

# VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



*Bordetella*  
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Estas instruções de utilização aplicam-se à seguinte referência:

PRODUCT / PRODUTO	REFERENCE / REFERÊNCIA
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. / Referência do produto a usar com o BD MAX™ System.

**NOTE:** Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / As instruções de utilização (IDU) estão incluídas no kit em inglês/espanhol.

**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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto:viasure@certest.es) adresinden iletişime geçin.

Contact [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es) if your language is not on the list / Contacte [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es) se a sua língua não constar da lista.

*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: O utilizador deve notificar o fabricante e as autoridades competentes do Estado-Membro no qual está estabelecido como utilizador e/ou paciente de qualquer incidente grave relacionado com o produto.*

## 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

## Índice

1.	Utilização prevista .....	19
2.	Introdução e explicação .....	19
3.	Princípio do procedimento .....	19
4.	Reagentes fornecidos .....	20
5.	Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos.....	20
6.	Condições de transporte e armazenamento.....	21
7.	Precauções para o utilizador.....	21
8.	Procedimento do teste .....	22
8.1.	Colheita, armazenamento e transporte de amostras .....	22
8.2.	Preparação da amostra e extração de ADN .....	23
8.3.	Protocolo de PCR.....	23

---

9.	Interpretação dos resultados.....	27
10.	Limitações do teste.....	29
11.	Controlo de qualidade .....	30
12.	Características do teste .....	30
12.1.	Sensibilidade e especificidade clínica .....	30
12.2.	Sensibilidade analítica.....	31
12.3.	Especificidade analítica.....	33
12.4.	Reatividade analítica .....	33
	Bibliography/ Bibliografia .....	34
	Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos para componentes IVD e reagentes .....	34
	Trademarks.....	34

---

## ENGLISH

---

### 1. Intended use

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

### 2. Summary and Explanation

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

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

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

### 3. Principle of the procedure

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

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

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

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

Table 1. Target, channel and genes.

## 4. Reagents provided

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

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

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

## 5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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

## 6. Transport and storage conditions

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

## 7. Precautions for users

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

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

## 8. Test procedure

### 8.1. Sample collection, storage and transport

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

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

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

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

### 8.2. Sample preparation and DNA extraction

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



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

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

### 8.3. PCR protocol

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

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

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

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

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

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

Table 3. PCR settings.

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

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

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

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 5. PCR protocol.

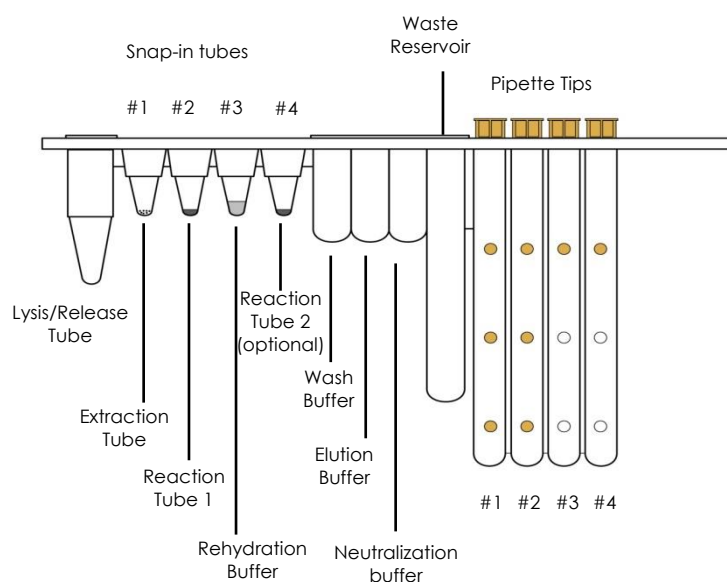
- 12) Click the "Save Test" button.

### 8.3.2. BD MAX™ Rack set up

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

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

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



### 8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

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

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

### 8.3.4. BD MAX™ report

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

## 9. Result interpretation

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

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

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

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

Results should be read and analyzed using the following table:

<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i> (475/520)	<i>B. holmesii</i> (585/630)	<i>B. parapertussis</i> (630/665)	Internal Control (530/565)	Interpretation
+	+	+	+/- <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).

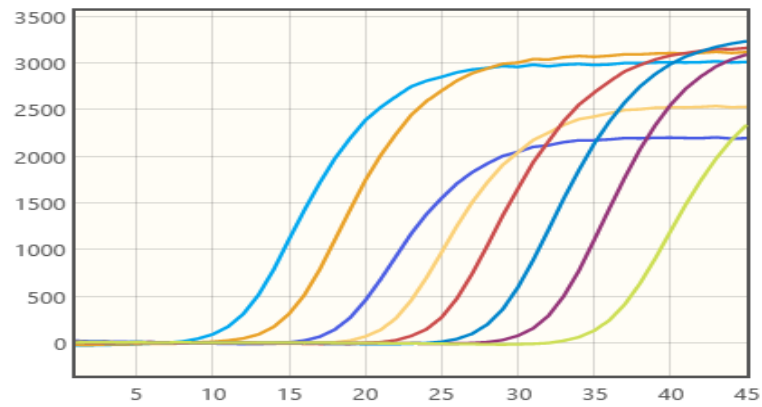


Figure 2. Dilution series of *Bordetella holmesii* ( $2.42 \times 10^3$  -  $2.42 \times 10^{-4}$  CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

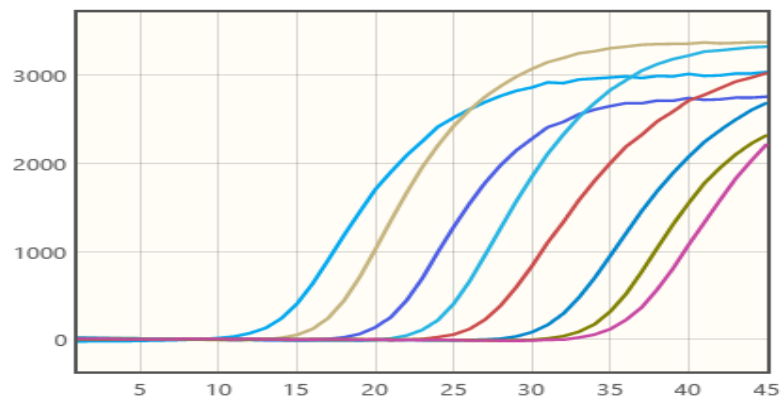


Figure 3. Dilution series of *Bordetella holmesii* ( $2.42 \times 10^3$  -  $2.42 \times 10^{-4}$  CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

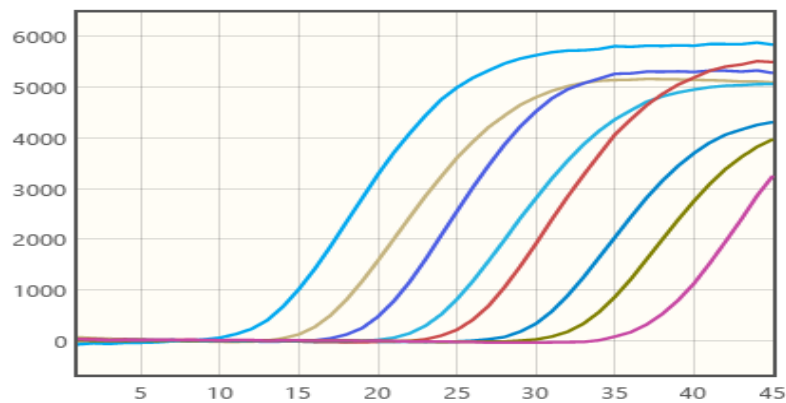
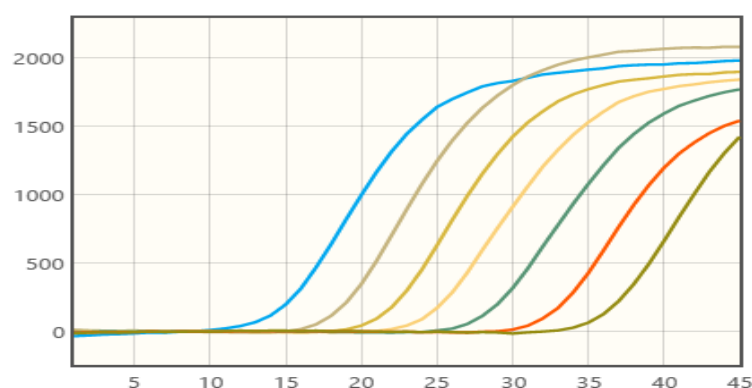


Figure 4. Dilution series of *Bordetella parapertussis* ( $7.07 \times 10^4$  -  $7.07 \times 10^{-2}$  CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



### 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.

## PORTUGUÊS

### 1. Utilização prevista

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System consiste num teste de PCR em tempo real automatizado pensado para a deteção e diferenciação qualitativas de ADN de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e/ou *Bordetella holmesii* em amostras respiratórias (zaragatoas nasofaríngeas e aspirados nasofaríngeos) de pacientes com suspeita de infeção respiratória pelo profissional de saúde (PS). Este teste destina-se a ser utilizado como um auxílio na identificação de infeção por *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e/ou *Bordetella holmesii*, em combinação com os sinais e sintomas clínicos do paciente e dos fatores de risco epidemiológicos. O ensaio usa o BD MAX™ System para a extração automatizada de ADN e posterior PCR em tempo real, usando os reagentes fornecidos combinados com os reagentes universais e materiais descartáveis para o BD MAX™. O ADN é extraído de amostras respiratórias, amplificado usando PCR em tempo real e detetado com sondas de corante repórter fluorescente específico para *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella holmesii*.

### 2. Introdução e explicação

O género *Bordetella* é composto por 8 espécies, das quais se sabe que 4 infetam o ser humano: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* e *B. bronchiseptica*. A causa mais importante da tosse convulsa (pertussis) é a infeção por *B. pertussis*, seguida de por *B. parapertussis*. *B. holmesii* foi isolada dos pacientes com doença subjacente grave, considerando que o *B. bronchiseptica* normalmente se limita a animais mas, ocasionalmente, foi também isolado em pacientes imunodeprimidos.

A tosse convulsa é uma doença muito contagiosa que normalmente se transmite de pessoa para pessoa através da tosse ou espirros, ou pelo contacto próximo com uma pessoa infetada num espaço respiratório comum. A evolução clínica da doença está dividida em três fases, que inclui as seguintes apresentações clínicas: catarral (coriza, febre baixa, tosse ligeira e ocasional), paroxísmica (inúmeras e rápidas crises de tosse, cianose, vômito e exaustão) e convalescente (recuperação gradual e tosses paroxísmicas menos persistentes).

Apesar da vacinação, a tosse convulsa permanece endémica na maior parte do mundo. É necessário o diagnóstico fiável para começar o tratamento apropriado e a profilaxia dos contactos, se necessário, particularmente em bebés não vacinados nos quais a tosse convulsa representa uma doença com risco de vida. Os testes de amplificação do ácido nucleico, incluindo a PCR e mais recentemente a PCR em tempo real, ultrapassam algumas das limitações dos métodos de cultura e serológicos para o diagnóstico de infeções de *Bordetella*. A maior parte dos testes de PCR baseiam-se na deteção das sequências de inserção (SI) presentes em múltiplas cópias por genoma, aumentando a sensibilidade dos testes de PCR.

### 3. Princípio do procedimento

O VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi concebido para a deteção e diferenciação qualitativas de ADN de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e/ou *Bordetella holmesii* em amostras respiratórias. Após o isolamento de ADN, a identificação destas estirpes de *Bordetella* é realizada pela

amplificação de uma região conservada de sequências de inserção IS481 para *Bordetella pertussis/holmesii*, pIS1001 para *Bordetella parapertussis* e hIS1001 para *Bordetella holmesii*, usando primers específicos e uma sonda com marcação fluorescente.

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System baseia-se na atividade da 5' exonuclease da DNA polimerase. Durante a amplificação do ADN, esta enzima hidrolisa a sonda ligada à sequência de ADN complementar, separando o fluoróforo do quencher. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente proporcional à quantidade do modelo alvo. Esta fluorescência é monitorizada no BD MAX™ System.

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contém em cada tubo todos os componentes necessários para o ensaio de PCR em tempo real (primers/sondas específicos, dNTPs, tampão, polimerase) num formato estabilizado, bem como um controlo interno para a monitorização do processo de extração e/ou inibição da atividade da polimerase.

Alvo	Canal	Gene
<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	475/520	Sequência de IS481
<i>B. holmesii</i>	585/630	Sequência de hIS1001
<i>B. parapertussis</i>	630/665	Sequência de pIS1001
Internal control (IC)	530/565	-

Tabela 10. Alvo, canais e genes.

## 4. Reagentes fornecidos

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inclui os seguintes materiais e reagentes detalhados na Tabela 2:

Reagente/Material	Descrição	Código de barras	Quantidade
<i>Bordetella</i> reaction tube	Uma mistura de enzimas, oligonucleótidos/sondas, tampão, dNTPs, estabilizadores e controlo interno em formato estabilizado.	Folha 1C	2 envelopes de 12 tubos transparentes
Rehydration Buffer tube	Solução para a reconstituição do produto estabilizado	Selo 11	1 envelope de 24 tubos transparentes

Tabela 11. Reagentes e materiais fornecidos no VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System com Cat. Ref.ª VS-BDT124 (444204).

## 5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

A lista seguinte inclui os materiais e o equipamento que são necessários para a utilização mas não vêm fornecidos no VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Equipamento de PCR em tempo real: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 ou 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vórtice.

- Micropipetas (entre 2 e 1000 µL).
- Água sem nuclease
- Pontas com filtro.
- Luvas descartáveis sem pó.

## 6. Condições de transporte e armazenamento

- O transporte e armazenamento do kit pode ser realizado de 2 a 40 °C até à data de validade indicada na etiqueta.
- Após a abertura dos envelopes de alumínio que contêm os tubos de reação, o produto pode ser utilizado até 28 dias.

## 7. Precauções para o utilizador

- O produto destina-se a ser utilizado apenas por utilizadores profissionais, como profissionais de saúde e técnicos de laboratório, com formação em técnicas de biologia molecular.
- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Não é recomendado utilizar o kit após a data de validade.
- Não utilizar o kit se a etiqueta de controlo da caixa exterior estiver rasgada ou danificada.
- Não utilizar os reagentes se o estojo exterior estiver aberto ou danificado aquando da receção.
- Não utilizar os reagentes se os envelopes ou as bolsas que protegem os tubos estiverem abertos ou danificados aquando da receção.
- Não utilizar os tubos de reação se o material dessecante incluído em cada envelope de alumínio não existir ou estiver danificado.
- Não remover o material dessecante dos envelopes de alumínio.
- Fechar os envelopes de alumínio que protegem os tubos de reação com o fecho zip imediatamente depois de casa utilização. Antes de fechar os envelopes, eliminar qualquer excesso de ar.
- Não utilizar os tubos de reagentes se o alumínio protetor estiver rasgado ou danificado.
- Não misturar reagentes de diferentes envelopes e/ou kits e/ou lotes.
- Proteger os reagentes da humidade. Uma exposição prolongada à humidade pode afetar o desempenho do produto.
- Proteger os componentes da luz.
- Nos casos em que sejam realizados outros testes de PCR na mesma área geral do laboratório, deve proceder com cuidado para garantir que o VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, o kit de extração BD MAX™ ExK™ TNA-3 e quaisquer reagentes adicionais requeridos para o teste e o BD MAX™ System não são contaminados. Evitar sempre a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase)/desoxirribonuclease (DNase) dos reagentes. Recomenda-se a utilização de pontas de pipeta estéreis, descartáveis, sem RNase/DNase, resistentes a aerossóis ou de deslocamento positivo. Utilizar uma ponta nova para cada espécime. É necessário mudar de luvas antes da manipulação dos reagentes e dos cartuchos (BD MAX™ PCR Cartridge).
- De modo a evitar a contaminação do ambiente por amplicões, não quebrar o BD MAX™ PCR Cartridge após a utilização. Os selos do BD MAX™ PCR Cartridge foram concebidos para evitar a contaminação.

- Conceber um fluxo de trabalho unidirecional. Deve-se começar na área de extração e, em seguida, passar para a área de amplificação e de detecção. Não coloque as amostras, o equipamento e os reagentes de volta na área na qual o passo anterior foi executado.
- Seguir as boas práticas do laboratório. Utilize vestuário de proteção, luvas descartáveis, óculos e máscara. Não comer, beber, fumar ou aplicar produtos de cosmética na área de trabalho. Lavar as mãos após terminar o teste.
- As amostras devem ser tratadas como potencialmente infecciosas e/ou com risco biológico, bem como todos os reagentes e materiais que tenham sido expostos às amostras, e devem ser manuseados de acordo com os regulamentos de segurança nacionais. Tomar as precauções necessárias durante a colheita, transporte, armazenamento, tratamento e eliminação de amostras.
- As amostras e reagentes têm de ser manuseados numa câmara de segurança biológica. Utilizar equipamento de proteção individual (EPI) consistente com as orientações atuais para o manuseamento de amostras potencialmente infecciosas. Eliminar os resíduos em conformidade com os regulamentos locais e nacionais.
- Recomenda-se a descontaminação periódica dos equipamentos utilizados habitualmente, em especial de micropipetas e das superfícies de trabalho.
- Em conformidade com o Regulamento (CE) N.º 1907/2006 (REACH), os VIASURE Real Time PCR Detection Kits não requerem Fichas de Dados de Segurança do Material (Safety Data Sheets) tendo em conta a sua classificação como não perigosos para a saúde e para o ambiente, pois não contêm substâncias e/ou misturas que cumpram os critérios de classificação de risco disponíveis no Regulamento (CE) N.º 1272/2008 (CLP) ou que estejam presentes em concentrações superiores ao valor estabelecido no regulamento mencionado para a respetiva declaração.
- Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter informações sobre advertências, precauções e procedimentos adicionais.

## 8. Procedimento do teste

### 8.1. Colheita, armazenamento e transporte de amostras

O VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi testado em amostras respiratórias (zaragatoas e aspirados nasofaríngeos). Outros tipos de amostras têm de ser validados pelo utilizador.

A colheita, armazenamento e transporte de espécies devem ser realizados segundo as condições validadas pelo utilizador. Em geral, as amostras respiratórias devem ser colhidas e etiquetadas adequadamente em recipientes limpos com ou sem meio de transporte (dependendo do tipo de amostra), e processadas com a maior brevidade possível para garantir a qualidade do teste. Os aspirados nasofaríngeos devem ser transportados a 2-8 °C durante até 72 horas, seguindo os regulamentos locais e nacionais para o transporte de material patogénico. Para o transporte de longo prazo (mais de 72 horas), recomendamos a expedição a -20°C ou menos. No entanto, as zaragatoas nasofaríngeas em meio de transporte universal (UTM) devem ser transportadas congeladas a -20°C ou menos. Recomenda-se a utilização de amostras recentes para o teste. As amostras podem ser armazenadas entre 2-8°C durante até 72 horas (aspirados nasofaríngeos) ou congeladas a -20°C ou idealmente -70°C (em UTM), para

a sua conservação. Devem ser evitados ciclos de congelação-descongelação para prevenir a degradação da amostra e dos ácidos nucleicos.

As amostras respiratórias têm de ser colhidas, transportadas e armazenadas de acordo com diretrizes laboratoriais apropriadas. Para detalhes, consulte a orientação do CDC (diretório de teste laboratorial de doenças infecciosas do CDC (2022). Website <https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/cdc-lab-tests.pdf>) e a orientação da 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).

Se forem usadas amostras de escarro, podem ser testadas de acordo com as recomendações citadas abaixo.

## 8.2. Preparação da amostra e extração de ADN

Realizar a preparação das amostras de acordo com as recomendações nas instruções de utilização do kit de extração utilizado, BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipete 200 µL de amostra para um tubo com tampão de amostra BD MAX™ ExK™ TNA-3 e feche o tubo com uma tampa septada. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com o funcionamento do BD MAX™ System Operation.

Repare que os procedimentos de preparação para a extração específica da aplicação devem ser desenvolvidos e validados pelo utilizador e que algumas outras amostras podem requerer pré-processamento. Por exemplo, amostras de escarros, adicione acetilcisteína (ref. de N-Acetil-L-cisteína recomendada A7250, Merck KGaA) à amostra numa relação de 1:1 (ou seja, 250 µL de escarro e 250 µL de acetilcisteína 100 mg/ml), misture por vórtex e aqueça a 95°C durante 10 minutos. Pipete 200 µL do escarro pré-tratado num tubo de tampão de amostra BD MAX™ ExK™ TNA-3 e feche o tubo com uma tampa septada. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com o funcionamento do BD MAX™ System Operation.

## 8.3. Protocolo de PCR

Nota: Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter instruções mais detalhadas.

### 8.3.1. Criação de um programa de teste de PCR para o VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: Caso já tenha criado o teste para o VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, pode saltar o passo 8.3.1 e ir diretamente para o 8.3.2.

- 1) No ecrã "Run" (Executar) do BD MAX™ System, selecionar o separador "Test Editor" (Editor de testes).
- 2) Clicar no botão "Create" (Criar).
- 3) No separador Informações básicas, na janela "Test Name" (Nome do teste), dê um nome ao seu teste: ou seja, VIASURE *Bordetella*.
- 4) No menu de lista pendente "Extraction Type" (Tipo de extração), selecionar "ExK TNA-3".

- 5) No menu de lista pendente "Master Mix Format" (Formato de mistura principal), escolha "Type 5" (Tipo 5).
  - a. Nota: O produto pode ser usado em combinação com um VIASURE for BD MAX™ test adicional, em seguida, selecione "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM com tampão de reidratação (tipo 5)).
- 6) Em "Sample extraction parameters" (Parâmetros de extração de amostra) selecionar "User defined" (Definidos por utilizador) e ajustar o volume para 350 µL.
- 7) Em "Ct Calculation" (Cálculo Ct) selecionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Ativar Ct aquando do cruzamento do limite).
- 8) Caso seja executado o software versão 5.00 ou mais recente e tenha lido o código de barras de tubos de encaixe de folha, no separador "Custom Barcodes" (Códigos de barras personalizados) selecione a configuração seguinte:
  - a. "Snap-In 2 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 2): 1C (relativo ao tubo de reação de *Bordetella* reaction tube).
  - b. "Snap-In 3 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 3): 11 (relativamente ao Rehydration Buffer tube).
  - c. "Snap-In 4 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 4): outro tubo de reação VIASURE (selo diferente) caso se opte pelo formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1).
- 9) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir os seguintes parâmetros: "Channel Settings" (Definições de canais), "Gains" (Ganhos) e "Threshold" (Limite) (Tabela 3).
  - a. Nota: O produto pode ser usado em combinação com um teste VIASURE for BD MAX™ adicional, e deve efetuar os passos de definições e teste da PCR para as posições de encaixe 2 (verde) e encaixe 4 (azul).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Ganho)	Threshold (Limiar)	Ct Min (Ct Mín.)	Ct Max (Ct Máx.)
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)	-	-	-	-	-

Tabela 12. "PCR settings" (Definições de PCR).

Nota: Recomenda-se o estabelecimento dos valores limite mínimos acima indicados para cada canal como valores de partida, mas os valores finais têm de ser determinados pelo utilizador final durante a interpretação do resultado, de modo a assegurar que os limites estão dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo. O valor limite para diferentes instrumentos pode variar devido a diferentes intensidades do sinal.

- 10) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir também os parâmetros "Spectral Cross Talk" (Interação espectral) (Tabela 4).



		False Receiving Channel (Canal receptor falso)				
Channel (Canal)		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal de excitação)	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	-

Tabela 13. Parâmetros de "Spectral Cross Talk" (interação espectral).

11) No separador "Test Steps" (Passos de teste), introduzir o protocolo de PCR (Tabela 5).

