

# VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



*Bordetella*  
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Estas instrucciones de uso aplican para la siguiente referencia:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERENS
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. / Referens för produkt som ska användas med BD MAX™ System.

**NOTE:** Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / En engelsk/spansk bruksanvisning medföljer i kittet.

**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 / Kontakta [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es) om ditt språk inte finns med på listan.

*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.*

*Obs! Användaren ska meddela tillverkaren och den behöriga myndigheten i användarens eller patientens medlemsstat i händelse av en allvarlig incident kopplad till produkten.*

## 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

## Innehåll

1.	Avsedd användning .....	19
2.	Sammanfattning och förklaring.....	19
3.	Procedurprincip.....	19
4.	Medföljande reagenser.....	20
5.	Reagenser och utrustning som ska tillhandahållas av användaren.....	20
6.	Transport- och förvaringsförhållanden .....	21
7.	Försiktighetsåtgärder.....	21
8.	Testprocedur.....	22
8.1.	Insamling, förvaring och transport av prover .....	22
8.2.	Provberedning och DNA-extraktion .....	22
8.3.	PCR-protokoll.....	23

---

9.	Resultatfolkning .....	26
10.	Testets begränsningar.....	28
11.	Kvalitetskontroll.....	29
12.	Prestandaegenskaper .....	29
12.1.	Klinisk sensitivitet och specificitet .....	29
12.2.	Analytisk sensitivitet .....	30
12.3.	Analytisk specificitet.....	32
12.4.	Analytisk reaktivitet .....	32
	Bibliography/ Bibliografi.....	33
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboler för IVD-komponenter och 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. 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.

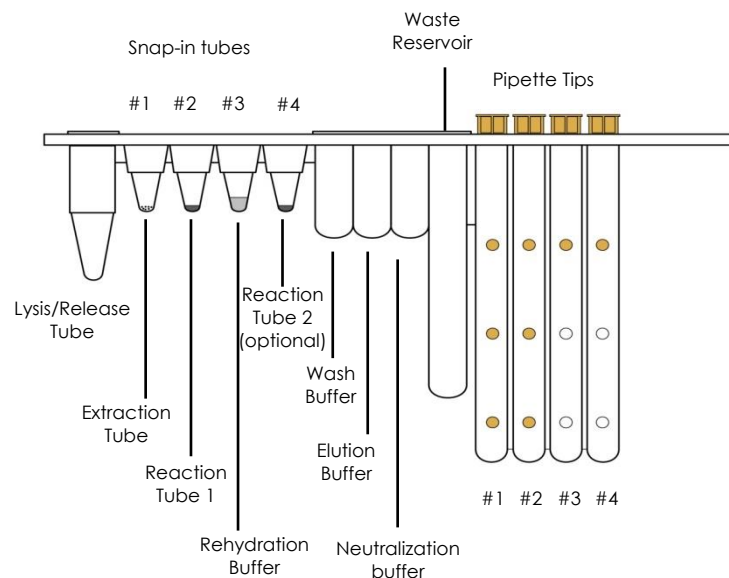
- 12) Click the "Save Test" button.

### 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).

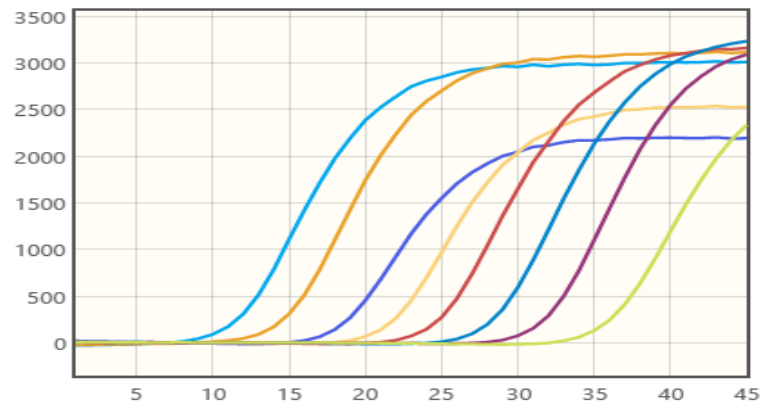


Figure 2. Dilution series of *Bordetella holmesii* ( $2.42 \times 10^3$  -  $2.42 \times 10^{-4}$  CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

