

# VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



*Bordetella*  
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Le presenti istruzioni per l'uso si applicano al seguente prodotto:

PRODUCT / PRODOTTO	REFERENCE / CODICE
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. / Codice del prodotto da usare con il BD MAX™ System.

**NOTE:** Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Le istruzioni per l'uso (IFU) sono incluse nel kit in lingua inglese/Spagnolo.

**EN** For download IFUs from other languages, please enter in [certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**ES** Para descargar las IFUS en otros idiomas, por favor, entre en [certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**DA** For at downloade IFUS fra andre sprog, skal du gå ind på [certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**DE** Um den IFUS in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu [certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**FR** Pour télécharger l'IFUS dans d'autres langues, veuillez vous rendre sur [certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**IT** Per scaricare l'IFUS in altre lingue, vai su [certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**NO** For å laste ned IFUS fra andre språk, vennligst skriv inn i [certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**PT** Para baixar o IFUS em outros idiomas europeus, acesse [certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**SV** För att ladda ner IFUS från andra språk, vänligen gå in på [certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**TR** IFUS'u diğer dillerden indirmek için lütfen [certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es) adresinden iletişime geçin.

Contact [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es) if your language is not on the list / Contattare [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es) se la propria lingua non è presente nell'elenco.

*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.*

*Nota: L'utente deve segnalare al produttore e alle autorità competenti dello Stato membro in cui si trova come utente e/o paziente qualunque grave incidente relativo al prodotto.*

## 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

## Sommario

1.	Usò previsto.....	19
2.	Introduzione e spiegazione .....	19
3.	Principi del procedimento.....	19
4.	Reagenti forniti .....	20
5.	Reagenti e strumenti necessari e non inclusi .....	20
6.	Condizioni di trasporto e conservazione .....	21
7.	Precauzioni per gli utenti .....	21
8.	Procedura di test.....	22
8.1.	Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni.....	22
8.2.	Preparazione del campione ed estrazione del DNA .....	23
8.3.	Protocollo PCR.....	23

---

9.	Interpretazione dei risultati .....	27
10.	Limiti del test .....	28
11.	Controllo di qualità .....	29
12.	Caratteristiche del test .....	29
12.1.	Sensibilità e specificità clinica .....	29
12.2.	Sensibilità analitica.....	31
12.3.	Specificità analitica .....	32
12.4.	Reattività analitica .....	32
	Bibliography/Bibliografia .....	33
	Symbols for IVD components and reagents/Simboli per reagenti e componenti IVD .....	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. 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.

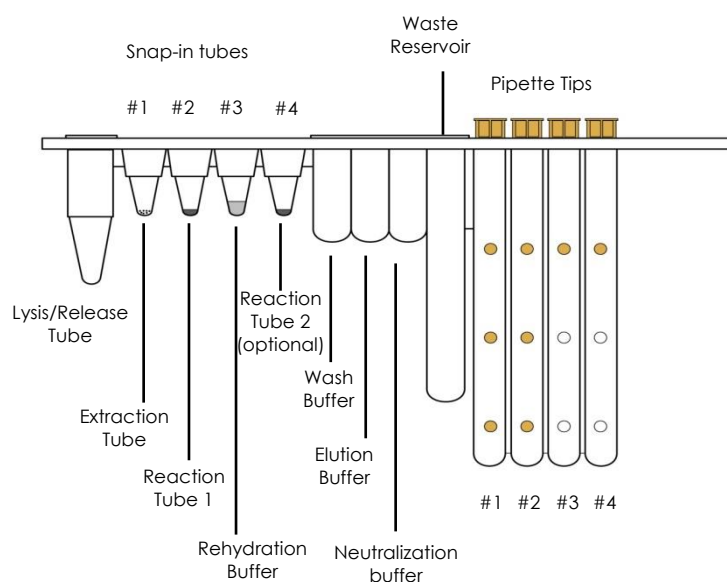
- 12) Click the "Save Test" button.

### 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
+	+	+	+/- <sup>1</sup>	<i>B. pertussis</i> and/or <i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Detected <sup>1</sup>
-	-	-	+ <sup>2</sup>	<i>B. pertussis</i> , <i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Not Detected <sup>2</sup>
+	-	-	+/- <sup>1</sup>	<i>B. pertussis</i> DNA Detected, <i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Not Detected <sup>1</sup>
+	+	-	+/- <sup>1</sup>	<i>B. pertussis</i> and/or <i>B. holmesii</i> DNA Detected, <i>B. parapertussis</i> DNA Not Detected <sup>1</sup>
+	-	+	+/- <sup>1</sup>	<i>B. pertussis</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Detected, <i>B. holmesii</i> DNA Not Detected <sup>1</sup>
-	+ <sup>3</sup>	-	+/- <sup>1</sup>	<i>B. holmesii</i> DNA Detected, <i>B. pertussis</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Not Detected <sup>1</sup>
-	+ <sup>3</sup>	+	+/- <sup>1</sup>	<i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Detected, <i>B. pertussis</i> DNA Not Detected <sup>1</sup>
-	-	+	+/- <sup>1</sup>	<i>B. parapertussis</i> DNA Detected, <i>B. pertussis</i> and <i>B. holmesii</i> DNA Not Detected <sup>1</sup>
-	-	-	- <sup>2</sup>	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. <sup>2</sup>
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)
		<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*,  $4 \times 10^{-2}$  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* ( $7.07 \times 10^4$  -  $7.07 \times 10^{-3}$  CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

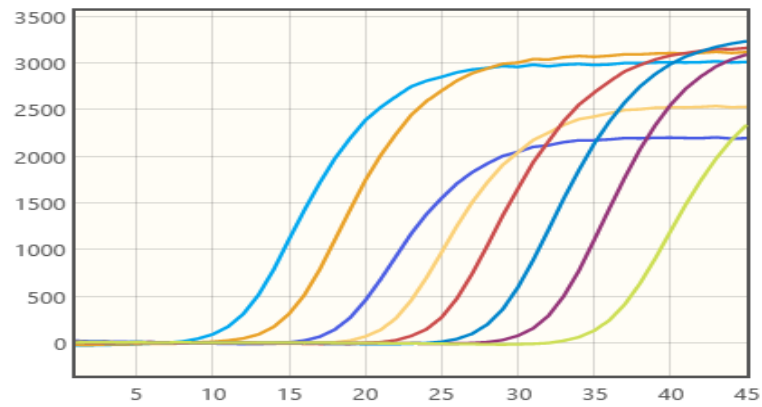


Figure 2. Dilution series of *Bordetella holmesii* ( $2.42 \times 10^3$  -  $2.42 \times 10^{-4}$  CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

