al.* Development of real-time PCR assay for differential detection of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2014; 78(4):347-351.
5. V. Kolodkina *et al.* Multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *Iranian Journal of Microbiology* 2014; 6(3): 140–148.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis (Whooping Cough) (<https://www.cdc.gov/pertussis/>).
7. World Health Organization. Pertussis (<http://www.who.int/topics/pertussis/en/>).

Symbols for IVD components and reagents/ Symboler for IVD-komponenter og -reagenser

 In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Keep dry Almacenar en lugar seco	 Use by Fecha de caducidad	 Manufacturer Fabricante	 Batch code Número de lote
 Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	 Unique Device Identification Identificación única de dispositivo	 Catalogue number Número de referencia

Trademarks

BD MAX™ is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.

Change Control / Ændringskontrol		
Version No. / Versionsnr.	Changes / Ændringer	Date / Dato
00	Original version / Original version.	29/06/2022

Table A 2. Control change table/ Tabel over ændringskontrol.

Revision: 29th June 2022

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev02