

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Bordetella
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Ces consignes d'utilisation s'appliquent à la référence suivante :

PRODUCT / PRODUIT	REFERENCE / RÉFÉRENCE
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. / Référence du produit à utiliser avec le BD MAX™ System.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Les instructions d'utilisation (IFU) sont incluses dans le kit en anglaise/espagnol.

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 / Contactez viasure@certest.es si votre langue ne figure pas dans la liste.

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.

Remarque : L'utilisateur doit notifier au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel il est établi en tant qu'utilisateur et/ou patient tout incident grave lié au produit.

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

Table des matières

1.	Utilisation prévue	19
2.	Résumé et explication	19
3.	Procédé	19
4.	Réactifs fournis.....	20
5.	Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur.....	20
6.	Conditions de transport et de stockage	21
7.	Précautions pour les utilisateurs	21
8.	Protocole de test.....	22
8.1.	Prélèvement, stockage et transport des échantillons.....	22
8.2.	Préparation de l'échantillon et extraction de l'ADN	23
8.3.	Protocole PCR	23

9.	Interprétation des résultats.....	27
10.	Limitations du test.....	29
11.	Contrôle qualité	30
12.	Caractéristiques du test.....	30
12.1.	Sensibilité et spécificité cliniques.....	30
12.2.	Sensibilité analytique	31
12.3.	Spécificité analytique.....	33
12.4.	Réactivité analytique	33
	Bibliography/ Bibliographie.....	34
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboles pour les composants IVD et réactifs	34
	Trademarks.....	34

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. paraptussis</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.

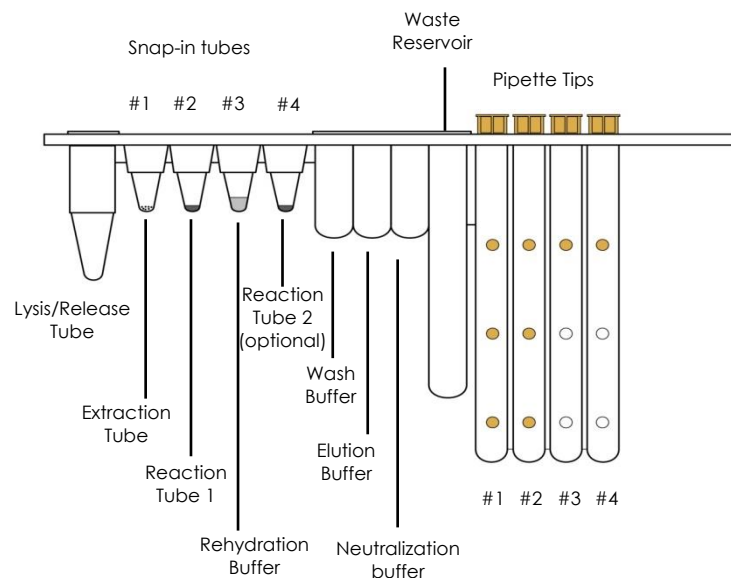
- 12) Click the "Save Test" button.

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 ($Ct \leq 35$). 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)
		<i>B. holmesii</i>	1	210	0	1	0.5 (0.01-0.987)	1 (0.98-1)
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).

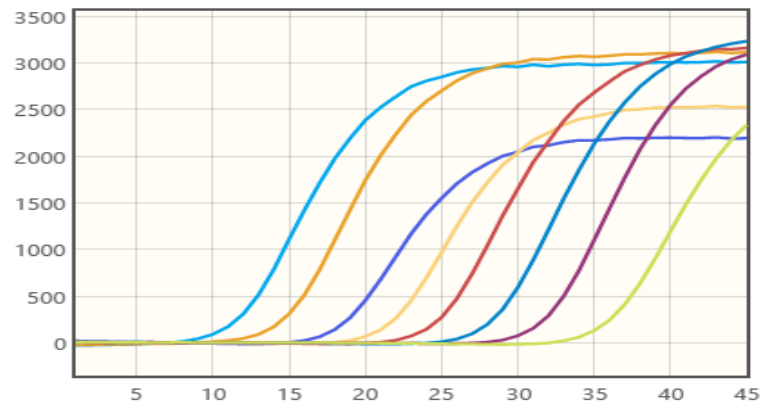


Figure 2. Dilution series of *Bordetella holmesii* (2.42×10^3 - 2.42×10^{-4} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

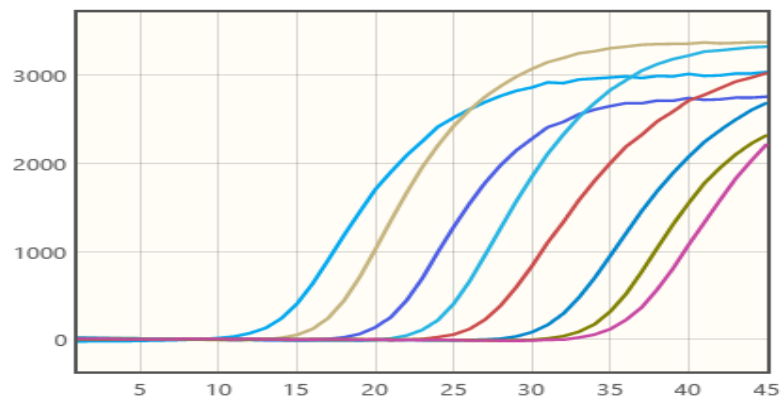


Figure 3. Dilution series of *Bordetella holmesii* (2.42×10^3 - 2.42×10^{-4} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

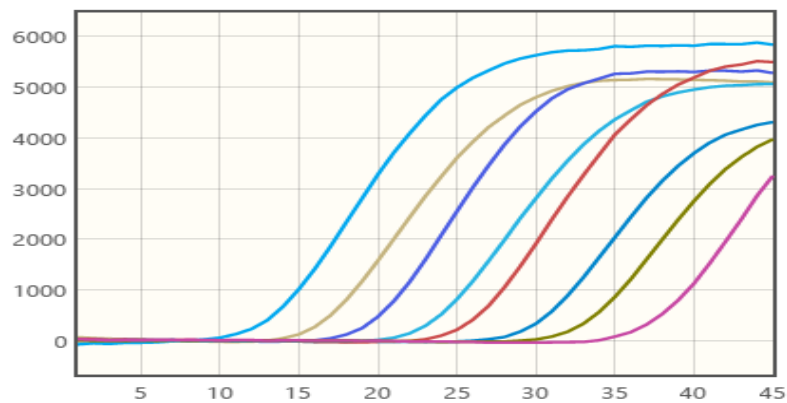
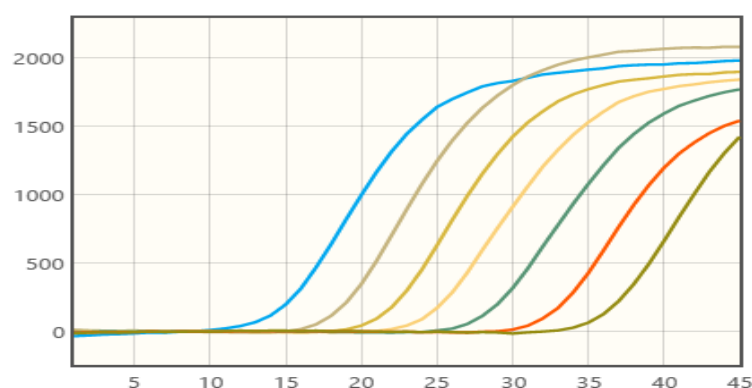


Figure 4. Dilution series of *Bordetella parapertussis* (7.07×10^4 - 7.07×10^{-2} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



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.

FRANÇAIS

1. Utilisation prévue

Le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est un test PCR automatisé en temps réel conçu pour la détection qualitative et différenciation de l'ADN du *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* et/ou *Bordetella holmesii* dans les échantillons respiratoires (écouvillons nasopharyngés et aspirations nasopharyngées) de patients suspectés de présenter une infection respiratoire par leur prestataire de santé. Ce test est destiné à faciliter l'identification du *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* et/ou *Bordetella holmesii*, en combinaison avec les signes et symptômes cliniques du patient et les facteurs de risque épidémiologiques. Le test utilise le BD MAX™ System pour l'extraction automatisée de l'ADN, puis la méthode PCR en temps réel, employant les réactifs fournis combinés avec des réactifs universels et consommables pour le BD MAX™ System. L'ADN est extrait des échantillons respiratoires, amplifié par PCR en temps réel, puis détecté au moyen de sondes fluorescentes à colorant rapporteur spécifiques pour le *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* et *Bordetella holmesii*.

2. Résumé et explication

Le genre *Bordetella* regroupe 8 espèces, dont 4 sont connues pour infecter l'homme : *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*, et *B. bronchiseptica*. La première cause de la coqueluche est l'infection par *B. pertussis*, qui est suivie par *B. parapertussis*. *B. holmesii* a été isolé chez des patients atteints d'une maladie sous-jacente grave, tandis que *B. bronchiseptica* se limite généralement aux animaux mais a aussi été isolée occasionnellement chez des patients immunodéprimés.

La coqueluche est une maladie très contagieuse qui se transmet d'une personne à l'autre, généralement par la toux ou les éternuements, ou par un contact étroit avec une personne infectée partageant un espace respiratoire commun. L'évolution clinique de la maladie est divisée en trois stades, qui comprennent les caractéristiques cliniques suivantes : catarrhal (coryza, fièvre légère, toux légère et occasionnelle), paroxystique (paroxysmes de toux nombreuses et rapides, cyanose, vomissements et épuisement) et convalescent (rétablissement progressif et toux paroxystique moins persistante).

Malgré la vaccination, la coqueluche reste endémique dans la plupart des régions du monde. Le diagnostic doit être fiable afin de mettre en place un traitement approprié et une prophylaxie des contacts si nécessaire, en particulier des nourrissons non vaccinés chez qui la coqueluche se présente comme une maladie potentiellement mortelle. Les tests d'amplification des acides nucléiques, notamment la PCR et plus récemment la PCR en temps réel, permettent de surmonter certaines des limites inhérentes à la culture et aux méthodes sérologiques pour le diagnostic des infections à *Bordetella*. La plupart des tests PCR sont basés sur la détection de séquences d'insertion (IS) présentes dans plusieurs copies d'un génome, ce qui augmente la sensibilité des tests PCR.

3. Procédé

Le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est un test PCR automatisé en temps réel conçu pour la détection qualitative et différenciation de l'ADN du *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*

et/ou *Bordetella holmesii* dans les échantillons respiratoires. Après l'isolement de l'ADN, l'identification du *Bordetella* se fait par l'amplification d'une région conservée du gène des séquences d'insertion IS481 pour *Bordetella pertussis/holmesii*, pIS1001 pour *Bordetella parapertussis* et hIS1001 pour *Bordetella holmesii*, au moyen d'amorces spécifiques et d'une sonde marquée d'une molécule fluorescente.

Le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est basé sur l'activité d'exonucléase de 5' de l'ADN polymérase. Pendant l'amplification de l'ADN, cette enzyme clive la sonde reliée à la séquence de l'ADN complémentaire, séparant le quencher (colorant désactivateur) du rapporteur. Cette réaction entraîne une augmentation du signal de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de la matrice cible. Cette fluorescence est mesurée sur le BD MAX™ System.

Le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient dans chaque tube tous les composants nécessaires pour effectuer un test PCR en temps réel (amorces/sondes spécifiques, dNTPs, tampon, polymérase) dans un format stabilisé, ainsi qu'un contrôle interne pour surveiller le processus d'extraction et/ou l'inhibition de l'activité polymérase.

Cible	Canal	Gène
<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	475/520	Séquence IS481
<i>B. holmesii</i>	585/630	Séquence hIS1001
<i>B. parapertussis</i>	630/665	Séquence pIS1001
Internal control (IC)	530/565	-

Tableau 10. Cible, canal et gènes.

4. Réactifs fournis

Le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient les matériaux et réactifs décrits dans le tableau 2 ci-après.

Réactif/matériau	Description	Code-barres	Quantité
<i>Bordetella</i> reaction tube	Assortiment comprenant des enzymes, des amorces, des sondes, un tampon, des dNTPs, des stabilisateurs et un contrôle interne dans un format stabilisé	Opercule 1C	2 poches de 12 tubes transparents
Rehydration Buffer tube	Solution pour reconstituer le produit stabilisé	Opercule 11	1 poche de 24 tubes transparents

Tableau 11. Réactifs et matériaux fournis avec le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, réf. n° VS-BDT124 (444204).

5. Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur

La liste suivante présente les matériaux et l'équipement indispensables, mais non inclus dans le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Instrument PCR en temps réel : BD MAX™ System (réf. : 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (réf. :442827 ou 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (réf. : 437519).

- Mélangeur Vortex.
- Micropipettes (exactitude entre 2 et 1000 µl).
- Eau exempte de nucléase.
- Embouts à filtre.
- Gants jetables sans poudre.

6. Conditions de transport et de stockage

- Les kits peuvent être expédiés et stockés à une température de 2 à 40 °C jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette.
- La durée d'utilisation du produit est de 28 jours maximum après ouverture des poches en aluminium contenant les tubes réactionnels.

7. Précautions pour les utilisateurs

- L'utilisation de ce produit est strictement réservée aux professionnels, tels que les professionnels et techniciens de laboratoire ou de santé, formés aux techniques de la biologie moléculaire.
- Pour les procédures diagnostiques *in vitro*.
- N'utilisez pas les réactifs et/ou matériaux après la date de péremption.
- N'utilisez pas le kit si l'étiquette qui scelle la boîte extérieure est déchirée.
- N'utilisez pas les réactifs dont la poche de protection est ouverte ou endommagée à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs dont les poches de protection sont ouvertes ou fissurées à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs sans absorbeur d'humidité ou si celui-ci est cassé à l'intérieur des poches de réactifs.
- Ne retirez pas l'absorbeur d'humidité des poches de réactifs.
- Refermez rapidement les poches de réactifs avec la fermeture à glissière étanche après chaque utilisation. Expulsez tout excès d'air des poches avant de les sceller.
- N'utilisez pas les réactifs dont l'opercule en aluminium est cassé ou endommagé.
- Ne mélangez pas des réactifs provenant de poches, de kits et/ou de lots différents.
- Protégez les réactifs contre l'humidité. Toute exposition prolongée à l'humidité risque d'altérer l'efficacité du produit.
- Conservez les composants à l'abri de la lumière.
- Si d'autres tests PCR sont menés dans la même zone commune du laboratoire, assurez-vous que le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, tout réactif supplémentaire requis pour le test et le BD MAX™ System ne sont pas contaminés. Assurez-vous de toujours éviter tout risque de contamination microbienne et par ribonucléase (RNase)/désoxyribonucléase (DNase) des réactifs. L'utilisation d'embouts de pipette stériles, exempts de RNase/DNase, à usage unique, résistant aux aérosols ou à déplacement positif est fortement recommandée. Utilisez un nouvel embout pour chaque échantillon. Changez de gants avant toute manipulation de réactifs et de cartouches (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Pour éviter toute contamination de l'environnement par des amplicons, abstenez-vous de désassembler la BD MAX™ PCR Cartridge après utilisation. Les joints de la BD MAX™ PCR Cartridge sont conçus pour éviter une contamination.

- Élaborez un flux de travail unidirectionnel. Il doit commencer dans la zone d'extraction, puis se déplacer vers la zone d'amplification et de détection. Ne ramenez pas les échantillons, l'équipement et les réactifs dans la zone où s'est déroulée l'étape précédente.
- Suivez les bonnes pratiques de laboratoire. Portez des vêtements de protection, utilisez des gants, lunettes de protection et masque jetables. Abstenez-vous de manger, de fumer ou d'appliquer des produits cosmétiques dans la zone de travail. Lavez-vous les mains une fois que vous avez terminé le test.
- Traitez les échantillons, ainsi que tout réactif et tout matériau ayant été exposés à ces derniers, comme des agents potentiellement infectieux et/ou présentant un danger biologique, et manipulez-les conformément aux réglementations nationales applicables en matière de sécurité. Prenez les précautions nécessaires pendant la collecte, le transport, le stockage, la manipulation et l'élimination des échantillons.
- Les échantillons et les réactifs doivent être manipulés dans une enceinte de sécurité biologique. Utilisez un équipement de protection individuelle (EPI) conforme aux directives en vigueur pour la manipulation d'échantillons potentiellement infectieux. Éliminez les déchets conformément aux réglementations locales et nationales.
- Une décontamination régulière de l'équipement fréquemment utilisé est recommandée, en particulier des micropipettes et des surfaces de travail.
- Conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 (REACH), les VIASURE Real Time PCR Detection Kits ne font pas l'objet de fiches de données de sécurité (Safety Data Sheets) dans la mesure où ils sont classés comme produits non dangereux pour la santé et l'environnement, dès lors qu'ils ne contiennent aucune substance et/ou composition correspondant aux critères de classification des dangers énoncés dans le règlement (CE) n° 1272/2008 (CLP) ou dont la concentration est supérieure à la valeur établie dans ledit règlement à des fins de déclaration.
- Consultez le mode d'emploi du BD MAX™ System pour en savoir plus sur les avertissements, les précautions et les procédures à respecter.

8. Protocole de test

8.1. Prélèvement, stockage et transport des échantillons

Le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été testé sur des échantillons respiratoires (écouvillons nasopharyngés et aspirations nasopharyngées). Tout autre type d'échantillon doit être validé par l'utilisateur.

La collecte, le stockage et le transport des échantillons doivent être conformes aux conditions validées par l'utilisateur. D'une manière générale, les échantillons respiratoires doivent être prélevés et étiquetés de manière appropriée dans des conteneurs propres avec ou sans milieu de transport (selon le type d'échantillon) et traités le plus tôt possible afin de garantir la qualité du test. Les aspirations nasopharyngées doivent être transportées à une température de 2 à 8 °C jusqu'à 72 heures maximum, conformément aux réglementations locales et nationales relatives au transport de matières porteuses d'agents pathogènes. Pour un transport de longue durée (plus de 72 heures), nous recommandons une expédition à une température ≤ -20 °C. Cependant, les écouvillons nasopharyngés dans le milieu de transport universel (UTM) doivent être transportés congelés à -20 °C maximum. Il est recommandé d'utiliser des spécimens frais pour le test. Les échantillons peuvent être stockés entre 2 et 8 °C

jusqu'à 72 heures (écouvillons nasopharyngés) ou congelés à -20 °C ou idéalement à -70 °C (dans l'UTM) pour la conservation. Évitez les cycles de congélation-décongélation répétés afin de ne pas dégrader l'échantillon et les acides nucléiques.

Les échantillons respiratoires doivent être prélevés, transportés et stockés conformément aux directives spécifiques du laboratoire. Pour en savoir plus, veuillez consulter la directive CDC (Centres pour le contrôle et la prévention des maladies) (Directives relatives au prélèvement d'échantillons de 2022) Site web <https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/cdc-lab-tests.pdf> (en anglais) et la directive IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). Guide de l'utilisation du laboratoire de microbiologie pour le diagnostic des maladies infectieuses : mise à jour 2018 par la Société américaine des maladies infectieuses et la Société américaine de microbiologie. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

Si les échantillons utilisés sont des expectorations, ils peuvent être testés selon les recommandations ci-dessous.

8.2. Préparation de l'échantillon et extraction de l'ADN

Préparez l'échantillon selon les recommandations figurant dans le mode d'emploi du kit d'extraction utilisé, BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipettez 200 µl de l'échantillon dans un BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube et fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le BD MAX™ System Operation.

Remarque : l'utilisateur devra élaborer et valider des procédures de préparation de l'extraction spécifiques à l'application et que certains autres échantillons peuvent nécessiter un prétraitement. Par exemple, pour les échantillons d'expectorations, ajoutez l'acétylcystéine (recommandée : N-Acétyl-L-cystéine réf. A7250, Merck KGaA) à l'échantillon à un ratio de 1:1 (à savoir, 250 µl d'expectoration pour 250 µl d'acétylcystéine 100 mg/ml), mélangez au vortex et chauffez à 95 °C pendant 10 minutes. Pipettez 200 µl de l'expectoration prétraitée dans un BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube et fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le BD MAX™ System Operation.

8.3. Protocole PCR

Remarque : veuillez consulter le mode d'emploi du BD MAX™ System pour des instructions détaillées.

8.3.1. Création d'un programme de test PCR pour le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Remarque : Si vous avez déjà créé le test pour le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, vous pouvez ignorer l'étape 8.3.1 et passer directement à l'étape 8.3.2.

- 1) Sur l'écran « Run » (Exécuter) du BD MAX™ System, sélectionnez l'onglet « Test Editor » (Éditeur de test).
- 2) Cliquez sur la touche « Create » (Créer).

- 3) Sous l'onglet « Basic Information » (Informations de base), dans la fenêtre « Test Name » (Nom du test), attribuez un nom à votre test : c'est-à-dire, VIASURE *Bordetella*.
- 4) Dans le menu déroulant « Extraction Type » (Type d'extraction), sélectionnez « ExK TNA-3 ».
- 5) Dans le menu déroulant « Master Mix Format » (Format Master Mix), sélectionnez « Type 5 ».
 - a. Remarque : l'utilisation de ce produit est possible en association avec un autre test VIASURE for BD MAX™, dans ce cas sélectionnez « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation).
- 6) Dans les « Sample extraction parameters » (Paramètres d'extraction de l'échantillon), sélectionnez « User defined » (Défini par l'utilisateur) et ajustez le volume de l'échantillon à 350 µl.
- 7) Dans le « Ct Calculation » (Calcul Ct), sélectionnez « Call Ct at Threshold Crossing » (Résultats Ct au point d'inflexion).
- 8) Si vous utilisez une version logicielle 5.00 ou supérieure et disposez de tubes « Snap-In » (à clipser) avec un opercule à code-barres, sélectionnez la configuration suivante sous « Custom Barcodes » (codes personnalisés) :
 - a. « Snap-In 2 Barcode » (Code-barres Snap-In 2) : 1C (pour le tube réactionnel *Bordetella* reaction tube).
 - b. « Snap-In 3 Barcode » (Code-barres Snap-In 3) : 11 (pour le Rehydration Buffer Tube).
 - c. « Snap-In 2 Barcode » (Code-barres Snap-In 4) : autre tube réactionnel VIASURE (opercule différent) si vous choisissez le format « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Section 8.3.1).
- 9) Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez les paramètres suivants : « Channel Settings » (Réglages des canaux), « Gains » et « Threshold » (Seuil) (tableau 3).
 - a. Remarque : l'utilisation de ce produit est possible en association avec un autre test VIASURE pour BD MAX™, les « PCR Settings » (Réglages PCR) et les « Test Steps » (Étapes du test) doivent être effectués pour les Snaps (clips) positions 2 (vert) et 4 (bleu).

Channel (Canal)	Alias (Pseudo)	Gain (Gain)	Threshold (Seuil)	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)	-	-	-	-	-

Tableau 12. « PCR Settings » (Réglages PCR).

Remarque : il est recommandé de définir les valeurs seuils minimales indiquées ci-dessus comme point de départ pour chaque canal, mais les réglages finaux doivent être définis par l'utilisateur final lors de l'interprétation des résultats afin de garantir que les seuils se situent dans la phase exponentielle des courbes de fluorescence et au-dessus de tout signal de fond. La valeur seuil peut varier selon les instruments en raison des différentes intensités de signal.

- 10) Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez également les paramètres crosstalk spectraux « Spectral Cross Talk » (tableau 4) suivants :

		False Receiving Channel (Canal de fausse réception)				
Channel (Canal)		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal d'excitation)	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	-

Tableau 13. Paramètres « Spectral Cross Talk » (paramètres crosstalk spectraux).

- 11) Sous l'onglet « Test Steps » (Étapes de test), saisir le protocole PCR (tableau 5).

Step Name (Nom de l'étape)	Profile Type (Type de profil)	Cycles (Cycles)	Time (s) (Temps)	Temperature (Température)	Detect (Détection)
Initial denaturation (Dénaturation initiale)	Maintien	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Dénaturation et appariement/extension (collecte de données))	2- température	45	10	95 °C	-
			41	63 °C	✓

Tableau 14. Protocole PCR.

- 12) Cliquez sur la touche « Save Test » (Enregistrer le test).

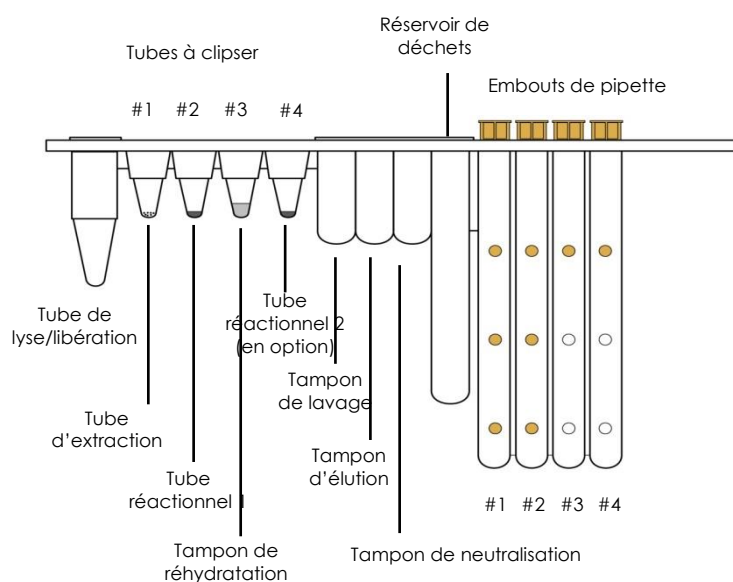
8.3.2. Préparation du portoir BD MAX™

- Prenez une barrette unitaire de réactifs (Unitized Reagent Strips) du BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit pour chaque échantillon à tester. Tapotez doucement chaque barrette sur une surface dure afin de vous assurer que les liquides se trouvent au fond des tubes et chargez les barrettes sur les portoirs d'échantillons du BD MAX™ System.
- Sortez le nombre nécessaire de tubes d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (opercule blanc) de leur poche de protection. Clipsez le(s) tube(s) d'extraction (opercule blanc) dans la position correspondante sur la barrette TNA (clip position 1, code couleur blanc sur le portoir - voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
- Déterminez et séparez le nombre approprié de tubes réactionnels *Bordetella* reaction tube (opercule 1C) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 2, code couleur vert sur le portoir). voir figure 1).
 - Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.
 - Afin d'obtenir une réhydratation optimale, veuillez vous assurer que le produit lyophilisé se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve intégralement au fond du tube.
 - Remarque : Si vous choisissez le format « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec

tampon de réhydratation) (section 8.3.1), déterminez et séparez le nombre nécessaire de tubes réactionnels VIASURE supplémentaires (opercule différent) et clipsez-les dans les positions correspondantes sur la barrette (clip position 4, code couleur bleu sur le portoir – voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.

- 4) Sortez le nombre nécessaire de Rehydration Buffer Tubes (opercule 11) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 3, sans code couleur sur le portoir – voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
 - a. Afin de réaliser un transfert optimal, veuillez vous assurer que le liquide se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le tampon se trouve entièrement au fond du tube.

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



8.3.3. Préparation de l'instrument BD MAX™

- 1) Sélectionnez l'onglet « Work List » (Liste de travail) sur l'écran « Run » (Exécuter) du BD MAX™ System (logiciel v4.50A ou version supérieure).
- 2) Dans le menu déroulant « Test », sélectionnez VIASURE *Bordetella* (s'il n'est pas créé, voir la section 8.3.1).
- 3) Sélectionnez le numéro de lot correspondant au kit (visible à l'extérieur de la boîte du kit d'extraction utilisé) dans le menu déroulant (facultatif).
- 4) Saisissez le numéro d'identification du Sample Buffer Tube (tube de tampon d'échantillon) dans la fenêtre Sample Tube (tube d'échantillon) de la Work List (Liste de travail), soit en scannant le code-barres, soit par saisie manuelle.
- 5) Renseignez l'identifiant de l'échantillon/du patient et/ou la fenêtre Accession de la « Work List » (Liste de travail) et cliquez sur la touche « Save » (Enregistrer). Poursuivez ainsi jusqu'à ce que tous les Sample Buffer Tubes soient saisis. Assurez-vous que l'identifiant de l'échantillon/du patient et les Sample Buffer Tubes sont correctement appariés.
- 6) Placez le Sample Buffer Tube préparé dans le(s) portoir(s) du BD MAX™ Rack(s).

- 7) Chargez le(s) portoir(s) dans le BD MAX™ System (le portoir A est positionné du côté gauche de l'instrument et le portoir B du côté droit).
- 8) Chargez le nombre nécessaire de cartouche(s) PCR BD MAX™ Cartridge(s) dans le BD MAX™ System.
- 9) Fermez la porte du BD MAX™ System.
- 10) Cliquez sur « Start Run » (Lancer l'exécution) pour démarrer la procédure.

8.3.4. Rapport BD MAX™

- 1) Dans le menu principal, cliquez sur la touche « Results » (Résultats).
- 2) Faites un double-clic sur votre programme dans la liste ou appuyez sur la touche « View » (Aperçu).
- 3) Cliquez sur « Print » (Imprimer), sélectionnez : « Run Details, Test Details and Plot... » (Détails du programme, détails du test et trame...).
- 4) Cliquez sur la touche « Print or Export » (Imprimer ou Exporter) sur l'écran « Run Reports » (Produire des rapports).

9. Interprétation des résultats

Pour plus de détails sur la manière d'analyser les données, veuillez consulter le mode d'emploi du BD MAX™ System.

