

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Bordetella
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Denne bruksanvisningen gjelder for følgende referanse:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERANSE
VIASURE Bordetella 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. / Referanse for produkt som skal brukes med BD MAX™ System.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Bruksanvisning på engelsk/spansk er inkludert i kitet.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Contact viasure@certest.es if your language is not on the list / Kontakt viasure@certest.es hvis språket ditt ikke er på listen.

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

Merk: Brukere skal varsle produsenten og de kompetente myndigheter i medlemslandet der de er etablert som brukere og/eller pasienter, om enhver alvorlig hendelse relatert til produktet.

Content

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

Innhold

1.	Tiltenkt bruk	19
2.	Sammendrag og forklaring	19
3.	Grunnleggende prosedyre	19
4.	Reagenser som følger med.....	20
5.	Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren	20
6.	Transport- og lagringsforhold	21
7.	Forholdsregler for brukere.....	21
8.	Testprosedyre.....	22
8.1.	Innsamling, oppbevaring og transport av prøver.....	22
8.2.	Klargjøring av prøver og DNA-ekstraksjon	22
8.3.	PCR-protokoll	23

9.	Tolkning av resultater	26
10.	Testens begrensninger	28
11.	Kvalitetskontroll	29
12.	Ytelsesegenskaper	29
12.1.	Klinisk sensitivitet og spesifisitet	29
12.2.	Analytisk sensitivitet	30
12.3.	Analytisk spesifisitet	32
12.4.	Analytisk reaktivitet	32
	Bibliography/ Litteratur	33
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboler for IVD-komponenter og reagenser.....	33
	Trademarks.....	33

ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

3. Principle of the procedure

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

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

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

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

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

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

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

8. Test procedure

8.1. Sample collection, storage and transport

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

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

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

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

8.2. Sample preparation and DNA extraction

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

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

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

8.3. PCR protocol

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

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

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

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

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

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

Table 3. PCR settings.

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

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

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

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 5. PCR protocol.

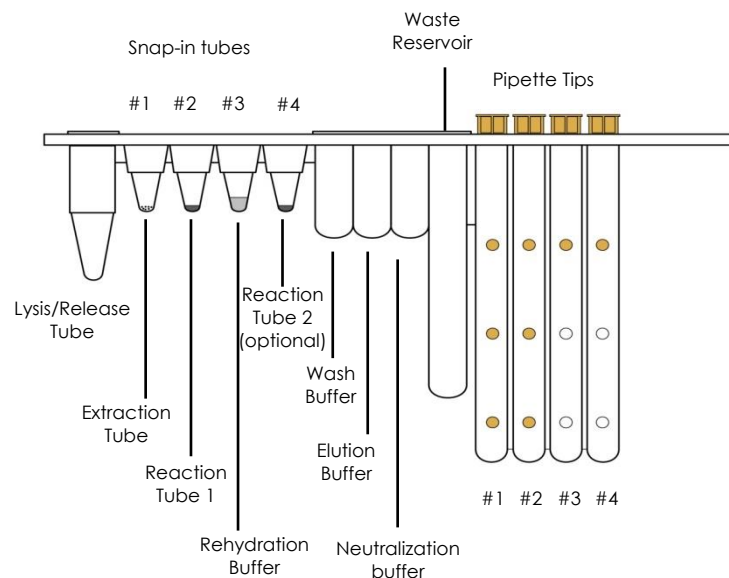
- 12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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).
 - a. 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)
		SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	210	0	1	0.5 (0.01-0.987)
4	Validated in-house mix pertussis/parapertussis assay	<i>B. pertussis</i>	43	54	0	3	0.935 (0.821-0.986)	1 (0.966-1)
5	Initial characterization*	<i>B. pertussis</i>	98	186	0	4	0.961 (0.903-0.989)	1 (0.980-1)
		<i>B. parapertussis</i>	12	276	0	0	1 (0.735-1)	1 (0.987-1)
		<i>B. holmesii</i>	20	268	0	0	1 (0.832-1)	1 (0.986-1)

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

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

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

12.2. Analytical sensitivity

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

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

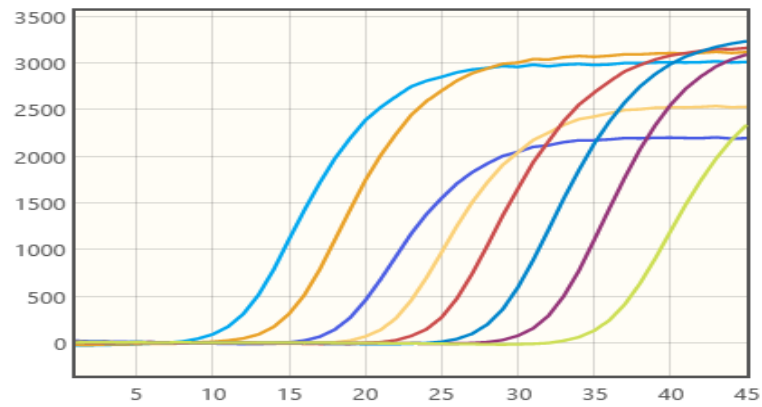


Figure 2. Dilution series of *Bordetella holmesii* (2.42×10^3 - 2.42×10^{-4} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

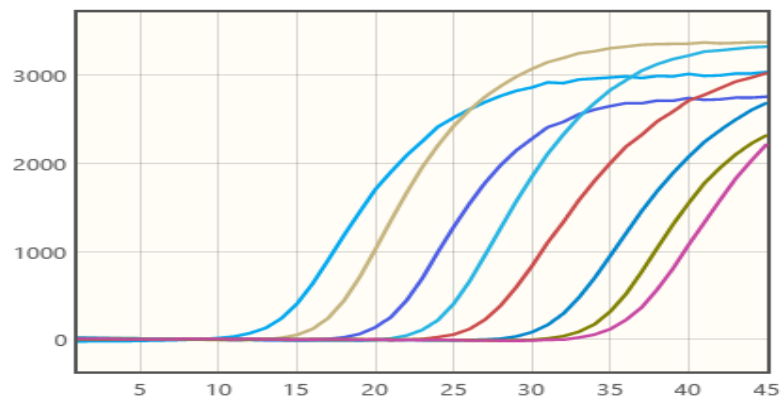


Figure 3. Dilution series of *Bordetella holmesii* (2.42×10^3 - 2.42×10^{-4} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

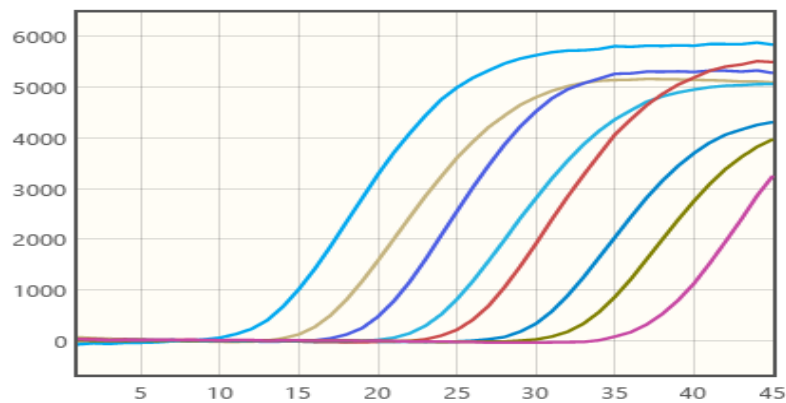
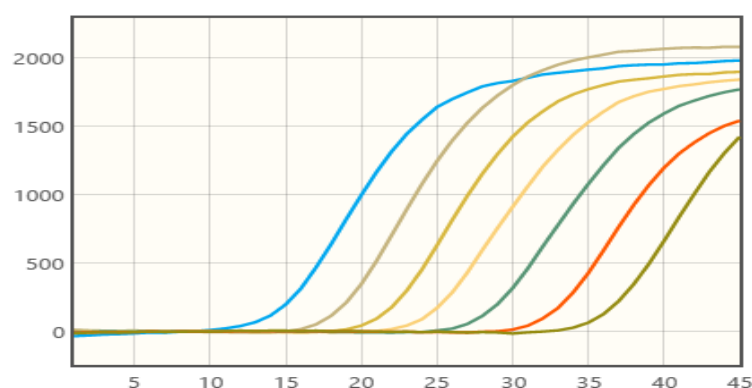


Figure 4. Dilution series of *Bordetella parapertussis* (7.07×10^4 - 7.07×10^{-2} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.3. Analytical specificity

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

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

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

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

NORSK

1. Tiltenkt bruk

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er en automatisert PCR-test i sanntid, og den er utviklet for kvalitativ påvisning og differensiering av DNA fra *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* og/eller *Bordetella holmesii* i luftveisprøver (nasofaryngeale prøvepensler og nasofaryngeale aspirater), tatt av helsepersonell, fra pasienter med mistenkt luftveisinfeksjon. Denne testen er ment som en hjelp ved identifisering av *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* og/eller *Bordetella holmesii*, i kombinasjon med pasientens kliniske tegn og symptomer samt epidemiologiske risikofaktorer. Analysen bruker BD MAX™-systemet til automatisert ekstraksjon av DNA og påfølgende sanntids PCR ved bruk av de medfølgende reagensene kombinert med universale reagenser og forbruksmateriell for BD MAX™-systemet. DNA ekstraheres fra luftveisprøver, som amplifiseres ved bruk av sanntids RT-PCR og påvises med fluorescerende reporterfargeprober som er spesifikke for *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* og *Bordetella holmesii*.

2. Sammendrag og forklaring

Genuset *Bordetella* består av åtte arter, hvorav det er kjent at fire smitter mennesker: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* og *B. bronchiseptica*. Den viktigste årsaken til kikhoste er infeksjon med *B. pertussis*, etterfulgt av *B. parapertussis*. *B. holmesii* har blitt isolert fra pasienter med alvorlig underliggende sykdom, mens *B. bronchiseptica* vanligvis er begrenset til dyr, men sistnevnte har også av og til blitt isolert fra immunkomprimerte pasienter.

Kikhoste er en svært smittsom sykdom som vanligvis spres fra person til person via hoste eller nysing, eller via nær kontakt med en smittet person i et felles pusteområde. Sykdommens kliniske forløp er inndelt i tre stadier, som inkluderer følgende kliniske egenskaper: katarralsk (coryza, lav feber, mild og sporadisk hoste), paroksysmalt (paroksysmer med flere og raske hosteanfall, cyanose, oppkast og utmattelse) og konvalesent (gradvis restitusjon og mindre vedvarende paroksysmale hosteanfall).

Til tross for vaksinerings er kikhoste fremdeles endemisk i de fleste områder i verden. Pålitelig diagnose er påkrevd for å starte egnet behandling, og profylakse for kontaktpersoner er nødvendig, spesielt for uvaksinerte spebarn der kikhoste kan være en livstruende sykdom. Tester med nukleinsyreamplifikasjon, inkludert PCR og i nyere tid sanntids PCR, overviner noen av begrensningene ved kultur og serologiske metoder for diagnostisering av infeksjoner med *Bordetella*. De fleste PCR-tester er basert på påvisning av insersjonssekvenser (IS) som finnes i flere kopier per genom, noe som øker sensitiviteten til PCR-testene.

3. Grunnleggende prosedyre

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er utviklet for kvalitativ påvisning og differensiering av DNA fra *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* og/eller *Bordetella holmesii* i luftveisprøver. Etter DNA-isolering utføres identifisering av disse stammene av *Bordetella* gjennom amplifikasjon av et konservert område av insersjonssekvensene IS481 for *Bordetella pertussis/holmesii*, pIS1001 for *Bordetella parapertussis* og hIS1001 for *Bordetella holmesii*, ved bruk av spesifikke primere og en fluorescensmerket probe.

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er basert på 5'-eksonuklease-aktiviteten til DNA-polymerase. Under DNA-amplifikasjon kløver dette enzymet proben som er bundet til den komplementære DNA-sekvensen, og skiller quencher-fargen fra reporterfargen. Denne reaksjonen genererer en økning i fluorescenssignalet som er proporsjonal med kvantiteten av måltemplatet. Denne fluorescensen måles av BD MAX™ System.

Hvert rør i VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inneholder alle komponenter som behøves for sanntids PCR-analyse (spesifikke primere/prober, dNTP-er, buffer, polymerase) i et stabilisert format, samt en intern kontroll til monitorering av ekstraksjonsprosessen og/eller hemming av polymeraseaktiviteten.

Mål	Kanal	Gen
<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	475/520	sekvens IS481
<i>B. holmesii</i>	585/630	sekvens IS1001
<i>B. parapertussis</i>	630/665	sekvens pIS1001
Internal control (IC)	530/565	-

Tabell 10. Mål, kanal og gener.

4. Reagenser som følger med

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inkluderer følgende materialer og reagenser, nærmere beskrevet i tabell 2:

Reagens/materiale	Beskrivelse	Strekkode	Mengde
<i>Bordetella</i> reaction tube	En blanding av enzymer, primere, prober, buffere, dNTP-er, stabilisatorer og intern kontroll i et stabilisert format	1C-folie	2 poser à 12 blanke rør
Rehydration Buffer tube	Løsning til rekonstituering av det stabiliserte produktet	11-folie	1 poser à 24 blanke rør

Tabell 11. Reagenser og materialer som følger med i VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med katalognummer VS-BDT124 (444204).

5. Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren

Følgende liste inneholder materialene og utstyret som kreves til bruken, men som ikke er inkludert i VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Sanntids PCR-instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 eller 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (ref: 437519).
- Vortex.
- Mikropipetter (nøyaktighet mellom 2 og 1000 µl)
- Nukleasefritt vann
- Filterspisser
- Pudderfrie engangshansker.

6. Transport- og lagringsforhold

- Settene kan sendes og oppbevares ved 2–40 °C inntil utløpsdatoen som er angitt på etiketten.
- Etter åpning av aluminiumsposene med reaksjonsrørene kan produktet brukes i opptil 28 dager.

7. Forholdsregler for brukere

- Produktet er kun ment å brukes av fagpersonell, f.eks. laboratorie- eller helsepersonell og teknikere, som er opplært i molekylære biologiske teknikker.
- Til diagnostisk bruk *in vitro*.
- Ikke bruk reagenser og/eller materialer som er gått ut på dato.
- Ikke bruk settet hvis etiketten som forseglar ytteresken er brutt.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesesken er åpen eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesposene er åpne eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis reagensposene ikke har tørkemiddel eller hvis tørkemiddelet er ødelagt.
- Ikke fjern tørkemiddelet fra reagensposene.
- Beskyttelsesposene til reagensene skal lukkes med lynlåsen umiddelbart etter hver bruk. Fjern all overflødig luft i posene før de forsegles.
- Må ikke brukes hvis folien er revnet eller ødelagt.
- Ikke bland reagenser fra forskjellige poser og/eller sett og/eller loter.
- Beskytt reagenser fra fuktighet. Langvarig eksponering for fuktighet kan påvirke produktytelsen.
- Oppbevar komponentene beskyttet mot lys.
- I tilfeller der andre PCR-tester utføres i det samme generelle området av laboratoriet, må det utvises forsiktighet for å unngå kontaminering av VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, ekstraksjonssettet BD MAX™ ExK™ TNA-3, eller eventuelle andre reagenser som kreves for testing samt BD MAX™ System. Unngå alltid at reagenser kontamineres med mikrober og ribonuklease (RNase)/deoksyribonuklease (DNase). Det anbefales bruk av sterile RNase/DNase-frie aerosolresistente eller "positive displacement"-pipettespisser til engangsbruk. Bruk en ny pipettespiss for hver prøve. Du må skifte hansker før du håndterer reagenser og kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge).
- For å unngå miljøkontaminering med amplikoner må du ikke brette åpen BD MAX™ PCR Cartridge etter bruk. Forseglingene på BD MAX™ PCR Cartridge er designet for å unngå kontaminering.
- Benytt en enveis arbeidsflyt. Den skal starte i ekstraksjonsområdet og deretter gå videre til amplifikasjons- og påvisningsområdet. Prøver, utstyr og reagenser må ikke returneres til området der det forrige trinnet ble utført.
- Følg god laboratoriepraksis. Bruk verneklær, engangshansker, vernebriller og maske. Ikke spis, drikk, røyk eller påfør kosmetiske produkter i arbeidsområdet. Vask hendene når testen er utført.
- Prøvene må behandles som potensielt smittefarlige og/eller biologisk farlige, i likhet med alle reagenser og materialer som har blitt eksponert for prøvene, og de må håndteres i henhold til nasjonale sikkerhetsregler. Ta nødvendige forholdsregler under innsamling, oppbevaring, håndtering og kassering av prøver.
- Prøver og reagenser må håndteres i et biologisk sikkerhetsskap. Bruk personlig verneutstyr (PU) i tråd med de relevante retningslinjene for håndtering av potensielt smittefarlige prøver. Avfall skal kastes i henhold til lokale og delstatlige forskrifter.

- Regelmessig dekontaminering av annet vanlig utstyr som brukes er anbefalt, spesielt mikropipetter og arbeidsflater.
- I henhold til forordning (EF) nr. 1907/2006 (REACH), kreves det ikke sikkerhetsdatablad (Safety Data Sheets) for VIASURE Real Time PCR Detection Kits ettersom de er klassifisert som ikke helse- eller miljøskadelige fordi de ikke inneholder farlige stoffer og/eller blandinger som oppfyller fareklassifiseringskriteriene tilgjengelig i forordning (EF) nr. 1272/2008 (CLP), eller som har konsentrasjoner høyere enn verdien fastsatt i nevnte forordning i sin deklarasjon.
- Konsulter brukerhåndboken for BD MAX™ System for ytterligere advarsler, forsiktighetsregler og prosedyrer.

8. Testprosedyre

8.1. Innsamling, oppbevaring og transport av prøver

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har blitt testet på luftveisprøver (nasofaryngeale prøvepensler og aspirater). Andre typer prøver må valideres av brukeren.

Innsamling, oppbevaring og transport av prøver skal utføres under de forhold som valideres av brukeren. Generelt skal luftveisprøver samles inn og merkes på egnet måte i rene beholdere med eller uten transportmedium (avhengig av prøvetypen) og behandles snarest mulig for å garantere kvaliteten av testen. De nasofaryngeale prøvene skal transporteres ved 2–8 °C i opptil 72 timer, i henhold til lokale og nasjonale regler for transport av patogen materiale. For langvarig transport (over 72 timer) anbefaler vi forsendelse ved -20 °C eller lavere. Imidlertid skal nasofaryngeale prøvepensler i universalt transportmedium (UTM) transporteres i fryser ved -20°C eller lavere. Det anbefales å bruke ferske prøver til testen. Prøvene kan oppbevares ved 2–8 °C i opptil 72 timer (nasofaryngeale aspirater) eller fryses ved -20 °C eller ideelt sett ved -70 °C (i UTM) for konservering. Gjentatte sykluser med frysing/fining bør unngås for å forhindre forringelse av prøven og nukleinsyrene.

Luftveisprøvene skal samles inn, transporteres og oppbevares i tråd med relevante retningslinjer for laboratoriet. For mer informasjon, se retningslinjene til CDC (CDC's Infectious diseases laboratory test directory (2022)). Nettstedet <https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/cdc-lab-tests.pdf> og IDSA's retningslinjer (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018), og artikkelen 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).

Hvis ekspektoratprøver brukes, kan de også testes i henhold til anbefalingene over.

8.2. Klargjøring av prøver og DNA-ekstraksjon

Klargjør prøven i henhold til anbefalingene i bruksanvisningen for ekstraksjonssettet som brukes; BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipetter 200 µl av prøven i et BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube (prøvebufferrør) og lukk røret med en membranhet. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Fortsett til betjening av BD MAX™ System Operation.

Merk at prosedyrer for klargjøring til ekstraksjon i samsvar med den spesifikke anvendelsen skal utvikles og valideres av brukeren og at enkelte andre prøver kan kreve forbehandling. F.eks. for ekspektoraprøver tilsetter du acetylcystein (anbefalt er N-Acetyl-L-cystein, ref. A7250, Merck KGaA) til prøven med et forhold på 1:1 (f.eks. 250 µl av ekspektorat og 250 µl av acetylcystein 100 mg/ml). Bland med vorteksblender og varm til 95 °C i 10 minutter. Pipetter 200 µl av den forhåndsbehandlede ekspektoratprøven opp i et BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube (prøvebufferrør) og lukk røret med en membranhetten. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Fortsett til betjening av BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR-protokoll

Merk: Se brukerhåndboken for BD MAX™ System for detaljerte instruksjoner.

8.3.1. Opprette PCR-testprogram for VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Merk: Hvis du allerede har opprettet testen for VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, kan du hoppe over trinn 8.3.1 og gå direkte til 8.3.2.

- 1) Velg fanen "Test Editor" (Testredigering) på skjermbildet "Run" (Kjør) på BD MAX™ System.
- 2) Klikk på knappen "Create" (Opprett).
- 3) Skriv navnet på testen din i fanen "Basic Information" (Grunnleggende info), i vinduet "Test Name" (Testens navn): f.eks. VIASURE Bordetella.
- 4) Fra nedtrekksmenyen "Extraction Type" (Ekstraksjonstype), velg "ExK TNA-3".
- 5) Fra nedtrekksmenyen "Master Mix Format", velg "Type 5".
 - a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ytterligere BD MAX™-test. I så fall må du velge "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)).
- 6) Under "Sample extraction parameters" (Prøveekstraksjonsparametere), velg "User defined" (Brukerdefinert) og tilpass prøvevolumet til 350 µl.
- 7) Under "Ct Calculation" (Ct-beregning), velg "Call Ct at Threshold Crossing" (Angi Ct ved terskelkryssing).
- 8) Hvis du kjører versjon 5.00 av programvaren eller høyere og har merket de foliebelagte innklikningsrørene med strekkoder under "Custom Barcodes" (Egendefinerte strekkoder), velger du følgende konfigurasjon:
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Strekkekode for innklikningsrør 2): 1C (for Bordetella reaction tube (reaksjonsrør)).
 - b. "Snap-In 3 Barcode" (Strekkekode for innklikningsrør 3): 11 (vedrørende Rehydration Buffer tube).
 - c. "Snap-In 4 Barcode" (Strekkekode for klemme 4): et annet VIASURE reaction tube (reaksjonsrør) (forskjellig folie) hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5))(avsnitt 8.3.1).

9) Oppgi følgende parametere i fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger): "Channel Settings" (Kanalinnstillinger), "Gains" (Forsterkning) og "Threshold" (Terskel) (tabell 3).

- a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ytterligere VIASURE for BD MAX™-test. I så fall må "PCR settings" (PCR-innstillinger) og "Test Steps" (Testtrinn) fylles ut for posisjon 2 (grønn) og posisjon 4 (blå).

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Forsterkning)	Threshold (Terskel)	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)	-	-	-	-	-

Tabell 12. "PCR settings" (PCR-innstillinger).

Merk: Det anbefales at man først stiller inn minimum terskelverdiene som er listet opp ovenfor for hver kanal, men de endelige innstillingene må bestemmes av sluttbrukeren under tolkningen av resultatene for å sikre at tersklene faller innenfor den eksponentielle fasen av fluorescenskurvene og over et eventuelt bakgrunnssignal. Terskelverdien for forskjellige instrumenter kan variere grunnet forskjellige signalintensiteter.

10) I fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger) oppgir du i tillegg følgende parametere "Spectral Cross Talk" (Spektral kryssstale) (tabell 4)

		False Receiving Channel (Kanal som mottar falske data)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasjonskanal)	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	-	

Tabell 13. Parametere for "Spectral Cross Talk" (spektral kryssstale).

11) I fanen "Test Steps" (Testtrinn) oppgir du PCR-protokollen (tabell 5).

Step Name (Navn på trinn)	Profile Type (Profiltype)	Cycles (Sykluser)	Time (s) (Tid (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Påvis)
Initial denaturation (Innledende denaturering)	Vent	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturering og herding/forlengelse (datainnsamling))	2 - Temperatur	45	10	95 °C	-
			41	63 °C	✓

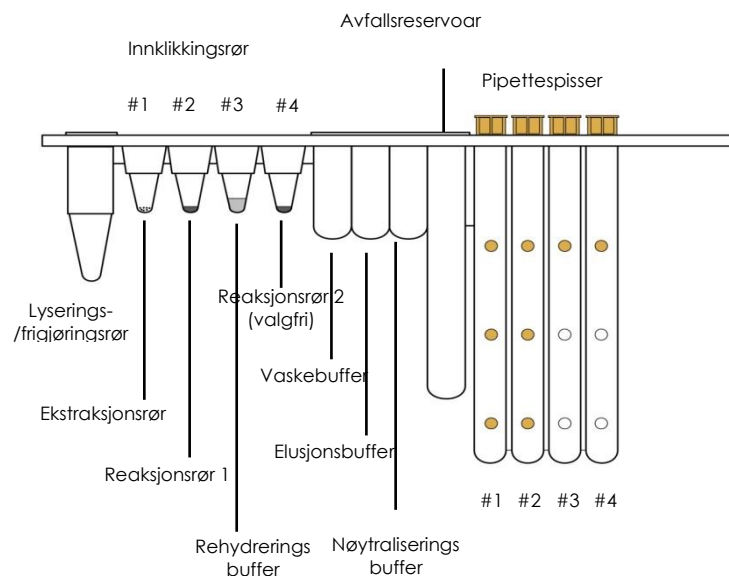
Tabell 14. PCR-protokoll

12) Klikk på knappen "Save test" (Lagre test).

8.3.2. Sette opp BD MAX™-stativet

- 1) Ta ut en separat modulreagensstrimmel fra BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit for hver prøve som skal testes. Dunk forsiktig hver strimmel mot en hard overflate for å sikre at alle væskene ligger i bunnen av rørene, og sett dem inn i BD MAX™ System prøvestativ.
- 2) Ta ut nødvendig antall BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (ekstraksjonsrør) (B4) (hvit folie) fra beskyttelsesposen. Klikk Extraction Tube(s) (ekstraksjonsrøret(ene)) (hvit folie) på plass i deres respektive posisjoner i TNA-strimmelen (posisjon 1, hvit fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
- 3) Fastslå og adskill egnet antall *Bordetella* reaction tubes (reaksjonsrør) (1C-folie), og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (klemmeposisjon 2, grønn fargekode på stativet. Se figur 1.)
 - a. Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
 - b. For riktig rehydrering må du passe på at det frysetørkede produktet er i bunnen av røret og ikke har festet seg til det øverste området av røret eller til folietetningen. Dunk forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at alt produktet ligger i bunnen av røret.
 - i. Merk: Hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)) (avsnitt 8.3.1), må du fastslå og adskille egnet antall ekstra VIASURE-reaksjonsrør (forskjellig folie) og klikke dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (klemmeposisjon 4, blå fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
- 4) Ta ut nødvendig antall Rehydration Buffer tubes (rehydreringsbufferrør) (11-folie) og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 3, uten fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
 - a. For å sikre riktig overføring må du passe på at væsken er i bunnen av røret og ikke har festet seg øverst i røret eller til folietetningen. Dunk forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at hele bufferen er i bunnen av røret.

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



8.3.3. Sette opp BD MAX™-instrumentet

- 1) Velg fanen "Work List" (Arbeidsliste) på skjermen "Run" (Kjør) i BD MAX™ System programvare v4.50A eller nyere.
- 2) I nedtrekksmenyen "Test", velg VIASURE *Bordetella* (hvis den ikke allerede er opprettet, se avsnitt 8.3.1).
- 3) Velg riktig lotnummer for settet (du finner det på ytteresken til ekstraksjonssettet som brukes) fra nedtrekksmenyen (valgfritt).
- 4) Oppgi ID-nummeret til prøvebufferrøret i vinduet "Sample Tube" (Prøverør) i "Work List" (Arbeidsliste), enten ved å skanne strekkoden eller ved å skrive det inn manuelt.
- 5) Fyll ut prøve-/pasient-ID og/eller vinduet "Accession" (Tilgang) i "Work List" (Arbeidsliste) og klikk på knappen "Save" (Lagre). Fortsett helt til du har lagt inn alle prøvebufferrørene. Sørg for at prøve-/pasient-ID og prøvebufferrørene samsvarer.
- 6) Plasser det klargjorte prøvebufferrøret i BD MAX™-stativet(-ene).
- 7) Plasser stativet(ene) i BD MAX™ System (stativ A settes på venstre side av BD MAX™ System og stativ B settes på høyre side).
- 8) Plasser nødvendig antall BD MAX™ PCR Cartridge(s) i BD MAX™ System.
- 9) Lukk døren på BD MAX™ System.
- 10) Klikk på "Start Run" (Start kjøring) for å begynne prosedyren.

8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) Gå til hovedmenyen og klikk på knappen "Results" (Resultater).
- 2) Enten dobbeltklikk på kjøringen din i listen eller trykk på knappen "View" (Vis).
- 3) Klikk på "Print" (Skriv ut), og velg: "Run Details, Test Details and Plot..." (Kjøringsdetaljer, testdetaljer og plott ...).
- 4) Klikk på knappen "Print or Export" (Skriv ut eller eksporter) på skjermbildet "Run Reports" (Kjøringsrapporter).

9. Tolkning av resultater

For en detaljert beskrivelse av hvordan du analyserer dataene, se brukerhåndboken for BD MAX™ System.

Dataanalysen utføres av BD MAX™-programvaren i henhold til produsentens instruksjoner. BD MAX™-programvaren rapporterer Ct-verdier og amplifikasjonskurver for hver detektorkanal for hver prøve som testes, på følgende måte:

- En Ct-verdi på 0 indikerer at programvaren ikke beregnet noen Ct-verdi med den angitte terskelen (se tabell 3). En amplifikasjonskurve av prøven som viser en Ct-verdi på 0, må sjekkes manuelt.

- En Ct-verdi på -1 indikerer at det ikke har funnet sted noen amplifikasjonsprosess.

- Alle andre Ct-verdier må tolkes i sammenheng med amplifikasjonskurven og i henhold til retningslinjene for tolkning av prøver som er angitt i tabell 6.

Sjekk det interne kontrollsignalet for å kontrollere at amplifikasjonsblandingen fungerer som den skal. Sjekk også at det ikke finnes noen rapport om systemfeil i BD MAX™ System.

Bruk tabellen under til å lese av og analysere resultatene:

<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i> (475/520)	<i>B. holmesii</i> (585/630)	<i>B. parapertussis</i> (630/665)	Intern kontroll (530/565)	Tolkning
+	+	+	+/- ¹	DNA for <i>B. pertussis</i> and/or <i>B. holmesii</i> og <i>B. parapertussis</i> påvist ¹
-	-	-	+ ²	DNA for <i>B. pertussis</i> , <i>B. holmesii</i> og <i>B. parapertussis</i> ikke påvist ²
+	-	-	+/- ¹	DNA for <i>B. pertussis</i> påvist, DNA for <i>B. holmesii</i> og <i>B. parapertussis</i> ikke påvist ¹
+	+	-	+/- ¹	DNA for <i>B. pertussis</i> og/eller <i>B. holmesii</i> påvist, DNA for <i>B. parapertussis</i> ikke påvist ¹
+	-	+	+/- ¹	DNA for <i>B. pertussis</i> og <i>B. parapertussis</i> påvist, DNA for <i>B. holmesii</i> ikke påvist ¹
-	+ ³	-	+/- ¹	DNA for <i>B. holmesii</i> påvist, DNA for <i>B. pertussis</i> og <i>B. parapertussis</i> ikke påvist ¹
-	+ ³	+	+/- ¹	DNA for <i>B. holmesii</i> og <i>B. parapertussis</i> påvist, DNA for <i>B. pertussis</i> ikke påvist ¹
-	-	+	+/- ¹	DNA for <i>B. parapertussis</i> påvist, DNA for <i>B. pertussis</i> og <i>B. holmesii</i> DNA ikke påvist ¹
-	-	-	- ²	UNR = Uavklart resultat oppnådd på grunn av hemmere i PCR-reaksjonen eller når det oppstår et generelt problem (ikke rapportert av en feilkode) med prøvebehandlings- og/eller amplifikasjonsstrinn. ²
IND	IND	IND	IND	IND = Ubestemmelig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™ System. Analyseresultatet vises i tilfeller med instrumentfeil knyttet til en feilkode.
INC	INC	INC	INC	INC = Ufullstendig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™ System. Analyseresultatet vises i tilfeller med ikke fullført kjøring.

Tabell 15. Tolkning av prøve.

+: Amplifikasjon fant sted.

-: Ingen amplifikasjon fant sted.

1 En prøve anses som positiv hvis oppnådd Ct-verdi er ≤ 40 . Den interne kontrollen (IC) kan i noen tilfeller vise et amplifikasjonssignal. IC-påvisningen er ikke alltid nødvendig fordi et høyt antall kopieringer av målet kan gi foretrukket amplifikasjon av målspesifikke nukleinsyrer.

2 En prøve anses som negativ hvis prøven ikke viser noe amplifikasjonssignal i påvisningssystemet og den interne kontrollen er positiv (Ct ≤ 35). Hemming av PCR-reaksjonen kan utelukkes hvis den interne kontrollen amplifiseres. I tilfelle av uavklarte resultater (UNR), fravær av signal for intern kontroll i en negativ prøve, anbefales det å gjenta analysen i henhold til indikasjonene nedenfor.

3 DNA fra *B. holmesii* blir påvist i to forskjellige kanaler, 475/520 (FAM) og 585/630 (ROX), men grunnet den høyere sensitiviteten til 585/630 (ROX) i positive prøver rundt påvisningsgrensen, er det mulig å få signal kun i den kanalen.

Ved vedvarende uklare resultat anbefales det å lese gjennom bruksanvisningen og gjennomgå ekstraksjonsprosessen som benyttes av brukeren; å bekrefte riktig bruk av hvert PCR-trinn og revidere parametrene; samt kontrollere sigdformen på kurven og fluoriseringens intensitet.

MERK: Det er tilstrekkelig volum i Sample Buffer Tube til én repetisjonstest. For BD MAX™ Sample Buffer Tubes som har vært lagret ved 2–8 °C eller 25 °C, må repetisjonstesting utføres innen 24 timer.

Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.

10. Testens begrensninger

- Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.
- Selv om denne analysen kan brukes med andre typer prøver, har den blitt validert med nasofaryngeale prøvepensler og nasofaryngeale aspirater. Hvis ekspektoratprøver brukes, kan de også testes i henhold til anbefalingene over.
- Det lyofiliserte produktet må være i bunnen av røret og ikke klebet til toppområdet eller folietetningen for en vellykket utførelse. Dunk forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at alt produktet ligger i bunnen av røret.
- Om reagensmiksturen har et stabilisert format – vanligvis lokalisert i bunnen av røret – og et utseende som er ulikt det vanlige utseendet (uten konisk form, ikke homogen, mindre/større i størrelse og/eller har en annen farge enn hvitaktig), endrer ikke dette prøvens funksjonalitet.
- Kvaliteten på testen avhenger av kvaliteten på prøven; nukleinsyre må ekstraheres på riktig måte fra kliniske prøver.
- Prøven er en kvalitativ test og gir ingen kvantitative verdier eller indikerer mengden av organismer i prøven.
- Ekstremt lave målenivåer som ligger under påvisningsgrensen vil muligens bli påvist, men resultatene vil ikke kunne reproduseres.
- Det finnes en mulighet for falske positive resultater grunnet krysskontaminering av prøver av mistenkt *Bordetella* som inneholder høye konsentrasjoner av mål-DNA eller kontaminering grunnet PCR-produkter fra tidligere reaksjoner.
- De spesifikke kombinasjonene av primer og probe for påvisning av sekvensene IS481, hIS1001 og pIS1001, som benyttes i VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, viser ikke signifikante kombinerte homologier med det humane genomet, human mikroflora eller andre mikroorganismer i luftveiene, som kunne resultere i forutsigbare falske positive resultater.
- Falske negative resultat kan komme av flere faktorer og kombinasjoner av disse faktorene, inkludert:
 - Feilaktig innsamling, transport, oppbevaring, og/eller håndtering av prøvematerialet.
 - Feilaktig prosedyrebehandling (inkludert DNA ekstraksjon).
 - Nedbrytning av DNA gjennom transport/oppbevaring og/eller behandling av prøvematerialet.
 - Mutasjon eller polymorfisme i primer- eller probebindingsområder kan ha innvirkning på påvisningen av nye eller ukjente *Bordetella*-stammer.
 - Organismemengden i prøvematerialet er under grensen for påvisning i analysen.
 - Forekomst av qPCR-hemmere eller andre typer forstyrrende substanser.
 - Instruksjonene for bruk og analyseprosedyren blir ikke fulgt.
- En positiv test indikerer ikke nødvendigvis levedyktige bakterier og antyder ikke at bakteriene er infeksjose eller er den bakenforliggende årsaken til kliniske symptomer. Men en positiv test indikerer tilstedeværelsen av målsekvensene for *Bordetella*.
- Dersom diagnostiske tester for andre luftveissykdommer er negative og pasientens kliniske symptomer og epidemiologiske informasjon antyder en mulighet for infeksjon med *B. pertussis*, *B. parapertussis* og/eller *B. holmesii*, bør et falskt negativ resultat vurderes og en ny testing av pasienten bør diskuteres.
- Et negativt resultat utelukker ikke tilstedeværelse av DNA fra *B. pertussis*, *B. parapertussis* og/eller *B. holmesii* i en klinisk prøve. Dersom kliniske observasjoner, pasienthistorikk og epidemiologisk informasjon antyder en

infeksjon med *B. pertussis*, *B. parapertussis* og/eller *B. holmesii*, bør det vurderes å utføre en ny test med økt mengde prøvevolum.

- I tilfelle av uavklarte, ubestemte eller ufullstendige resultater ved bruk av VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, må testen gjentas. Uavklarte resultater kan skyldes tilstedeværelse av hemmere i prøven eller en ukorrekt rehydrering av røret med lyofilisert reaksjonsblanding. Hvis det oppstår instrumentsvikt, vil resultatene som oppnås være ubestemte eller ufullstendige.

11. Kvalitetskontroll

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™-system inneholder en intern kontroll (IC) i hvert reaksjonsrør som bekrefter at teknikken fungerer som den skal.

12. Ytelseegenskaper

12.1. Klinisk sensitivitet og spesifisitet

Den kliniske ytelsen til VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble testet ved bruk av kliniske og spikedede nasofaryngeale prøvepensler, og nasofaryngeale aspirater, som allerede var karakterisert som positive eller negative for *B. pertussis*, *B. parapertussis* og/eller *B. holmesii*. Resultatene var som følger:

	Sted	Prøvetype	Arbeidsflyt	Mål
1	CerTest Biotec (Zaragoza, Spania)	Nasofaryngeale prøvepensler (Cerba Xpert)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>B. pertussis</i>
2		Nasofaryngeale aspirater (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
3		Nasofaryngeale prøvepensler og aspirater (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
4		Nasofaryngeale prøvepensler (Eurofins)		<i>B. pertussis</i>
5		Nasofaryngeale prøvepensler (Cerba Xpert + Eurofins + simulated samples)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>

Tabell 16. Sted, prøvetype, arbeidsflyt og mål.

Sanne positive og negative verdier, falske positive og negative verdier, samt verdier for sensitivitet og spesifisitet for VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble regnet ut i forhold til hver komparatoranalyse som vist i tabellen nedenfor:

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

Tabell 17. TP (Sanne positive) og TN (negative) verdier, FP (falske positive) og (FN) negative verdier, sensitivitet, spesifisitet for VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

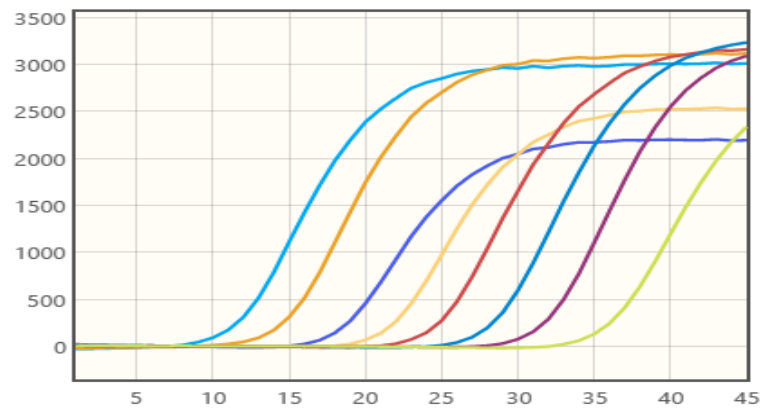
* Initiell karakterisering omfatter SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) og validert intern analyse av pertussis/parapertussismix for påvisning av *B. pertussis* og *B. parapertussis*, og SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm) for påvisning av *B. holmesii*, i Cerba Xpert-prøver.

Resultatene viser høyt samsvar for påvisning av *B. pertussis*, *B. parapertussis* og/eller *B. holmesii* ved bruk av VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

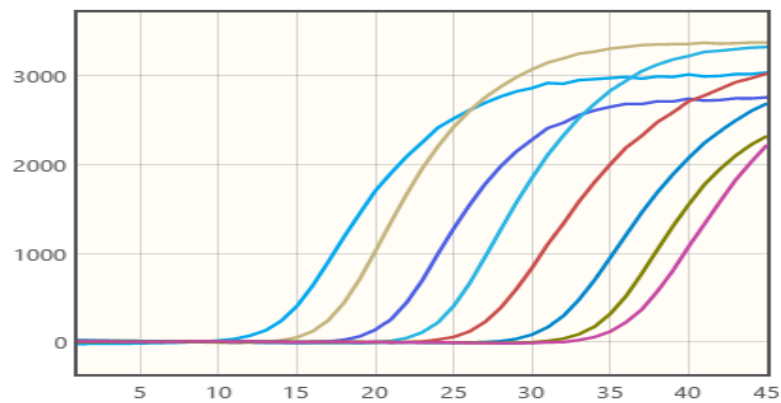
12.2. Analytisk sensitivitet

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

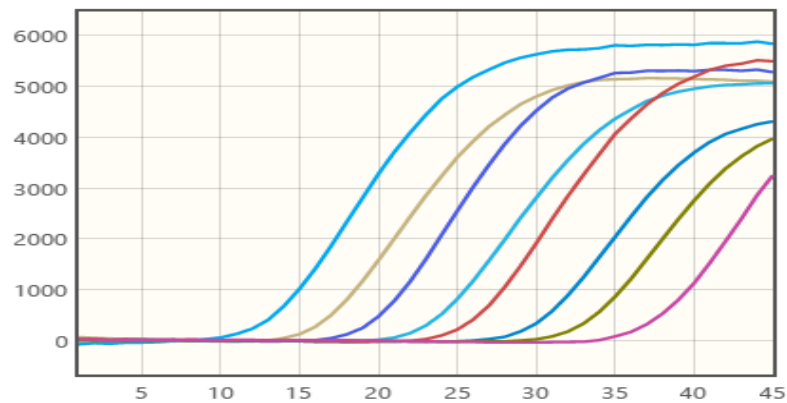
Figur 5. Fortynningserie av *Bordetella pertussis*-templat ($7,07 \times 10^4$ - $7,07 \times 10^{-3}$ CFU per reaksjon) kjørt på BD MAX™ System (kanal 475/520 (FAM)).

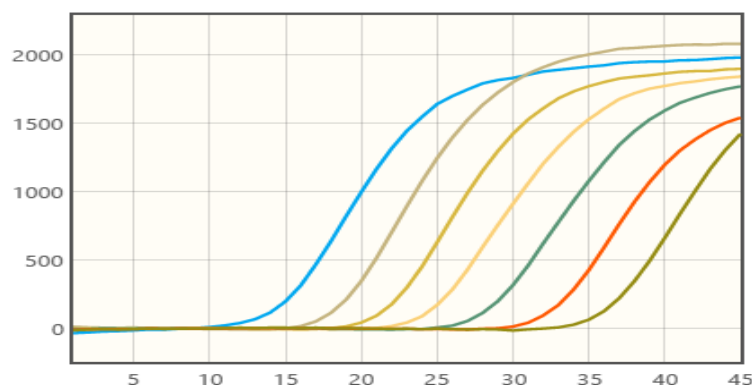


Figur 6. Fortynningserie av *Bordetella holmesii*-templat ($2,42 \times 10^3$ - $2,42 \times 10^{-4}$ CFU per reaksjon) kjørt på BD MAX™ System (kanal 475/520 (FAM)).



Figur 7. Fortynningserie av *Bordetella holmesii*-templat ($2,42 \times 10^3$ - $2,42 \times 10^{-4}$ CFU per reaksjon) kjørt på BD MAX™ System (kanal 585/630 (ROX)).



Figur 8. Fortynningsserie av *Bordetella parapertussis*-templat (7,07x10⁴ - 7,07x10⁻² CFU per reaksjon) kjørt på BD MAX™ System (kanal 630/665 (Cy5)).

12.3. Analytisk spesifisitet

Spesifisitet for analyse av *Bordetella* ble bekreftet ved testing av et panel bestående av forskjellige mikroorganismer forbundet med luftveissykdommer. Ingen kryssreaktivitet ble påvist mellom noen av de følgende testede mikroorganismene:

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

Tabell 18. Patogene mikroorganismer benyttet som referanse i denne studien.











12.4. Analytisk reaktivitet

Reaktiviteten til VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble evaluert mot DNA ekstrahert fra *B. pertussis*, *B. parapertussis*, og *B. holmesii* som templat, som viste positive resultater.

Bibliography/ Litteratur

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

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

	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>In vitro</i> -diagnostisk enhet		Keep dry Holdes tørr		Use by Brukes innen		Manufacturer Produsent		Batch code Partikode
	Consult instructions for use Les bruksanvisningen		Temperature limitation Temperaturgrenser		Contains sufficient for <n> test Inneholder nok til <n> tester		Unique Device Identification Unik enhetsidentifikasjon		Catalogue number Katalognummer

Trademarks

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

Change Control / Endringskontroll		
Version No. / Versjon nr.	Changes / Endringer	Date / Dato
00	Original version / Original versjon.	29/06/2022

Table A 2. Control change table/ Tabell over endringskontroller.

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