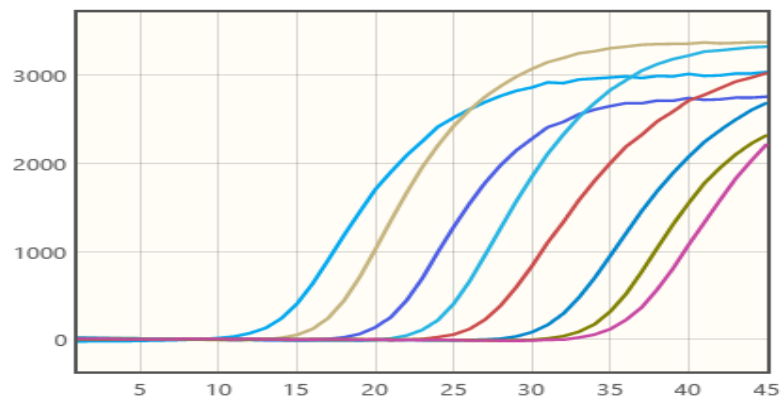


Figure 3. Dilution series of *Bordetella holmesii* ( $2.42 \times 10^3$  -  $2.42 \times 10^{-4}$  CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

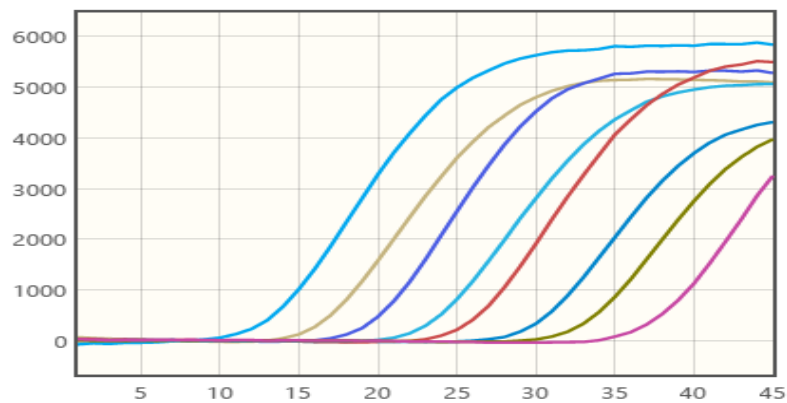
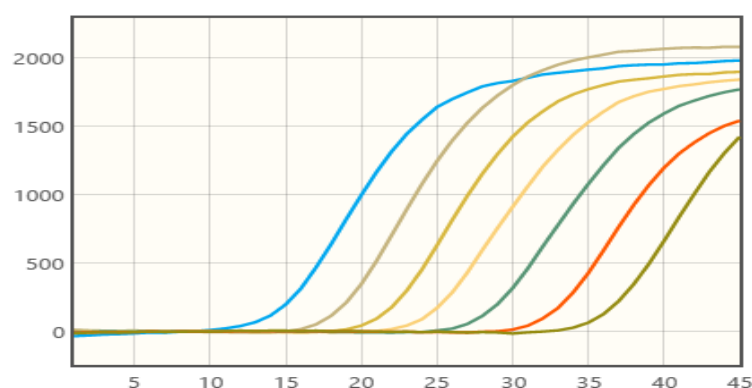


Figure 4. Dilution series of *Bordetella parapertussis* ( $7.07 \times 10^4$  -  $7.07 \times 10^{-2}$  CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



### 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.

## ITALIANO

---

### 1. Uso previsto

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è un test automatizzato di real-time PCR realizzato per il rilevamento e differenziazione qualitativa di DNA da *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e/o *Bordetella holmesii* in campioni respiratori (tamponi nasofaringei e aspirati nasofaringei) di pazienti con sospetta infezione respiratoria segnalati dai loro medici curanti. L'uso previsto di questo test è quello di facilitare l'identificazione di *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e/o *Bordetella holmesii* in combinazione con i segni clinici e i sintomi del paziente e i fattori di rischio epidemiologico. Questo test utilizza il BD MAX™ System per l'estrazione automatizzata del DNA e la successiva real-time PCR, utilizzando i reagenti forniti insieme ai reagenti universali e ai materiali di consumo del BD MAX™ System. Il DNA viene estratto dai campioni respiratori, amplificato utilizzando una PCR in real-time e rilevato attraverso sonde marcate da un colorante fluorescente specifiche per *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella holmesii*.

### 2. Introduzione e spiegazione

Il gene *Bordetella* si compone di 8 specie, 4 delle quali sono note per infettare l'uomo: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* e *B. bronchiseptica*. La causa più importante di pertosse (pertussis) è l'infezione da *B. pertussis*, seguita dall'infezione da *B. parapertussis*. *B. holmesii* è stato isolato nei pazienti con una grave patologia concomitante, mentre *B. bronchiseptica* viene di solito rilevato negli animali e solo occasionalmente è stato isolato in pazienti immunodepressi.

La pertosse è una malattia molto contagiosa che si diffonde da persona a persona attraverso la tosse o lo starnuto, o in seguito a stretto contatto con una persona infetta in un luogo chiuso. Il decorso clinico della patologia si divide in tre stadi, che includono le seguenti caratteristiche cliniche: catarrale (rinite, febbre bassa, tosse lieve e occasionale), parossistico (parossismo con numerosi e rapidi attacchi di tosse incontrollabile, cianosi, vomito e spossatezza) e convalescente (recupero graduale e parossismo meno persistente).

Nonostante il vaccino, la pertosse rimane endemica in molte aree del mondo. È richiesta una diagnosi affidabile per poter iniziare un trattamento appropriato e, se necessario, la profilassi dei contatti, soprattutto nei neonati non vaccinati per i quali la pertosse rappresenta una malattia potenzialmente mortale. I test di amplificazione degli acidi nucleici, inclusa la PCR e i più recenti real-time PCR, risolvono alcuni dei limiti dei metodi di coltura e sierologici per la diagnosi di infezione da *Bordetella*. La maggior parte dei test di PCR si basano sul rilevamento di sequenze di inserzione (IS) presenti in numerose copie per ogni genoma, aumentando la sensibilità dei test di PCR.

### 3. Principi del procedimento

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è un test realizzato per il rilevamento qualitativo e la differenziazione di DNA da *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e/o *Bordetella holmesii* in campioni respiratori. Dopo l'isolamento del DNA, l'identificazione dei ceppi di *Bordetella* viene eseguita dall'amplificazione di una regione conservata delle sequenze di inserzione IS481 per *Bordetella pertussis/holmesii*,

pIS1001 per *Bordetella parapertussis* e hIS1001 per *Bordetella holmesii*, utilizzando primer specifici e una sonda marcata a fluorescenza.

Il VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System si basa sull'attività esonucleasica 5' delle DNA polimerasi. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima idrolizza la sonda legata alla sequenza complementare di DNA, separando il quencher dal marcatore. Questa reazione genera un aumento del segnale fluorescente proporzionale alla quantità del modello target. Questa fluorescenza viene misurata sul BD MAX™ System.

Il VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene in ciascuna provetta tutti i componenti necessari per un test di real-time PCR (primer/sonde specifici, dNTP, tampone, polimerasi) in formato stabilizzato e un controllo interno per monitorare il processo di estrazione e/o l'inibizione dell'attività della polimerasi.

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

Tabella 10. Target, canale e geni.

## 4. Reagenti forniti

Il VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System include i seguenti materiali e reagenti illustrati nella Tabella 2:

Reagente/Materiale	Descrizione	Codice a barre	Quantità
<i>Bordetella</i> reaction tube	Una miscela di enzimi, sonde primer, tampone, dNTP, stabilizzatori e controllo interno in formato stabilizzato	sigillo 1C	2 confezioni da 12 provette trasparenti
Rehydration Buffer tube	Soluzione per ricostituire il prodotto stabilizzato	Sigillo 11	1 confezione da 24 provette trasparenti

Tabella 11. Reagenti e materiali forniti nel VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con num. di catalogo VS-BDT124 (444204).

## 5. Reagenti e strumenti necessari e non inclusi

Il seguente elenco include i materiali e gli strumenti richiesti per l'uso e che non sono inclusi nel VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Strumento per Real-time PCR: BD MAX™ System (Cod.: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Cod.: 442827 o 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Cod.: 437519).
- Vortex.
- Micropipette (tra i 2 e i 1000 µL).
- Acqua priva di nucleasi.
- Ponte con filtro.

- Guanti monouso privi di talco.

## 6. Condizioni di trasporto e conservazione

- I kit possono essere spediti e conservati a 2-40 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Dopo l'apertura delle confezioni in alluminio che contengono le provette di reazione, il prodotto può essere utilizzato fino a un massimo di 28 giorni.

## 7. Precauzioni per gli utenti

- Il prodotto è destinato all'uso esclusivamente da parte di utilizzatori professionali, come professionisti sanitari e tecnici di laboratorio, formati nell'impiego di tecniche di biologia molecolare.
- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Non utilizzare reagenti e/o materiali scaduti.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la scatola protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la confezione protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'interno della loro confezione il materiale essiccante non è presente o è rotto.
- Non rimuovere il materiale essiccante dalla confezione dei reagenti.
- Chiudere la confezione protettiva dei reagenti con la cerniera subito dopo ogni utilizzo. Rimuovere l'aria in eccesso dalle confezioni prima di sigillarle.
- Non utilizzare reagenti se il sigillo metallico è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti.
- Proteggere i reagenti dall'umidità. L'esposizione prolungata all'umidità può influire sulle prestazioni del prodotto.
- Tenere i componenti lontano dalla luce.
- Nel caso in cui vengano eseguiti altri test di PCR nella stessa area del laboratorio, assicurarsi che il VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, il kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3, i reagenti aggiuntivi richiesti per il test e il sistema BD MAX™ non siano contaminati. Evitare sempre la contaminazione dei reagenti con microbi e ribonucleasi (RNasi)/desossiribonucleasi (DNasi). Si consiglia l'uso di puntali per pipette di trasferimento positivi o resistenti agli aerosol e privi di RNasi/DNasi. Usare un nuovo puntale per ogni campione. È necessario cambiarsi i guanti prima di manipolare reagenti e cartucce (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Per evitare la contaminazione dell'ambiente da parte di amplicon, non disassemblare la BD MAX™ PCR Cartridge dopo l'uso. I sigilli della BD MAX™ PCR Cartridge sono progettati per prevenire la contaminazione.
- Progettare un flusso di lavoro unidirezionale. Deve iniziare nell'area di estrazione e poi spostarsi nell'area di amplificazione e rilevamento. Non riportare campioni, strumenti e reagenti nell'area in cui è stato eseguito il passaggio precedente.
- Rispettare le buone pratiche di laboratorio. Indossare indumenti protettivi e utilizzare guanti monouso, occhialini e mascherina. Non mangiare, bere, fumare o applicare prodotti cosmetici all'interno dell'area di lavoro. Lavarsi le mani al termine del test.

- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi e/o a rischio biologico, così come i reagenti e i materiali che sono stati esposti ai campioni e devono essere gestiti nel rispetto delle normative di sicurezza nazionali. Prendere le precauzioni necessarie durante la raccolta, il trasporto, la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento dei campioni.
- I campioni e i reagenti devono essere manipolati in una cappa di biosicurezza. Usare personal protective equipment (PPE) compatibili con le linee guida correnti per la manipolazione dei campioni potenzialmente infettivi. Smaltire i rifiuti in conformità ai regolamenti locali e nazionali.
- Si raccomanda una decontaminazione degli strumenti utilizzati abitualmente, soprattutto le micropipette e le superfici di lavoro.
- In conformità con il regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kit non richiede una scheda dati sulla sicurezza (Safety Data Sheet) dei materiali a causa della sua classificazione come non pericoloso per la salute e per l'ambiente, perché non contiene sostanze e/o miscele che soddisfano i criteri di classificazione dei rischi riportati nel Regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP) o presenti a concentrazioni superiori al valore definito nel regolamento sopra menzionato in base alla relativa dichiarazione.
- Consultare il manuale utente del BD MAX™ System per maggiori informazioni su avvertenze, precauzioni e procedure.

## 8. Procedura di test

### 8.1. Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni

Il VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stato testato su tamponi respiratori (tamponi e aspirati nasofaringei). Altri tipi di campioni devono essere convalidati dall'utente.

La raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni devono rispettare le condizioni convalidate dall'utente. In generale, i tamponi respiratori devono essere raccolti ed etichettati adeguatamente con o senza mezzo di trasporto (in base alla tipologia di campione) ed esaminati il prima possibile per garantire la qualità del test. Gli aspirati nasofaringei devono essere trasportati tra i 2 e gli 8 °C entro le prime 72 ore, nel rispetto delle normative locali e nazionali per il trasporto di materiale patogeno. Per i trasporti di lunga durata (oltre 72 ore), raccomandiamo una spedizione a -20 °C o a temperatura inferiore. Tuttavia, i tamponi nasofaringei nello Universal Transport media (UTM) devono essere trasportati a una temperatura pari a -20 °C o inferiore. Per effettuare il test, è consigliato l'utilizzo di campioni appena raccolti. I campioni possono essere conservati da 2 a 8 °C fino a un massimo di 72 ore (aspirati nasofaringei) oppure congelati a -20 °C o idealmente a -70 °C (in UTM). Devono essere evitati cicli ripetuti di congelamento-scongelo per evitare il deterioramento dei campioni e degli acidi nucleici.

I campioni respiratori devono essere prelevati, trasportati e conservati in conformità alle linee guida di laboratorio appropriate. Per maggiori dettagli, fare riferimento alle linee guida CDC (CDC's Infectious diseases laboratory test directory (2022)). Sito web <https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/cdc-lab-tests.pdf> e alle linee guida IDSA (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).

Nel caso di utilizzo di campioni di sputum, è possibile testarli secondo le raccomandazioni descritte di seguito.

## 8.2. Preparazione del campione ed estrazione del DNA

Preparare il campione nel rispetto delle raccomandazioni presenti nelle istruzioni d'uso del kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipettare 200 µL di campione in una provetta di tampone campione del kit BD MAX™ ExK™ TNA-3 e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Effettuare una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con l'azionamento del BD MAX™ System.

Le procedure di preparazione dell'estrazione per applicazioni specifiche devono essere sviluppate e convalidate dall'utente e altri tipi di campioni potrebbero richiedere un pretrattamento. Per esempio, per i campioni di sputum aggiungere acetilcisteina (raccomandata N-Acetyl-L-cysteine Ref. A7250, Merck KGaA) al campione in rapporto 1:1 (per es. 250 µl di sputum e 250 µl di acetilcisteina per 100 mg/ml), miscelare utilizzando il vortex e riscaldare a 95 °C per 10 minuti. Pipettare 200 µL di sputum pretrattato in una provetta di tampone campione del kit BD MAX™ ExK™ TNA-3 e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Effettuare una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con l'azionamento del BD MAX™ System.

## 8.3. Protocollo PCR

Nota: consultare il manuale utente del BD MAX™ System per istruzioni dettagliate.

### 8.3.1. Creare il programma di test di PCR per il VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: Se avete già creato il test per il VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, potete saltare il passaggio 8.3.1 e passare direttamente all'8.3.2.

- 1) Nella schermata "Run" (Esegui) del BD MAX™ System, selezionare la scheda "Test Editor" (Modifica test).
- 2) Cliccare sul pulsante "Create" (Crea).
- 3) Nella scheda "Basic Information" (Informazioni di base), all'interno della finestra "Test Name" (Nome test), nominare il vostro test: es. VIASURE *Bordetella*.
- 4) Nel menu a tendina "Extraction Type" (Tipo di estrazione), selezionare "ExK TNA-3".
- 5) Nel menu a tendina "Master Mix Format" (Formato master mix), scegliere "Type 5" (Tipo 5).
  - a. Nota: Il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE per BD MAX™. In questo caso selezionare "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato master mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5).
- 6) In "Sample extraction parameters" (Parametri di estrazione campione) selezionare "User defined" (Definito dall'utente) e regolare il volume del campione a 350 µl.
- 7) In "Ct Calculation" (Calcolo Ct) selezionare "Call Ct at Threshold Crossing" (Chiamare Ct al superamento del limite).

- 8) Se si utilizza un software versione 5.00 o superiore e si dispone di provette snap-in di alluminio con codice a barre, in "Custom Barcodes" (Codici a barre personalizzati) scegliere la seguente configurazione:
- "Snap-In 2 Barcode" (Codice a barre Snap-In 2): 1C (per la provetta di reazione *Bordetella* reaction tube).
  - "Snap-In 3 Barcode" (Codice a barre Snap-In 3): 11 (per la provetta del tampone di reidratazione)
  - "Snap-In 4 Barcode" (Codice a barre Snap-In 4): un'altra provetta di reazione VIASURE (sigillo diverso) se si sceglie il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato master mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1).
- 9) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni PCR) inserire i seguenti parametri: "Channel Settings" (Impostazioni canale), "Gains" (Guadagni) e "Threshold" (Limite) (Tabella 3).
- Nota: il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE for BD MAX™. In questo caso "PCR Settings" (Impostazioni PCR) e "Test Steps" (Fasi del test) devono essere completate per entrambe le posizioni 2 (verde) e 4 (blu).

Channel (Canale)	Alias (Alias)	Gain (Guadagno)	Threshold (Soglia)	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. paraptussis</i>	50	200	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	-	-	-	-

Tabella 12. "PCR settings" (Impostazioni di PCR).

Nota: come punto di partenza, si consiglia di impostare i valori soglia minimi sopraelencati per ciascun canale; tuttavia, le impostazioni finali devono essere stabilite dall'utente finale durante l'interpretazione dei risultati in modo da assicurarsi che le soglie rientrino nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza e che siano al di sopra di qualsiasi segnale di fondo. Il valore soglia per i diversi strumenti può variare a causa delle diverse intensità del segnale.

- 10) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni di PCR) inserire anche i seguenti parametri "Spectral Cross Talk" (Cross talk spettrale) (Tabella 4):

		False Receiving Channel (Canale di ricezione falso)					
		Channel (Canale)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canale di eccitazione)	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	-	

Tabella 13. Parametri "Spectral cross-talk" (Cross-talk spettrale).

- 11) Nella scheda "Test Steps" (Fasi test), inserire il protocollo PCR (Tabella 5).



Step Name (Nome fase)	Profile Type (Tipo profilo)	Cycles (Cicli)	Time (s) (Tempo (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Rilevazione)
Initial denaturation (Denaturazione iniziale)	In attesa	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturazione e appaiamento/estensione (raccolta dati))	Temperatura 2	45	10	95 °C	-
			41	63 °C	✓

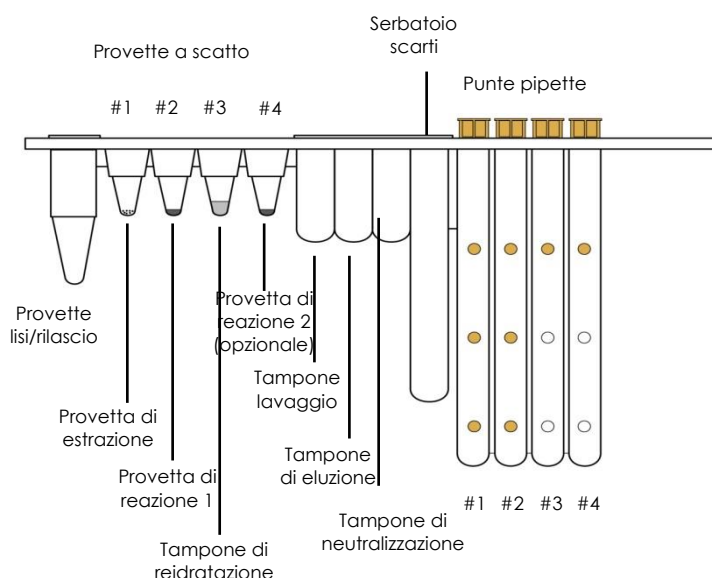
Tabella 14. Protocollo PCR.

12) Cliccare sul tasto "Save Test" (Salva test).

### 8.3.2. Preparazione della griglia BD MAX™

- 1) Per ogni campione da testare, rimuovere una Unitized Reagent Strip dal BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Picchiettare delicatamente ogni striscia su una superficie dura per assicurarsi che tutti i liquidi si trovino sul fondo delle provette, quindi posizionarle sulla griglia del BD MAX™ System.
- 2) Rimuovere il numero richiesto di provette di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sigillo bianco) dalla loro confezione protettiva. Posizionare la(e) provetta(e) di estrazione (sigillo bianco) nelle posizioni corrispondenti sulla striscia di TNA (posizione 1, codifica di colore bianco sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
- 3) Determinare e separare il numero appropriato di provette di reazione *Bordetella* reaction tube (sigillo 1C) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 2, codifica di colore verde sulla griglia. Vedere Figura 1).
  - a. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
  - b. Per effettuare una corretta reidratazione, assicurarsi che il prodotto liofilizzato si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.
    - i. Nota: Se scegliete il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato Master Mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1), determinare e separare il numero appropriato di provette di reazione VIASURE (sigillo diverso) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 4, codifica di colore blu sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
- 4) Rimuovere il numero richiesto di provette di tampone di reidratazione (sigillo 11) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 3, nessuna codifica di colore sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
  - a. Per effettuare un trasferimento corretto, assicurarsi che il liquido si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il tampone si trovi in fondo alla provetta.

Figura 1. Striscia di reagente (TNA) BD MAX™ TNA del kit BD MAX™ ExK™ TNA-3.



### 8.3.3. Configurazione dello strumento BD MAX™

- 1) Selezionare la scheda "Work List" (Lista di lavoro) sulla schermata "Run" (Esegui) del software del BD MAX™ System nella versione v4.50A o superiore.
- 2) Nel menu a tendina "Test" selezionare VIASURE *Bordetella* (se non è ancora stato creato, vedere paragrafo 8.3.1).
- 3) Selezionare il numero relativo al lotto del kit (si trova sulla confezione esterna del kit di estrazione utilizzato) dal menu a tendina (opzionale).
- 4) Inserire il numero identificativo della Sample Buffer Tube nella finestra "Sample tube" (Provetta campione) dalla "Work List" (Lista di lavoro), manualmente oppure scansionando il codice a barre.
- 5) Compilare il codice campione/paziente e/o la finestra "Accession" (Ingresso) nella "Work List" (Lista di lavoro) e cliccare sul pulsante "Save" (Salva). Continuare fino all'inserimento di tutte le Sample Buffer Tube. Assicurarsi che il codice campione/paziente e le Sample Buffer Tube corrispondano.
- 6) Posizionare la Sample Buffer Tube preparata sulle BD MAX™ Rack(s).
- 7) Caricare le griglie sul BD MAX™ System (la griglia A si trova sul lato sinistro del BD MAX™ System, la griglia B sul lato destro).
- 8) Posizionare il numero richiesto di BD MAX™ PCR Cartridges nel BD MAX™ System.
- 9) Chiudere la porta del BD MAX™ System.
- 10) Cliccare "Start Run" (Inizia operazione) per iniziare la procedura.

### 8.3.4. Report BD MAX™

- 1) Nel menu principale, cliccare sul pulsante "Results" (Risultati).
- 2) Cliccare due volte sul test in corso nella lista oppure premere il pulsante "View" (Vedi).
- 3) Cliccare su "Print" (Stampa), selezionare: "Run Details, Test Details and Plot..." (Dettagli operazione, dettagli test e grafico...)
- 4) Cliccare su "Print or Export button" (Stampa o esporta) nella schermata "Run Reports" (Esegui report).

## 9. Interpretazione dei risultati

Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, fare riferimento al manuale utente del BD MAX™ System.

L'analisi dei dati viene svolta dal software del sistema BD MAX™, sulla base delle istruzioni del produttore. Il software del sistema BD MAX™ riporta i valori di Ct e le curve di amplificazione per tutti i canali di rilevazione di ciascun campione testato nel seguente modo:

- Valore di Ct pari a 0: indica che il software non ha calcolato nessun valore di Ct nei limiti specificati (vedere Tabella 3). La curva di amplificazione del campione che presenta un valore di Ct pari a 0 deve essere controllata manualmente.
- Valore di Ct pari a -1: non si è verificato nessun processo di amplificazione.
- Qualunque altro valore di Ct deve essere interpretato in correlazione con la curva di amplificazione e nel rispetto delle linee guida di interpretazione del campione riportate nella Tabella 6.