Step Name (Nome do passo)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tempo (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Deteção)
Initial denaturation (Desnaturação inicial)	Retenção	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Desnaturação e hibridização/extensão (recolha de dados))	2- Temperatura	45	10	95°C	-
			41	63°C	✓

Tabela 14. Protocolo de PCR.

12) Clicar no botão "Save Test" (Guardar teste).

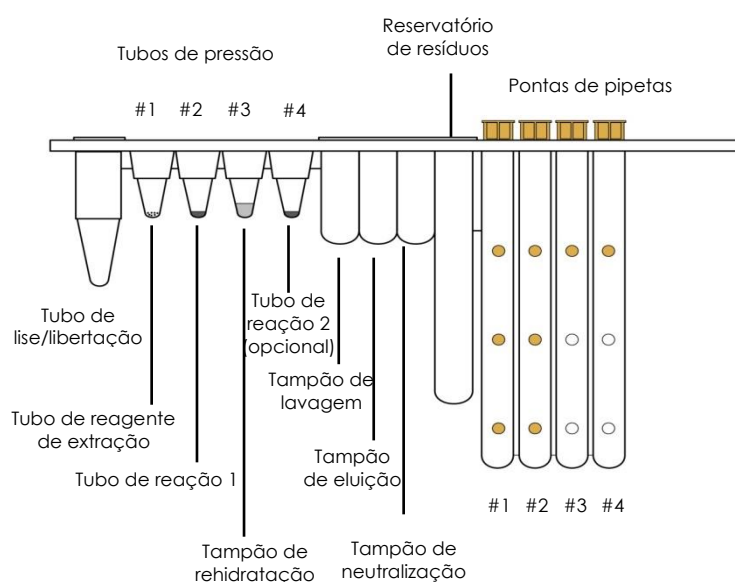
### 8.3.2. Preparação do suporte para tubos do BD MAX™ System

- Para cada amostra a testar, retirar uma tira de reagentes individual (Unitized Reagent Strips) do BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Bater levemente cada tira sobre uma superfície dura para se certificar de que todos os líquidos se encontram no fundo dos tubos e colocar a tira de reagentes no suporte para tubos do BD MAX™ System.
- Determinar e separar o número de tubos de reagente de extração necessários (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (selo branco)) da sua bolsa protetora. Colocar o(s) tubo(s) de reagente de extração (selo branco) na sua posição correspondente dentro da tira de reagentes TNA (Posição 1, código de cor branca no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar as bolsas protetoras com o fecho hermético.
- Determine e separe o número apropriado de tubos de reação de *Bordetella* reaction tube (folha 1C) e encaixe-os nas posições correspondentes na tira (posição de encaixe 2, código de cor verde no rack. Ver Figura 1).
  - Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
  - Para uma reidratação correta, deve certificar-se de que o produto liofilizado está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
    - Nota: Se escolher o formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM com tampão de reidratação (tipo 5)) (Secção 8.3.1), determine e separe o número

apropriado os tubos de reação VIASURE adicionais (folha diferente) e encaixe nas posições correspondentes na tira (posição de encaixe 4, código de cor azul no rack. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.

- 4) Remover o número necessário de Rehydration Buffer Tube (selo 11) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição de encaixe 3, código sem cor no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
  - a. De modo a assegurar uma transferência correta, deve certificar-se de que o líquido está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o tampão se encontra no fundo do tubo.

Figura 1. Tiras de reagente individuais BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) do BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



### 8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 1) Selecionar o separador "Work List" (Lista de trabalho) no ecrã "Run" (Executar) utilizando o software v4.50A ou um superior do BD MAX™ System.
- 2) No menu pendente "Test" (Teste), selecione VIASURE *Bordetella* (se ainda não tiver sido criado, consulte a Secção 8.3.1).
- 3) Selecionar no menu de lista pendente o número de lote do kit de extração utilizado (que se encontra na caixa exterior). Este passo é opcional.
- 4) Introduzir o número de identificação do Sample Buffer Tube na janela "Sample tube" (Tubo de amostra) no separador "Work List" (Lista de trabalho), através da digitalização do código de barras com o leitor ou através de introdução manual.
- 5) Preencher a janela "Specimen/Patient ID" (ID de amostra/doente) e "Accession" (Acesso) do separador "Work list" (Lista de trabalho) e clicar no botão "Save" (Guardar). Continuar até estarem introduzidos todos os tubos de tampão de amostra (Sample Buffer Tubes). Certificar-se de que a identificação da amostra/doente e os Sample Buffer Tube estão corretamente equiparados.

- 6) Colocar o tampão de amostra (Sample Buffer Tube) preparado no(s) BD MAX™ Rack(s) (suportes para tubos do BD MAX™ System).
- 7) Colocar o(s) suporte(s) no BD MAX™ System (o suporte para tubos A encontra-se no lado esquerdo do BD MAX™ System e o suporte para tubos B no lado direito).
- 8) Colocar o número necessário de BD MAX™ PCR Cartridge no BD MAX™ System.
- 9) Fechar a porta do BD MAX™ System.
- 10) Clicar em "Start Run" (Iniciar execução) para iniciar o procedimento.

### 8.3.4. Relatório BD MAX™

- 1) No menu principal, clicar no botão "Results" (Resultados).
- 2) Fazer duplo clique no teste incluído na lista de ensaios ou selecionar o teste e premir o botão "view" (Visualizar).
- 3) Clicar no botão "Print" (Imprimir), selecionar: "Run Details, Test Details and Plot..." (Detalhes da execução, detalhes do teste e gráfico...).
- 4) Clicar no botão "Print" (Imprimir) ou "Export" (Exportar) no ecrã "Run Reports" (Relatórios da execução).

## 9. Interpretação dos resultados

Para uma descrição detalhada de como analisar os dados, consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System.

A análise dos dados é feita pelo software BD MAX™ de acordo com as instruções do fabricante. O software do BD MAX™ System disponibiliza os valores de Ct e mostra as curvas de amplificação para cada um dos canais de deteção de cada amostra analisada da seguinte forma:

- Um valor de Ct de 0 indica que o software não calculou nenhum valor de Ct com o limiar especificado (consultar a Tabela 3). Se a curva de amplificação mostra um "0" como valor de Ct, é necessário analisá-la manualmente.
- Um valor de Ct de -1 indica que não houve processo de amplificação.
- Qualquer outro valor de Ct deve ser interpretado em correlação com a curva de amplificação e segundo as orientações de interpretação descritas na Tabela 6.