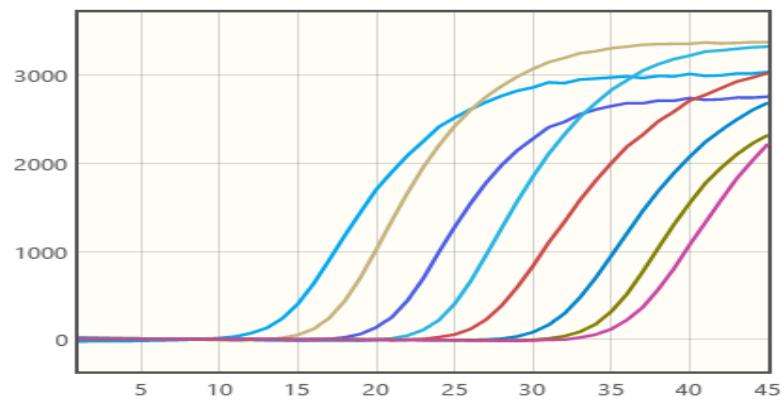


Figure 3. Dilution series of *Bordetella holmesii* ( $2.42 \times 10^3$  -  $2.42 \times 10^{-4}$  CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

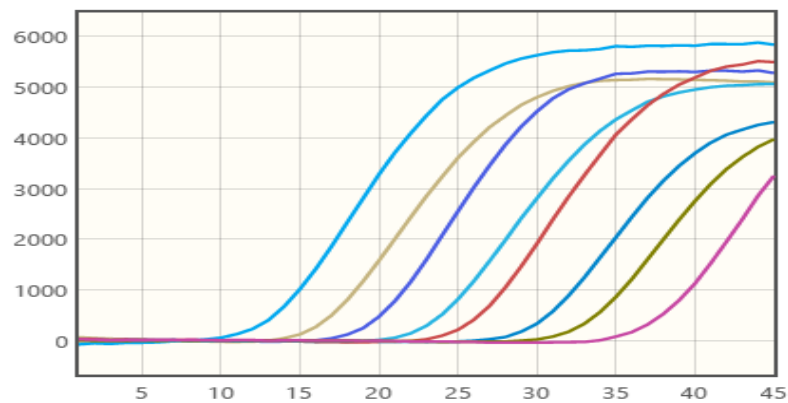
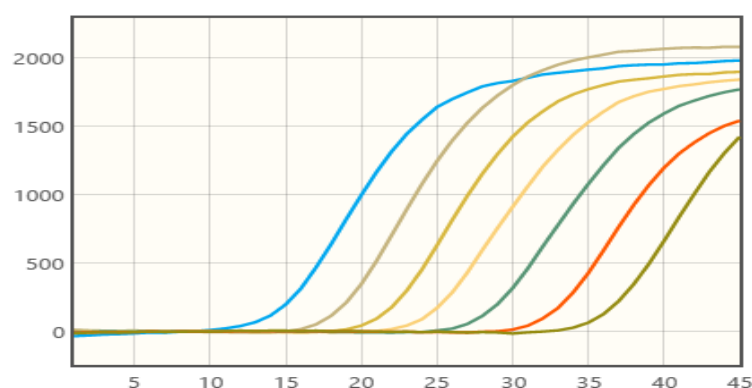


Figure 4. Dilution series of *Bordetella parapertussis* ( $7.07 \times 10^4$  -  $7.07 \times 10^{-2}$  CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