Controllare l'emissione del segnale di controllo interno per verificare il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. Inoltre, controllare che non sia presente nessun guasto al BD MAX™ System.

I risultati devono essere letti e analizzati utilizzando la seguente tabella:

<b>B. pertussis/ B. holmesii (475/520)</b>	<b>B. holmesii (585/630)</b>	<b>B. parapertussis (630/665)</b>	<b>Controllo interno (530/565)</b>	<b>Interpretazione</b>
+	+	+	+/- <sup>1</sup>	<b>DNA di B. pertussis e/o B. holmesii e B. parapertussis rilevato<sup>1</sup></b>
-	-	-	+ <sup>2</sup>	<b>DNA di B. pertussis, B. holmesii e B. parapertussis Non rilevato<sup>2</sup></b>
+	-	-	+/- <sup>1</sup>	<b>DNA di B. pertussis rilevato, DNA di B. holmesii e B. parapertussis non rilevato<sup>1</sup></b>
+	+	-	+/- <sup>1</sup>	<b>DNA di B. pertussis e/o B. holmesii rilevato, DNA di B. parapertussis non rilevato<sup>1</sup></b>
+	-	+	+/- <sup>1</sup>	<b>DNA di B. pertussis e B. parapertussis rilevato, DNA di B. holmesii non rilevato<sup>1</sup></b>
-	+ <sup>3</sup>	-	+/- <sup>1</sup>	<b>DNA di B. holmesii rilevato, DNA di B. pertussis e B. parapertussis non rilevato<sup>1</sup></b>
-	+ <sup>3</sup>	+	+/- <sup>1</sup>	<b>DNA di B. holmesii e B. parapertussis rilevato, DNA di B. pertussis non rilevato<sup>1</sup></b>
-	-	+	+/- <sup>1</sup>	<b>DNA di B. parapertussis rilevato, DNA di B. pertussis e B. holmesii non rilevato<sup>1</sup></b>
-	-	-	- <sup>2</sup>	<b>Un risultato non risolto (UNR) ottenuto in presenza di inibitori nella reazione PCR o quando si verifica un problema generale (non segnalato da un codice di errore) con le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione.<sup>2</sup></b>
IND	IND	IND	IND	<b>Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel BD MAX™ System. Visualizzazione del risultato del test in caso di guasto dello strumento collegato ad un codice di errore.</b>
INC	INC	INC	INC	<b>Risultato test incompleto (INC). Dovuto a guasto nel BD MAX™ System. Visualizzazione del risultato del test in caso di mancato completamento del test.</b>

Tabella 15. Interpretazione del campione.

+: Curva di amplificazione presente.

-: Senza curva di amplificazione.

**1** Un campione viene considerato positivo se il valore ottenuto di Ct è  $\leq 40$ . A volte, il controllo interno (CI) può non mostrare un segnale di amplificazione. A volte il rilevamento del CI non è necessario perché la presenza di un elevato numero di copie del target può provocare l'amplificazione preferenziale di acidi nucleici target-specifici.

**2** Un campione viene considerato negativo se non mostra un segnale di amplificazione nel sistema di rilevamento ma il controllo interno è positivo ( $Ct \leq 35$ ). Un'inibizione della reazione di PCR può essere esclusa dall'amplificazione del controllo interno. In caso di risultati non risolti (UNR) con assenza di un segnale di controllo interno in un campione negativo, è raccomandabile ripetere il test seguendo queste indicazioni.

**3** Il DNA di *B. holmesei* viene rilevato in due diversi canali 475/520 (FAM) e 585/630 (ROX), ma a causa di una sensibilità maggiore di 585/630 (ROX) nei campioni positivi per il LoD è possibile ottenere segnali solo su quel canale.

In caso di un risultato ambiguo continuo, si raccomanda di rileggere le istruzioni per l'uso e la procedura di estrazione usata dall'utente, di verificare la corretta esecuzione di ciascun passaggio del test PCR e di rivedere i parametri. Infine, si raccomanda di verificare la forma sigmoide della curva e l'intensità della fluorescenza.

NOTA: il volume contenuto nella Sample Buffer Tube è sufficiente per ripetere un test. Per le provette preparate di tampone campione BD MAX™ conservate a 2–8 °C o a 25 °C, il nuovo test deve essere eseguito entro 24 ore.

I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.

## 10. Limiti del test

- I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.
- Nonostante questo test possa essere utilizzato con altri tipi di campioni, è stato convalidato con tamponi nasofaringei e aspirati nasofaringei. Nel caso di utilizzo di campioni di sputum, è possibile testarli secondo le raccomandazioni sopra descritte.
- Per prestazioni del test ottimali, il prodotto liofilizzato deve trovarsi in fondo alla provetta e non deve aderire alla parte superiore della provetta o del sigillo di alluminio. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.
- Se la miscela di reazione in formato stabilizzato, normalmente presente in fondo alla provetta, ha un aspetto diverso da quello solito (senza forma conica, non omogenea, più piccola/più grande e/o di colore differente dal biancastro) non altera la funzionalità del test.
- La qualità del test dipende dalla qualità del campione: gli acidi nucleici devono essere estratti in modo appropriato dai campioni clinici.
- Questo test è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi né indica il numero di microrganismi presenti.
- Possono essere rilevati livelli estremamente bassi al di sotto del limite di rilevamento, ma i risultati non possono essere riproducibili.
- Esiste la possibilità di falsi positivi a causa della contaminazione incrociata con *campioni con sospetta Bordetella*, di concentrazioni elevate di DNA bersaglio oppure di contaminazione dovuta ai prodotti della PCR di reazioni precedenti.
- Le combinazioni specifiche di primer e sonda per il rilevamento delle sequenze IS481, hIS1001 e pIS1001 utilizzate in VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System non mostrano significative

omologie combinate con il genoma umano, con la microflora umana o altri microorganismi respiratori, che potrebbero portare ad un falso positivo prevedibile.