Verificar a emissão do sinal do controlo interno para confirmar o correto funcionamento da mistura de amplificação. Para além disso, verificar que não há nenhuma anomalia do BD MAX™ System.

Os resultados devem ser lidos e analisados utilizando a tabela seguinte:

<b>B. pertussis/ B. holmesii (475/520)</b>	<b>B. holmesii (585/630)</b>	<b>B. parapertussis (630/665)</b>	<b>Controlo interno (530/565)</b>	<b>Interpretação</b>
+	+	+	+/- <sup>1</sup>	Foi detetado ADN de <i>B. pertussis</i> e/ou <i>B. holmesii</i> e <i>B. parapertussis</i> detetado <sup>1</sup>
-	-	-	+ <sup>2</sup>	Foi detetado ADN de <i>B. pertussis</i> , <i>B. holmesii</i> e <i>B. parapertussis</i> Não detetado <sup>2</sup>
+	-	-	+/- <sup>1</sup>	Foi detetado ADN de <i>B. pertussis</i> , não foi detetado ADN de <i>B. holmesii</i> e <i>B. parapertussis</i> <sup>1</sup>
+	+	-	+/- <sup>1</sup>	Foi detetado ADN de <i>B. pertussis</i> e/ou <i>B. holmesii</i> , não foi detetado ADN de <i>B. parapertussis</i> <sup>1</sup>
+	-	+	+/- <sup>1</sup>	Foi detetado ADN de <i>B. pertussis</i> e <i>B. parapertussis</i> , não foi detetado ADN de <i>B. holmesii</i> <sup>1</sup>
-	+ <sup>3</sup>	-	+/- <sup>1</sup>	Foi detetado ADN de <i>B. holmesii</i> , não foi detetado ADN de <i>B. pertussis</i> e <i>B. parapertussis</i> <sup>1</sup>
-	+ <sup>3</sup>	+	+/- <sup>1</sup>	Foi detetado ADN de <i>B. holmesii</i> e <i>B. parapertussis</i> , não foi detetado ADN de <i>B. pertussis</i> <sup>1</sup>
-	-	+	+/- <sup>1</sup>	Foi detetado ADN de <i>B. parapertussis</i> , não foi detetado ADN de <i>B. pertussis</i> e <i>B. holmesii</i> <sup>1</sup>
-	-	-	- <sup>2</sup>	Resultado não resolvido (UNR) Resultado obtido na presença de inibidores na reação de PCR ou quando ocorre um problema geral (não indicado por um código de erro) nos passos de processamento e/ou amplificação da amostra. <sup>2</sup>
IND	IND	IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro.
INC	INC	INC	INC	Resultado incompleto do ensaio (INC). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa.

Tabela 15. Interpretação da amostra.

+: Houve amplificação.

-: Não houve amplificação.

**1** Uma amostra é considerada positiva se o valor de Ct obtido for  $\leq 40$ . O controlo interno (CI) poderá mostrar ou não um sinal de amplificação. Por vezes, a deteção do CI não é necessária porque um elevado número de cópias do alvo pode causar uma amplificação preferencial de ácidos nucleicos específicos do alvo.

**2** Uma amostra é considerada negativa se a amostra não mostrar um sinal de amplificação no sistema de deteção mas o controlo interno for positivo ( $Ct \leq 35$ ). A inibição da reação de PCR pode ser excluída pela amplificação do controlo interno. Em caso de resultados não resolvidos (UNR), ausência do sinal de controlo interno nas amostras negativas, é recomendado repetir o ensaio seguindo as indicações abaixo.

**3** Foi detetado ADN de *B. holmesii* em dois canais diferentes, 475/520 (FAM) e 585/630 (ROX) mas, devido a uma sensibilidade mais alta de 585/630 (ROX) em amostras positivas em torno do LdD, é possível obter o sinal apenas nesse canal.

Em caso de um resultado ambíguo contínuo, é recomendável reler as instruções de utilização, o processo de extração usado pelo utilizador; para verificar o desempenho correto de cada passo da PCR e rever os parâmetros e para verificar a forma sigmoideia da curva e a intensidade da fluorescência.

NOTA: Encontra-se disponível volume suficiente para um teste de repetição a partir do Sample Buffer Tube. Para os tubos de tampão de amostra BD MAX™ a 2–8 °C ou 25°C, deverá ser realizado um novo teste dentro de 24 horas.

Os resultados do teste devem ser avaliados por um profissional de saúde no contexto da história clínica, sintomas clínicos e outros testes diagnósticos.

## 10. Limitações do teste

- Os resultados do teste devem ser avaliados por um profissional de saúde no contexto da história clínica, sintomas clínicos e outros testes diagnósticos.
- Embora este ensaio possa ser usado com outros tipos de amostras, foi validado com zaragatoas nasofaríngeas e aspirados nasofaríngeos. Se forem usadas amostras de escarro, podem ser testadas de acordo com as recomendações citadas acima.
- Para o bom desempenho do teste, o produto liofilizado deve estar no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao selo de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
- O aparecimento da mistura de reação num formato estabilizado, normalmente depositada no fundo do tubo, diferente do habitual (sem um formato cónico, não homogénea, de tamanho menor/maior e/ou uma cor diferente de esbranquiçado) não altera a funcionalidade do teste.
- A qualidade do teste depende da qualidade da amostra; o ácido nucleico tem de ser corretamente extraído das amostras clínicas.
- O teste é um teste qualitativo e não fornece valores quantitativos nem indica o número de organismos presentes.
- Podem ser detetados níveis extremamente baixos de alvos abaixo do limite de deteção, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- Subsiste a possibilidade de resultados falsos positivos devido a reações cruzadas *por amostras com suspeita de Bordetella* que contenham concentrações elevadas de ADN do alvo ou contaminação decorrente dos produtos da PCR de reações anteriores.
- As combinações de primer e sonda específicas para a deteção de sequência de IS481, hIS1001 e pIS1001, usadas no VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, não mostram homologies combinadas significativas com o genoma humano, a microflora humana ou outros microrganismos respiratórios, que podem resultar em falsos positivos previsíveis.
- Resultados falsos negativos podem ser causados por vários fatores e respetivas combinações, incluindo:
  - Métodos incorretos de colheita, transporte, armazenamento e/ou manuseamento de espécimes.
  - Procedimentos de processamento incorretos (incluindo extração de ADN).
  - Degradação do ADN durante a expedição/armazenamento e/ou processamento das amostras.
  - Mutações ou polimorfismos nas regiões de ligação do primer ou sonda podem afetar a deteção de estirpes novas ou desconhecidas.
  - Níveis do organismo na amostra abaixo do limite de deteção para o ensaio.
  - A presença de inibidores de qPCR ou de outros tipos de substâncias interferentes.
  - A não observância das instruções de utilização e do procedimento do ensaio.