### 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.

## SVENSKA

---

### 1. Avsedd användning

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System är ett automatiserat Realtids-PCR-test utformat för kvalitativ detektion och differentiering av DNA från *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* och/eller *Bordetella holmesii* i luftvägsprover (nasofaryngeala prover och nasofaryngeala aspirat) från patienter som av sjukvårdspersonal misstänks ha luftvägsinfektion. Detta test är avsett att användas som en hjälp för identifiering av *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* och/eller *Bordetella holmesii* i kombination med patientens kliniska tecken och symtom samt epidemiologiska riskfaktorer. Analysen använder BD MAX™ System för automatiserad extraktion av DNA och efterföljande Realtids-PCR som använder medföljande reagenser kombinerade med universella reagenser och engångsartiklar för BD MAX™ System. DNA extraheras från luftvägsprover som amplifieras med användning av Realtids-PCR-test och detekteras med fluorescerande rapportörfärgprober som är specifika för *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* och *Bordetella holmesii*.

### 2. Sammanfattning och förklaring

Släktet *Bordetella* består av 8 arter, varav 4 är kända för att orsaka infektioner hos människor: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* och *B. bronchiseptica*. De viktigaste orsakerna till kikhosta (pertussis) är *B. pertussis*-infektion följt av *B. parapertussis*. *B. holmesii* har isolerats från patienter med en allvarlig underliggande sjukdom, medan *B. bronchiseptica* vanligtvis är begränsad till djur men har ibland även isolerats från immunkomprometterade patienter.

Kikhosta är en mycket smittsam sjukdom som sprids från person till person och vanligtvis genom hosta eller nysningar eller genom nära kontakt med en smittad person i ett gemensamt andningsutrymme. Sjukdomens kliniska förlopp är uppdelat i tre stadier som omfattar följande kliniska faser: katarral (snuva, låggradig feber, mild och tillfällig hosta), paroxysmal (paroxysmer med många och snabba hostningar, cyanos, kräkningar och utmattning) och konvalescens (gradvis återhämtning och mindre ihållande paroxysmal hosta).

Trots vaccination är kikhosta fortfarande endemisk i de flesta områden i världen. En tillförlitlig diagnos krävs för att påbörja lämplig behandling och profylax till närlagda personer vid behov, särskilt för ovaccinerade spädbarn där pertussis kan utgöra en livshotande sjukdom. Nukleinsyraamplifieringstest, däribland PCR och nyligen Realtids-PCR, åtgärdar vissa av begränsningarna hos odling och serologiska metoder för diagnos av *Bordetella*-infektioner. De flesta PCR-test baseras på detektion av insättningssekvenser (IS) som finns i flera kopior per genom, vilket ökar känsligheten hos PCR-test.

### 3. Procedurprincip

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System är utformat för kvalitativ detektion och differentiering av DNA från *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* och/eller *Bordetella holmesii* i luftvägsprover. Efter DNA-isolering utförs identifiering av dessa stammar av *Bordetella* genom amplifiering av en konserverad region av insättningssekvenserna IS481 för *Bordetella pertussis/holmesii*, pIS1001 för *Bordetella parapertussis* och hIS1001 för *Bordetella holmesii*, med specifika primrar och en fluorescensmärkt prob.

VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System baseras på DNA-polymerasets 5'-exonukleasaktivitet. Under DNA-amplifieringen klyver detta enzym proben som är bunden till den komplementära DNA-sekvensen, vilket separerar quencher-färgen (släckare) från rapportören. Denna reaktion genererar en ökning av fluorescenssignalen som är proportionell mot mängden av mållmall. Denna fluorescens mäts på BD MAX™ System.

Varje rör av VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System innehåller alla de komponenter som krävs för realtids-PCR-analys (specifika primrar/prober, dNTP, buffert och polymeras) i stabiliserad form samt en intern kontroll för att övervaka extraktionsprocessen och/eller inhiberingen av polymerasaktiviteten.

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

Tabell 10. Mål, kanal och gener.