- I risultati falsi negativi possono essere dovuti a diversi fattori e a combinazioni di essi; questi includono:
  - Metodi di prelievo, trasporto, considerazione e/o manipolazione dei campioni in corretto.
  - Procedure di preparazione incorrette (inclusa l'estrazione di DNA).
  - Degradazione del DNA durante l'invio/la conservazione e/o la preparazione dei campioni.
  - Mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono influenzare il rilevamento di ceppi nuovi o sconosciuti di *Bordetella*.
  - Livelli di organismi nel campione al di sotto del limite di rilevamento per il test.
  - Presenza di inibitori della qPCR o di altri tipi di sostanze interferenti.
  - Mancata aderenza alle istruzioni per l'uso e alla procedura per il test.
- Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di un batterio vitale e non implica che questo batterio sia infettivo o sia l'agente eziologico dei sintomi clinici. Tuttavia, un risultato positivo indica la presenza delle sequenze bersaglio di *Bordetella*.
- Se i test diagnostici per altre malattie respiratorie risultano negativi e le informazioni epidemiologiche e la presentazione clinica del paziente suggeriscono la possibilità di un'infezione da *B. pertussis*, *B. parapertussis* e/o *B. holmesii*, deve essere valutata la possibilità di un risultato falso negativo e di testare nuovamente il paziente.
- Un risultato negativo non preclude la presenza di DNA di *B. pertussis*, *B. parapertussis* e/o *B. holmesii* in un campione clinico. Se l'osservazione clinica, l'anamnesi del paziente e le informazioni epidemiologiche suggeriscono un'infezione da *B. pertussis*, *B. parapertussis* e/o *B. holmesii*, deve essere valutata la possibilità di rivalutare un volume maggiore di campione.
- È richiesto un nuovo test nel caso in cui si ottengano risultati non risolti, indeterminati o incompleti utilizzando il VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. I risultati non risolti possono essere dovuti alla presenza di inibitori nel campione o a una reidratazione non corretta della provetta di miscelazione di reazione liofilizzata. Un danno agli strumenti può comportare risultati indeterminati o incompleti.

## 11. Controllo di qualità

Il VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene un controllo interno (CI) in ogni provetta di reazione, che conferma il funzionamento corretto della tecnica.

## 12. Caratteristiche del test

### 12.1. Sensibilità e specificità clinica

Le prestazioni cliniche di VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono state testate utilizzando campioni clinici e addizionati nasofaringei e aspirati nasofaringei già caratterizzati da positivi o negativi per *B. pertussis*, *B. parapertussis* e/o *B. holmesii*. I risultati sono stati i seguenti:

	Sito	Tipo di campione	Flusso di lavoro	Target
1	CerTest Biotec (Zaragoza, Spagna)	Tamponi nasofaringei (Cerba Xpert)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>B. pertussis</i>
2		Aspirati nasofaringei (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
3		Tamponi e aspirati nasofaringei (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
4		Tamponi nasofaringei (Eurofins)		<i>B. pertussis</i>
5		Tamponi nasofaringei (Cerba Xpert + Eurofins + campioni simulati)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>

Tabella 16. Sede, tipo di campione, flusso di lavoro e target.

I valori dei veri positivi e dei veri negativi, i valori dei falsi positivi e dei falsi negativi, la sensibilità e la specificità di VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono stati calcolati in relazione a ciascun test di confronto come mostrato nella seguente tabella:

Sito	Test di confronto	Target	TP	FN	FP	FN	Sensibilità	Specificità
1	SmartCycler <i>Bordetella</i> ® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	33	100	0	1	0,971 (0,84 – 0,99)	1 (0,96 – 1)
2	SmartCycler <i>Bordetella</i> ® 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 <i>Bordetella</i> ® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE <i>Bordetella</i> (R-biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	76	0	1	0,5 (0,01-0,98)	1 (0,95-1)
3	SmartCycler <i>Bordetella</i> ® 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 <i>Bordetella</i> ® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE <i>Bordetella</i> (R-biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	210	0	1	0,5 (0,01-0,987)	1 (0,98-1)
4	Test validato in-house con mix di pertussis/parapertussis	<i>B. pertussis</i>	43	54	0	3	0,935 (0,821-0,986)	1 (0,966-1)
5	Caratterizzazione iniziale*	<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)

Tabella 17. Valori dei TP (veri positivi) e dei (TN) veri negativi, i valori di (FP) falsi positivi e di (FN) falsi negativi, sensibilità e specificità di VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

\* L'iniziale caratterizzazione include un test SmartCycler *Bordetella*® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) e un test validato in-house con mix di pertussis/parapertussis per il rilevamento di *B. pertussis* e *B. parapertussis*, e un test SmartCycler *Bordetella*® pertussis/parapertussis (Cepheid) + RIDA®GENE *Bordetella* (R-biopharm) per il rilevamento di *B. holmesii* in campioni di Cerba Xpert.

I risultati mostrano un elevato accordo nel rilevare *B. pertussis*, *B. parapertussis* e/o *B. holmesii* utilizzando il VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

## 12.2. Sensibilità analitica

Il limite di rilevamento (LoD) di VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è pari a 1,2 CFU/mL di campione per *B. pertussis*,  $4 \times 10^{-2}$  CFU/mL di campione per *B. holmesii* e di 12 CFU/mL di campione per *B. parapertussis*, con tasso positivo  $\geq 95\%$ , su campioni nasofaringei.

Figura 5. Serie di diluizioni di *Bordetella pertussis* ( $7,07 \times 10^4$  -  $7,07 \times 10^{-3}$  CFU per reazione) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 475/520 (FAM)).

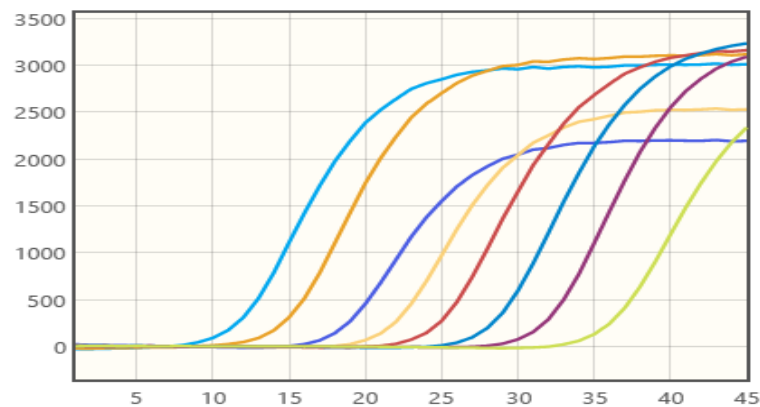


Figura 6. Serie di diluizioni di *Bordetella holmesii* ( $2,42 \times 10^3$  -  $2,42 \times 10^{-4}$  CFU per reazione) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 475/520 (FAM)).