- Um resultado de teste positivo não indica necessariamente a presença de bactérias viáveis e não implica que estas bactérias sejam infecciosas ou que sejam agentes causadores de sintomas clínicos. No entanto, um resultado positivo é indicativo da presença de sequências dos alvos de *Bordetella*.
- Se os testes de diagnóstico de outras doenças respiratórias forem negativos e a apresentação clínica e informações epidemiológicas do paciente forem sugestivas de infeção por *B. pertussis*, *B. parapertussis* e/ou *B. holmesii*, deve ser ponderado um resultado falso negativo e debater testar novamente o mesmo.
- Um resultado negativo não exclui a presença de ADN de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e/ou *B. holmesii* numa amostra clínica. Se as observações clínicas, a história do paciente as informações epidemiológicas forem sugestivas de infeção por *B. pertussis*, *B. parapertussis* e/ou *B. holmesii*, deverá ser ponderado um novo teste aumentando o volume da amostra.
- Caso se obtenha um resultado Não resolvido, Indeterminado ou Incompleto usando o VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, é necessário voltar a testar. Os resultados não resolvidos podem dever-se à presença de inibidores na amostra ou a uma reidratação incorreta do tubo de mistura da reação liofilizada. Se ocorrer uma avaria no instrumento, serão obtidos resultados indeterminados ou incompletos.

## 11. Controlo de qualidade

O VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contém um controlo interno (CI) em cada tubo de reação, que confirma a aplicação correta da técnica.

## 12. Características do teste

### 12.1. Sensibilidade e especificidade clínica

O desempenho clínico do VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi testado usando zaragatoas nasofaríngeas e aspirados nasofaríngeos clínicos e reforçados, já caracterizados como positivos ou negativos por *B. pertussis*, *B. parapertussis* e/ou *B. holmesii*. Os resultados foram os seguintes:

	Centro	Tipo de amostra	Fluxo de trabalho	Alvo
1	CerTest Biotec (Zaragoza, Espanha)	Zaragatoas nasofaríngeas (Cerba Xpert)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>B. pertussis</i>
2		Aspirados nasofaríngeos (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
3		Zaragatoas e aspirados nasofaríngeos (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
4		Zaragatoas nasofaríngeas (Eurofins)		<i>B. pertussis</i>
5		Zaragatoas nasofaríngeas (Cerba Xpert + Eurofins + amostras simuladas)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>

Tabela 16. Centro, tipo de amostra, fluxo de trabalho e alvo.

Os valores positivos e negativos verdadeiros, os valores positivos e negativos falsos, a sensibilidade e a especificidade do VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foram calculados em relação a cada ensaio comparativo, conforme mostrado na tabela seguinte:

Centro	Ensaio comparador	Alvo	PV	NV	PF	NF	Sensibilidade	Especificidade
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)
	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. parapertussis</i>	28	182	0	2	0,933 (0,77-0,99)	1 (0,98- 1)
	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	210	0	1	0,5 (0,01-0,987)	1 (0,98- 1)
4	Validados no ensaio interno de mistura de <i>pertussis/parapertussis</i>	<i>B. pertussis</i>	43	54	0	3	0,935 (0,821-0,986)	1 (0,966- 1)
5	Caracterização inicial*	<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)

Tabela 17. Os valores positivos e negativos verdadeiros, os valores positivos e negativos falsos, a sensibilidade e a especificidade do VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

\* A caracterização inicial inclui o SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) e o ensaio interno validado de mistura de *pertussis/parapertussis* para a detecção de *B. pertussis* e *B. parapertussis* e o SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm) para a detecção de *B. holmesii*, em amostras Cerba Xpert.

Os resultados mostram uma concordância alta para a detecção de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e/ou *B. holmesii* usando o VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

## 12.2. Sensibilidade analítica

O VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System possui um limite de detecção (LdD) de 1,2 CFU/mL de amostra para *B. pertussis*,  $4 \times 10^{-2}$  CFU/mL de amostra para *B. holmesii* e 12 CFU/mL de amostra para *B. parapertussis*, com uma taxa positiva de  $\geq 95\%$ , em amostras de zaragatoas nasofaríngeas.

Figura 5. Modelos de série de diluição de *Bordetella pertussis* ( $7,07 \times 10^4$  -  $7,07 \times 10^{-3}$  CFU por reação) no BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

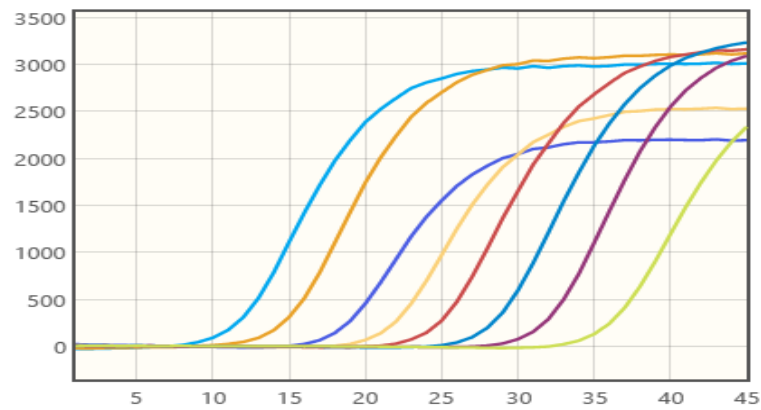


Figura 6. Modelo de série de diluição de *Bordetella holmesii* ( $2,42 \times 10^3$  -  $2,42 \times 10^{-4}$  CFU por reação) executado no BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