## 4. Medföljande reagenser

VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System omfattar följande material och reagenser som anges i tabell 2:

Reagens/material	Beskrivning	Streckkod	Mängd
Bordetella reaction tube	En blandning av enzymer, primrar, prober, buffert, dNTP, stabiliserande medel och intern kontroll i stabiliserad form	1C-folie	2 påsar med 12 genomskinliga rör
Rehydration Buffer tube	Lösning för att bereda den stabiliserade produkten	11-folie	1 påse med 24 genomskinliga rör

Tabell 11. Reagenser och material som medföljer VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med kat. nr VS-BDT124 (444204).

## 5. Reagenser och utrustning som ska tillhandahållas av användaren

Följande lista omfattar material och utrustning som krävs för användning men som inte medföljer i VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Realtids-PCR-instrument: BD MAX™ System(Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 eller 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortexblandare.
- Mikropipetter (noggrannhet mellan 2 och 1 000 µl).
- Nukleasfritt vatten.
- Filterspetsar.
- Puderfria engångshandskar.

## 6. Transport- och förvaringsförhållanden

- Satserna kan transporteras och förvaras vid 2–40 °C fram till utgångsdatumet som anges på etiketten.
- Efter att ha öppnat de aluminiumpåsar som innehåller reaktionsrören kan produkten användas i upp till 28 dagar.

## 7. Försiktighetsåtgärder

- Produkten är avsedd att användas enbart av yrkesmässiga användare, exempelvis laboratoriepersonal, sjukvårdspersonal och tekniker, vilka har utbildning i molekylärbiologiska tekniker.
- För *in vitro*-diagnostik.
- Använd inte utgångna reagenser och/eller utgången material.
- Använd inte satsen om etiketten som förseglar den yttre lådan är bruten.
- Använd inte reagenser om den skyddande lådan är öppen eller om förseglingen är bruten vid ankomst.
- Använd inte reagenser om de skyddande påsarna är öppna eller om förseglingen är bruten vid ankomst.
- Använd inte reagenser om torkmedel inte finns eller inte har fungerat i reagenspåsar.
- Ta inte ut torkmedel från reagenspåsar.
- Stäng reagensernas skyddande påsar med blixtlås-förseglingen direkt efter varje användning. Avlägsna eventuell luft i påsarna före försegling.
- Använd inte reagenser om folien är bruten eller skadad.
- Blanda inte reagenser från olika påsar och/eller satser och/eller partier.
- Skydda reagenser från fukt. Längre tids exponering för fukt kan påverka produktprestanda.
- Förvara komponenter borta från ljus.
- I fall då andra PCR-tester utförs i samma allmänna område av laboratoriet måste varsamhet iaktas för att säkerställa att VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, ytterligare reagenser som krävs för testning och BD MAX™ System inte är kontaminerade. Undvik alltid kontamination av reagenser från mikroorganismer och ribonukleas (RNAs)/deoxyribonukleas (DNAs). Användning av sterila, RNAs/DNAs-fria och aerosolresistenta pipettspetsar eller pipettspetsar av typen positiv förskjutning ("positive displacement") rekommenderas. Använd en ny spets för varje prov. Skyddshandskar måste bytas före hantering av reagenser och kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge).
- I syfte att undvika kontamination av miljön med amplikoner ska BD MAX™ PCR Cartridge inte brytas itu efter användning. Tätningarna på BD MAX™ PCR Cartridge är utformade för att förhindra kontamination.
- Utforma ett enkelriktat arbetsflöde. Det bör börja i extraktionsområdet och sedan flytta till amplifierings- och detektionsområdet. Flytta inte prover, utrustning och reagenser tillbaka till området där det föregående steget utfördes.
- Följ god laboratoriesed. Använd skyddskläder, använd engångshandskar, skyddsglasögon och mask. Ät inte, drick inte, rök inte och använd inte smink i arbetsområdet. Tvätta händerna efter att testet har slutförts.
- Prover måste behandlas som potentiellt smittförande och/eller biofarliga, precis som alla reagenser och allt material som har exponerats för proverna. De måste hanteras enligt nationella säkerhetsbestämmelser. Vidta nödvändiga försiktighetsåtgärder vid insamling, transport, förvaring, hantering och kassering av prover.