L'analyse des données est effectuée par le logiciel BD MAX™ selon les instructions du fabricant. Le logiciel BD MAX™ rapporte les valeurs Ct et les courbes d'amplification pour chaque canal détecteur de chaque échantillon testé de la manière suivante :

- Une valeur Ct de « 0 » indique qu'il n'y a pas de valeur Ct calculée par le logiciel avec le seuil spécifié (voir tableau 3). Une courbe d'amplification de l'échantillon affichant une valeur Ct de « 0 » doit faire l'objet d'un examen manuel.
- Une valeur Ct de « -1 » indique qu'aucun processus d'amplification n'a eu lieu.
- Toute autre valeur Ct doit être interprétée en corrélation avec la courbe d'amplification et selon les directives d'interprétation des échantillons énoncées dans le tableau 6.

Vérifiez le signal du contrôle interne pour vous assurer du fonctionnement correct du mélange d'amplification. Vérifiez en outre qu'il n'y a pas de rapport de défaillance du BD MAX™ System.

Il convient de lire et d'analyser les résultats à l'aide du tableau suivant :

B. pertussis/ B. holmesii (475/520)	B. holmesii (585/630)	B. parapertussis (630/665)	Contrôle interne (530/565)	Interprétation
+	+	+	+/- ¹	ADN détecté pour B. pertussis and/or B. holmesii et B. parapertussis ¹
-	-	-	+ ²	ADN non détecté pour B. pertussis and/or B. holmesii et B. parapertussis ²
+	-	-	+/- ¹	ADN détecté pour B. pertussis, ADN non détectés pour B. holmesii et B. parapertussis¹
+	+	-	+/- ¹	ADN détectés pour B. pertussis et/ou B. holmesii et ADN non détecté pour B. parapertussis¹
+	-	+	+/- ¹	ADN détectés pour B. pertussis et B. parapertussis et ADN non détecté pour B. holmesii¹
-	+ ³	-	+/- ¹	ADN détecté pour B. holmesii et ADN non détectés pour B. pertussis et B. parapertussis¹
-	+ ³	+	+/- ¹	ADN détectés pour B. holmesii et B. parapertussis et ADN non détecté pour B. pertussis¹
-	-	+	+/- ¹	ADN détecté pour B. parapertussis et ADN non détectés pour B. pertussis et B. holmesii¹
-	-	-	- ²	Résultat non résolu (UNR) obtenu en présence d'inhibiteurs de la réaction polymérase ou en cas de problème d'ordre général (non signalé par un code d'erreur) survenu lors du traitement de l'échantillon et/ou des étapes d'amplification.²
IND	IND	IND	IND	Résultat de test indéterminé (IND, Indeterminate assay result) En raison d'une défaillance du BD MAX™ System. Résultat du test affiché lorsqu'une défaillance de l'instrument est liée à un code d'erreur.
INC	INC	INC	INC	Résultat de test incomplet (INC, Incomplete assay result) En raison d'une défaillance du BD MAX™ System. Résultat du test affiché en cas de défaillance de l'exécution complète.

Tableau 15. Interprétation de l'échantillon.

+ : l'amplification a eu lieu.

- : l'amplification n'a pas eu lieu.

1 Un échantillon est jugé positif si la valeur Ct obtenue est ≤ 40 . Le contrôle interne (CI) peut afficher ou non un signal d'amplification. Parfois, la détection par CI ne s'avère pas nécessaire parce qu'un nombre élevé de copies de la cible peut entraîner une amplification préférentielle des acides nucléiques spécifiques à la cible.

2 Un échantillon est jugé négatif s'il ne montre aucun signal d'amplification dans le système de détection et si le contrôle interne est positif (valeur Ct ≤ 35). L'inhibition de la réaction polymérase peut être exclue par l'amplification du contrôle interne. En cas de résultats non résolus (UNR), d'absence de signal du contrôle interne dans un échantillon négatif, il est recommandé de recommencer le test en suivant les indications ci-dessous.

3 L'ADN de *B. holmesii* est détecté dans deux canaux différents, 475/520 (FAM) et 585/630 (ROX), mais en raison de la plus grande sensibilité du 585/630 (ROX) dans les échantillons positifs autour de la LoD, il est possible d'obtenir un signal uniquement dans ce canal.

Si le résultat reste ambigu, il est recommandé de revoir le mode d'emploi, le processus d'extraction mis en œuvre par l'utilisateur, de vérifier la bonne exécution de chaque étape de la PCR et de revoir les paramètres, et enfin, de vérifier la forme sigmoïde de la courbe et l'intensité de la fluorescence.

REMARQUE : on dispose d'un volume suffisant du Sample Buffer Tube (tube de tampon d'échantillon) pour recommencer un test. Pour les BD MAX™ Sample Buffer Tubes (tubes de tampon d'échantillon) préparés et conservés à 2–8 °C ou 25 °C, le nouveau test doit avoir lieu dans les 24 heures.

Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.

10. Limitations du test

- Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.
- Bien que ce test soit compatible avec d'autres types d'échantillons, il a été validé avec des écouvillons nasopharyngés et des aspirations nasopharyngées. Si les échantillons utilisés sont des expectorations, ils peuvent être testés selon les recommandations précitées.
- Pour une bonne exécution du test, le produit lyophilisé doit se trouver au fond du tube et ne pas adhérer à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve intégralement au fond du tube.
- Une apparence du mélange réactionnel au format stabilisé, se trouvant normalement au fond du tube, différente de celle habituelle (sans forme conique, inhomogène, de taille plus petite/plus grande et/ou de couleur autre que blanchâtre) n'altère pas la fonctionnalité du test.
- La bonne exécution du test dépend de la qualité de l'échantillon ; l'acide nucléique doit être correctement extrait des échantillons cliniques.
- Ce test est un test qualitatif. En tant que tel, il ne fournit pas de valeurs quantitatives ni n'indique le nombre d'organismes présents.
- Il est possible que soient détectés des niveaux très faibles de cibles, inférieurs à la limite de détection, mais que les résultats ne soient pas reproductibles.
- Possibilité de faux positifs dus à une contamination croisée par des échantillons avec une suspicion de *Bordetella* contenant de fortes concentrations de l'ADN cible ou à cause d'une contamination par transmission à partir de produits PCR de réactions antérieures.
- La combinaison spécifique d'amorce et de sonde pour la détection des séquences IS481, hIS1001 et pIS1001 utilisée dans le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ne présente pas d'homologies combinées significatives avec le génome humain, la microflore humaine ou d'autres microorganismes respiratoires, susceptibles d'entraîner un résultat faux positif prévisible.
- Les résultats faux négatifs peuvent être le fait de plusieurs facteurs et de leurs combinaisons, notamment :
 - Des méthodes de prélèvement, de transport, de stockage et/ou de manipulation des échantillons inappropriées.
 - Des procédures de traitement inappropriées (notamment l'extraction d'ADN).
 - La dégradation de l'ADN durant l'expédition, le stockage et/ou le traitement de l'échantillon.
 - Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent affecter la détection d'un souche nouveau ou inconnu du *Bordetella*.
 - Niveaux d'organismes dans l'échantillon inférieurs à la limite de détection pour le test.
 - La présence d'inhibiteurs de qPCR ou d'autres types de substances interférentes.
 - Le non-respect des consignes d'utilisation et de la procédure de test.