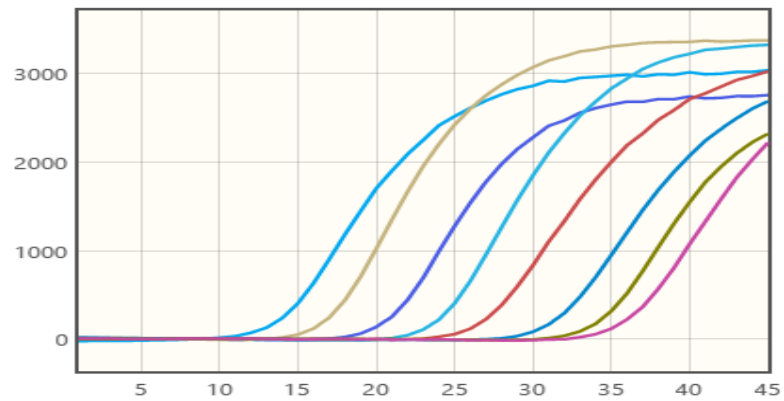


Figura 7. Modelos de série de diluição de *Bordetella holmesii* ( $2,42 \times 10^3$  -  $2,42 \times 10^{-4}$  CFU por reação) no BD MAX™ System (canal 585/630 (ROX)).

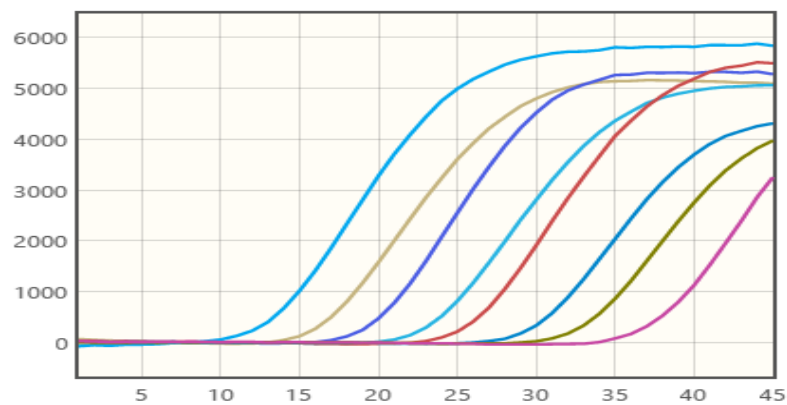
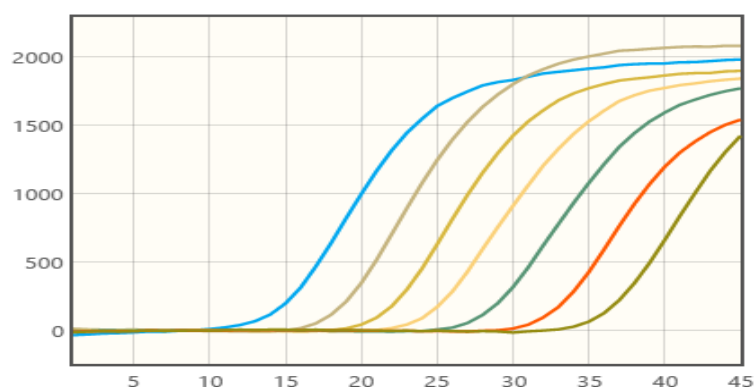




Figura 8. Modelos de série de diluição de *Bordetella parapertussis* ( $7,07 \times 10^4$  -  $7,07 \times 10^{-2}$  CFU por reação) no BD MAX™ System (canal 630/665 (Cy5)).

### 12.3. Especificidade analítica

A especificidade do ensaio de *Bordetella* foi confirmada através do teste de um painel contendo diferentes microrganismos associados a doenças respiratórias. Não foi detetada nenhuma reatividade cruzada entre qualquer um dos seguintes microrganismos testados:

Teste de reatividade cruzada					
Adenovírus humano tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	Vírus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
Bocavirus	-	Vírus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella pneumophila</i> serogrupo 1	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Vírus Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	Coronavírus MERS	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Vírus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Metapneumovírus A e B humano	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genótipo A e C	-	Vírus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
Estirpe de <i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Vírus Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (Clade 3C2a.1)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Coronavírus humano 229E, OC43 e NL63	-	Vírus Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Vírus parainfluenza humano 1, 2, 3 e 4	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Vírus Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Tipo A1 e g885652	-
Vírus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Vírus Influenza B/Florida/04/06	-	Vírus sincicial respiratório (RSV) tipos A e B	-
Vírus Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	-	Vírus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Rinovírus humano	-
Influenza A/California/7/2009 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella bozemanii</i> serotipo 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i> , subespécie <i>aureus</i>	-
Vírus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Vírus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-		-

Tabela 18. Microrganismos patogênicos de referência utilizados neste estudo.











### 12.4. Reatividade analítica

A reatividade do VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi avaliada em comparação com ADN extraído de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* como modelos, mostrando resultados positivos.

## 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/ Símbolos para componentes IVD e reagentes

 In vitro diagnostic device Produto para diagnóstico <i>In vitro</i>	 Keep dry Armazenar em local seco	 Use by Data de validade	 Manufacturer Fabricante	 Batch code Número de lote
 Consult instructions for use Consultar as instruções de utilização	 Temperature limitation Limitação de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contém <n> teste(s)	 Unique Device Identification Identificação única de dispositivo	 Catalogue number Número de referência

## Trademarks

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

<b>Change Control / Controlo de alterações</b>		
<b>Version No. / Versão n.º</b>	<b>Changes / Alterações</b>	<b>Date / Data</b>
00	Original version / Versão original.	29/06/2022

Table A 2. Control change table/ Tabela de controlo de alterações.

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