- Prover och reagenser måste hanteras i ett biologiskt säkerhetskåp. Använd personlig skyddsutrustning som uppfyller gällande riktlinjer för hantering av potentiellt smittsamma prover. Kassera avfall enligt lokala och nationella bestämmelser.
- Regelbunden dekontaminering av den utrustning som används ofta rekommenderas, särskilt mikropipetter och arbetsytor.
- I enlighet med direktiv (EG) nr 1907/2006 (REACH) krävs inte materialsäkerhetsdatablad (Safety Data Sheets) för "VIASURE Real Time PCR Detection Kit", pga. dess klassificering som ofarlig för hälsa och miljö, eftersom den inte innehåller ämnen och/eller blandningar som uppfyller kriterierna i direktiv (EG) nr 1272/2008 (CLP), eller förekommer i koncentrationer högre än det värde som fastställts för deklaration enligt nämnda direktiv.
- Se användarhandboken för BD MAX™ System för ytterligare varningar, försiktighetsåtgärder och procedurer.

## 8. Testprocedur

### 8.1. Insamling, förvaring och transport av prover

VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har testats på luftvägsprover (nasofaryngeala svabbar och aspirat). Andra typer av prover måste valideras av användaren.

Insamling, förvaring och transport av prover ska utföras enligt de villkor som validerats av användaren. I allmänhet ska luftvägsprover samlas in och märkas på lämpligt sätt i rena behållare med eller utan transportmedia (beroende på provtyp) och bearbetas så snart som möjligt för att garantera testets kvalitet. Nasofaryngeala aspirat ska transporteras vid 2 till 8 °C i upp till 72 timmar enligt lokala och nationella bestämmelser för transport av patogent material. För långvarig transport (mer än 72 timmar) rekommenderar vi transport vid -20 °C eller lägre. Dock ska nasofaryngeala svabbar i universellt transportmedium (UTM) transporteras frysta vid -20 °C eller lägre. Användning av färska prover rekommenderas för testet. Proverna kan förvaras vid 2 till 8 °C i upp till 72 timmar (nasofaryngeala aspirat) eller frysta vid -20 °C eller helst vid -70 °C (i UTM) för bevarande. Upprepade nedfrysningar och upptiningar bör undvikas för att förhindra nedbrytning av provet och nukleinsyror.

Luftvägsproverna måste samlas in, transporteras och förvaras enligt lämpliga laboratorieriktlinjer. För mer information, se CDC-riktlinjen (CDC's Infectious diseases laboratory test directory (2022). Webbplats <https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/cdc-lab-tests.pdf>) och IDSA-riktlinjen (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: uppdaterad 2018 av Infectious Diseases Society of America och American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

Om sputumprover används kan de testas enligt rekommendationer angivna nedan.

### 8.2. Provberedning och DNA-extraktion

Utför provberedning enligt rekommendationerna i bruksanvisningen för extraktionssatsen som används, BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipettera 200 µl av prov i ett BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube och stäng röret med ett membranlock. Säkerställ fullständig blandning genom att vortexa provet vid hög hastighet i 1 minut. Fortsätt till drift av BD MAX™ System.

Observera att tillämpningsspecifika procedurer för extraktionsförberedelse ska utvecklas och valideras av användaren och att vissa andra prover kan kräva förbearbetning. För sputumprover till exempel, ska du tillsätta acetylcystein (rekommenderat N-acetyl-L-cystein Ref. A7250, Merck KGaA) till provet vid en förhållande på 1:1 (d.v.s. 250 µl , sputum och 250 µl acetylcystein 100 mg/ml), blanda genom att vortexa och värm till 95 °C i 10 minuter. Pipettera 200 µl förberett sputumprov i ett BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube och stäng röret med ett membranlock. Säkerställ fullständig blandning genom att vortexa provet vid hög hastighet i 1 minut. Fortsätt till drift av BD MAX™ System.