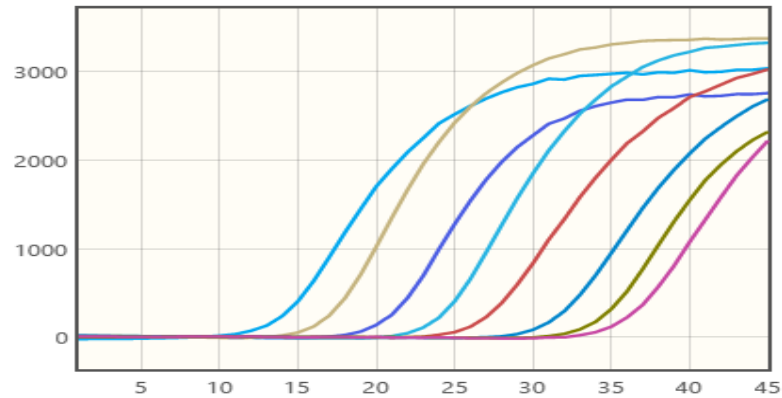


Figura 7. Serie di diluizioni di *Bordetella holmesii* ( $2,42 \times 10^3$  -  $2,42 \times 10^{-4}$  CFU per reazione) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 585/630 (ROX)).

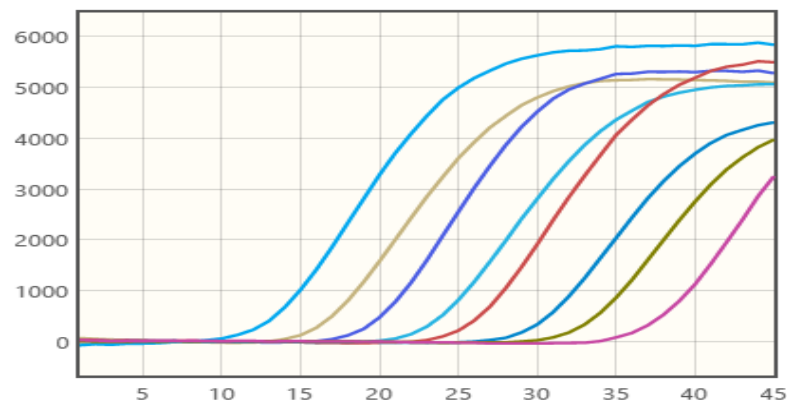
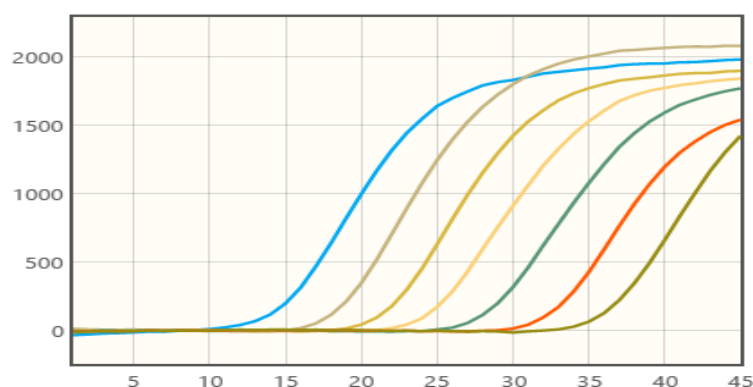


Figura 8. Serie di diluizioni di *Bordetella parapertussis* ( $7,07 \times 10^4$  -  $7,07 \times 10^{-2}$  CFU per reazione) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 630/665 (Cy5)).

### 12.3. Specificità analitica

La specificità del test *Bordetella* è stata confermata testando un pannello formato da diversi microrganismi associati alle malattie respiratorie. Non è stata rilevata alcuna reattività crociata tra i seguenti microrganismi testati:

Test di reattività crociata					
Adenovirus umano tipi 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
Bocavirus	-	Virus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 1	-
<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)	-	Metapneumovirus umano A e B	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipo A e C	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i> ceppo CM-1	-	Virus Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (clade 3C2a.1)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Coronavirus umano 229E, OC43 e NL63	-	Virus dell'Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Virus parainfluenzali umani 1, 2, 3 e 4	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Virus dell'Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> tipo A1 e g885652	-
Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Virus Influenza B/Florida/04/06	-	Virus sinciziale respiratorio (RSV) tipo A e B	-
Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Rhinovirus umano	-
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella bozemanii</i> sierotipo 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Virus Influenza A/DE-SH/Reihenente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Virus dell'Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-		

Tabella 18. Microrganismi patogeni di riferimento utilizzati in questo studio.

### 12.4. Reattività analitica

La reattività di VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stata valutata sulla base del DNA estratto da *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* come modelli, mostrando risultati positivi.



## Bibliography/Bibliografia

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/Simboli per reagenti e componenti IVD

<p>In vitro diagnostic device Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i></p>	<p>Keep dry Mantenere asciutto</p>	<p>Use by Usare entro</p>	<p>Manufacturer Produttore</p>	<p>Batch code Codice del lotto</p>
<p>Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso</p>	<p>Temperature limitation Limitazione temperatura</p>	<p>Contains sufficient for &lt;n&gt; test Contenuto sufficiente per &lt;n&gt; test</p>	<p>Unique Device Identification Identificazione e unica del dispositivo</p>	<p>Catalogue number Numero di catalogo</p>

## Trademarks

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

<b>Change Control / Controllo modifiche</b>		
<b>Version No. / N. versione</b>	<b>Changes / Modifiche</b>	<b>Date / Data</b>
00	Original version / Versione originale.	29/06/2022

Table A 2. Control change table/ Tabella di controllo delle modifiche.

Revision: 29<sup>th</sup> 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](http://www.certest.es)

*One step ahead*



F-566 rev02