- Un résultat de test positif ne traduit pas nécessairement la présence de bactéries viables et n'implique pas que ceux-ci soient infectieux ou soient les agents responsables des symptômes cliniques. Toutefois, un résultat positif indique la présence de séquences *Bordetella* cibles.
- Si les tests de diagnostic d'autres maladies respiratoires sont négatifs et que la présentation clinique du patient et les informations épidémiologiques suggèrent la possibilité d'une infection par *B. pertussis*, *B. parapertussis* et/ou *B. holmesii*, il convient d'envisager un résultat faux négatif et un nouveau test pour le patient.
- Un résultat négatif n'exclut pas la présence de l'ADN du *B. pertussis*, *B. parapertussis* et/ou *B. holmesii* dans un échantillon clinique. Si les observations cliniques, les antécédents du patient et les informations épidémiologiques suggèrent une infection par *B. pertussis*, *B. parapertussis* et/ou *B. holmesii*, il convient d'envisager un nouveau test en augmentant le volume de l'échantillon.
- En cas de résultats non résolus, indéterminés ou incomplets avec le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, l'exécution d'un nouveau test est exigée. Les résultats non résolus peuvent découler de la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ou d'une réhydratation incorrecte du tube de mélange réactionnel lyophilisé. En cas de défaillance de l'instrument, les résultats obtenus seront indéterminés ou incomplets.

11. Contrôle qualité

Le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient, dans chaque tube réactionnel, un contrôle interne (CI) qui confirme la bonne performance de la technique.

12. Caractéristiques du test

12.1. Sensibilité et spécificité cliniques

La performance clinique du VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été testée avec des échantillons cliniques nasopharyngés enrichis déjà caractérisés comme étant positifs ou négatifs pour *B. pertussis*, *B. parapertussis* et/ou *B. holmesii*. Les résultats étaient les suivants :

	Site	Type d'échantillon	Flux de travail	Cible
1	CerTest Biotec (Saragosse, Espagne)	Écouvillons (Cerba Xpert) nasopharyngés	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>B. pertussis</i>
2		Aspirations (Cerba Xpert) nasopharyngées		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
3		Aspirations et écouvillons (Cerba Xpert) nasopharyngés		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
4		Écouvillons (Eurofins) nasopharyngés		<i>B. pertussis</i>
5		Écouvillons (Cerba Xpert+ Eurofins + échantillons simulés) nasopharyngés		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>

Tableau 16. Site, type d'échantillon, flux de travail et cible.

Les résultats vrais positifs et vrais négatifs, les résultats faux positifs et faux négatifs, la sensibilité et la spécificité pour le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ont été calculées par rapport à chaque test comparateur, comme indiqué dans le tableau suivant :

Site	Test comparateur	Cible	TP	TN	FP	FN	Sensibilité	Spécificité
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)	1 (0,98-1)
4	Test mixte <i>pertussis/parapertussis</i> validé en interne	<i>B. pertussis</i>	43	54	0	3	0,935 (0,821-0,986)	1 (0,966-1)
5	Caractérisation* interne	<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)

Tableau 17. Résultats TP (vrais positifs) et TN (vrais négatifs), résultats FP (faux positifs) et FN (faux négatifs), sensibilité, spécificité pour le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

* La caractérisation initiale comprend le test SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) et le Test mixte *pertussis/parapertussis* validé en interne pour la détection de *B. pertussis* et *B. parapertussis*, et les test SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm) pour la détection de *B. holmesii*, dans les échantillons Cerba Xpert.

Les résultats montrent une concordance élevée pour la détection du *B. pertussis*, *B. parapertussis* et/ou *B. holmesii* avec le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilité analytique

Le VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a une limite de détection (LoD) de 1,2 CFU/mL d'échantillon pour *B. pertussis*, et 4×10^{-2} CFU/mL d'échantillon pour *B. holmesii* et 12 CFU/mL pour *B. parapertussis*, avec un taux positif ≥ 95 % pour les écouvillons nasopharyngés.

Figure 5. Dilution en série de *Bordetella pertussis* ($7,07 \times 10^4$ - $7,07 \times 10^{-3}$ CFU par réaction) modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 475/520 [FAM]).

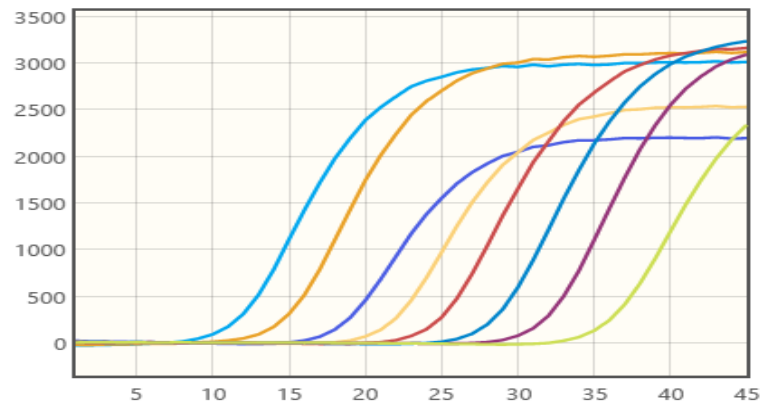


Figure 6. Dilution en série de *Bordetella holmesii* ($2,42 \times 10^3$ - $2,42 \times 10^{-4}$ CFU par réaction) modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 475/520 [FAM]).

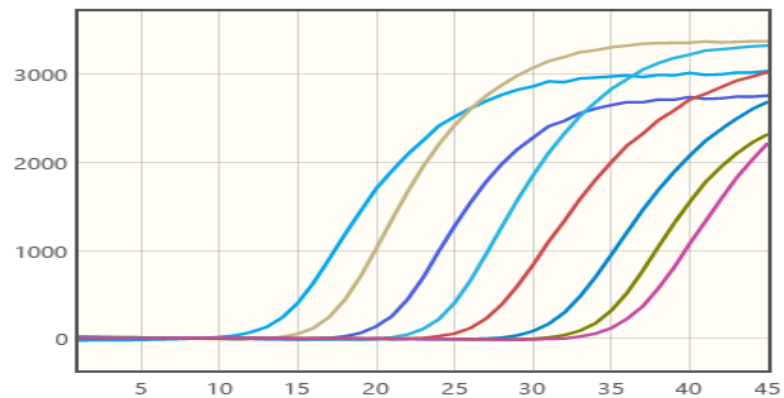


Figure 7. Dilution en série de *Bordetella holmesii* ($2,42 \times 10^3$ - $2,42 \times 10^{-4}$ CFU par réaction) modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 585/630 [ROX]).

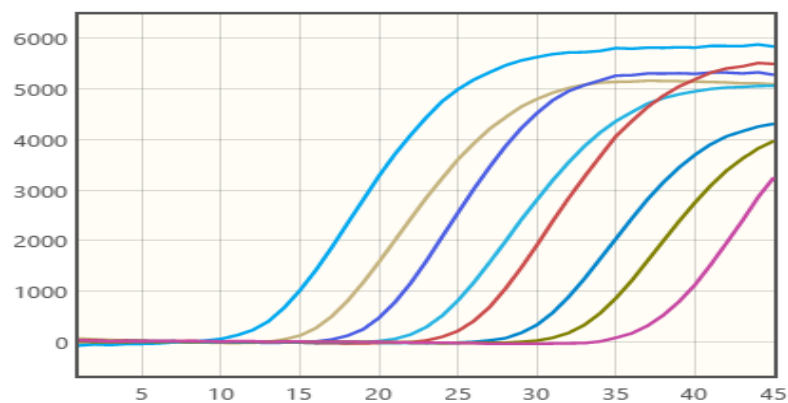
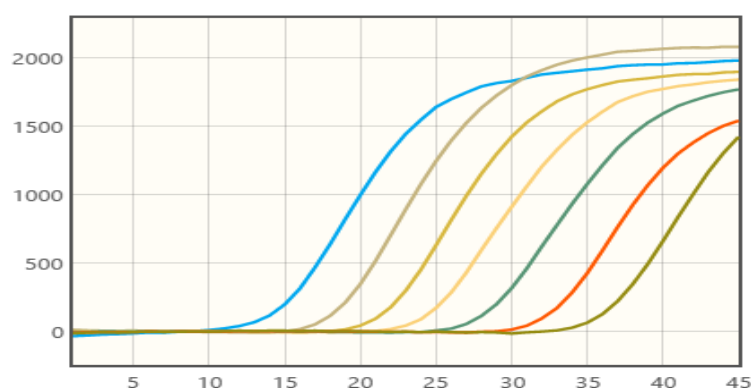


Figure 8. Dilution en série de *Bordetella parapertussis* ($7,07 \times 10^4$ - $7,07 \times 10^{-2}$ CFU par réaction) modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 630/665 [Cy5]).



12.3. Spécificité analytique

La spécificité du test ciblant la présence du *Bordetella* a été confirmée par l'analyse d'un panel composé de différents microorganismes associés aux maladies respiratoires. Aucune réactivité croisée n'a été détectée entre les microorganismes testés suivants :

Test de réactivité croisée					
Adénovirus humains types 1-5, 8, 15, 31, 40 et 41	-	Virus influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
Bocavirus	-	Virus influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Sérogroupe 1 <i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Virus influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175	-	Coronavirus MERS	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Virus influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Méta-pneumovirus humain A et B	-
Génotype <i>Chlamydia psittaci</i> A et C	-	Virus influenza A/Turkey/Germany/R2485+86/2014 (H5N8)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i> souche CM-1	-	Virus influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (Clade 3C2a.1)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Coronavirus humain 229E, OC43 et NL63	-	Virus influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Virus parainfluenza humains 1, 2, 3 et 4	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Virus influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 et g885652	-
Virus influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Virus influenza B/Florida/04/06	-	Virus respiratoire syncytial (RSV) types A et B	-
Virus influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Virus influenza B/Phuket/3073/2013	-	Rhinovirus humain	-
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella bozemanii</i> sérovar 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Virus influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Virus influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-		-

Tableau 18. Microorganismes pathogènes de référence utilisés dans cette étude.











12.4. Réactivité analytique

La réactivité du VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été évaluée par rapport à l'ADN extrait des *B. pertussis*, *B. parapertussis*, et *B. holmesii* ayant servis de modèles, montrant des résultats positifs.

Bibliography/ Bibliographie

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/ Symboles pour les composants IVD et réactifs

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Dispositif de diagnostic <i>in vitro</i>	 Keep dry Conserver dans un endroit sec	 Use by Utiliser avant	 Manufacturer Fabricant	 LOT Batch code Numéro de lot
 i	Consult instructions for use Consulter les consignes d'utilisation	 Temperature limitation Temperature limitation	 Contains sufficient for <n> test Contains sufficient for <n> test	 UDI Unique Device Identification Unique Device Identification	 REF Catalogue number Catalogue number

Trademarks

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

Change Control / Contrôle des modifications		
Version No. / Version n°	Changes / Modifications	Date / Date
00	Original version / Version originale.	29/06/2022

Table A 2. Control change table/ Tableau de contrôle des modifications.

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