### 8.3. PCR-protokoll

Obs! Se användarhandboken för BD MAX™ System för detaljerade anvisningar.

#### 8.3.1. Skapa PCR-testprogram för VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Obs! Om du redan har skapat testet VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System kan du hoppa över steg 8.3.1 och gå direkt till 8.3.2.

- 1) Välj fliken "Test Editor" (Testredigerare) på skärmen "Run" (Kör) på BD MAX™ System.
- 2) Klicka på knappen "Create" (Skapa).
- 3) Döp testet, dvs. VIASURE *Bordetella*, i fönstret "Test Name" (Testnamn) på fliken för grundläggande information.
- 4) Välj "ExK TNA-3" i listrutan "Extraction Type" (Extraktionstyp).
- 5) Välj "Type 5" (Typ 5) i listrutan "Master Mix Format" (Masterblandningsform).
  - a. Obs! Produkten kan användas i kombination med ett ytterligare VIASURE for BD MAX™-test och välj då "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med Rehydration Buffer (typ 5)).
- 6) Välj "User defined" (Användardefinierad) i "Sample extraction parameters" (Provextraktionsparametrar) och justera provvolymen till 350 µl.
- 7) Välj "Call Ct at Threshold Crossing" (Hämta Ct vid tröskelvärdesgräns) i "Ct Calculation" (Ct-beräkning).
- 8) Välj följande konfiguration i "Custom Barcodes" (Anpassa streckkoder) om du kör programvaruversion 5.00 eller senare och använder streckkodade och folieförsedda rör som ska knäppas fast:
  - a. "Snap-In 2 Barcode" (Streckkod för rör 2): 1C (gällande reaktionsrör för concerning *Bordetella* reaction tube).
  - b. "Snap-In 3 Barcode" (Streckkod för rör 3): 11 (gällande Rehydration Buffer tube).
  - c. "Snap-In 4 Barcode" (Streckkod för rör 4): en annan VIASURE reaction tube (annan folie) om du väljer formen "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)"

(Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med Rehydration Buffer (typ 5)) (avsnitt 8.3.1).

9) Ange följande parametrar på fliken "PCR settings" (PCR-inställningar): "Channel Settings" (Kanalinställningar), "Gains" (Förstärkningar) och "Threshold" (Tröskelvärde) (tabell 3).

a. Obs! Produkten kan användas i kombination med ett ytterligare VIASURE for BD MAX™-test och PCR-inställningar och teststeg ska slutföras för positionerna för rör 2 (grön) och rör 4 (blå).

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Förstärkning)	Threshold (Tröskelvärde)	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-inställningar).

Obs! Det rekommenderas att ställa in de minimitröskelvärden som anges ovan för varje kanal som en startpunkt. De slutliga inställningarna måste dock fastställas av slutanvändaren under resultatolkningen. Detta för att säkerställa att tröskelvärdena faller inom fluorescenskurvornas exponentiella fas och över eventuell bakgrundssignal. Tröskelvärdet för olika instrument kan variera på grund av olika signalintensiteter.

10) Ange även följande parametrar "Spectral Cross Talk" (Spektral överhörning) på fliken "PCR settings" (PCR-inställningar) (tabell 4).

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

Tabell 13. Parametrar för "Spectral Cross Talk" (spektral överhörning).

11) Ange PCR-protokollet på fliken "Test Steps" (Teststeg) (tabell 5).

Step Name (Stegnamn)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Cykler)	Time (s) (Tid (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detektion)
Initial denaturation (Inledande denaturering)	Uppehåll	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturering och hybridisering/förlängning (datainsamling))	2-temperatur	45	10	95 °C	-
			41	63 °C	✓

Tabell 14. PCR-protokoll.

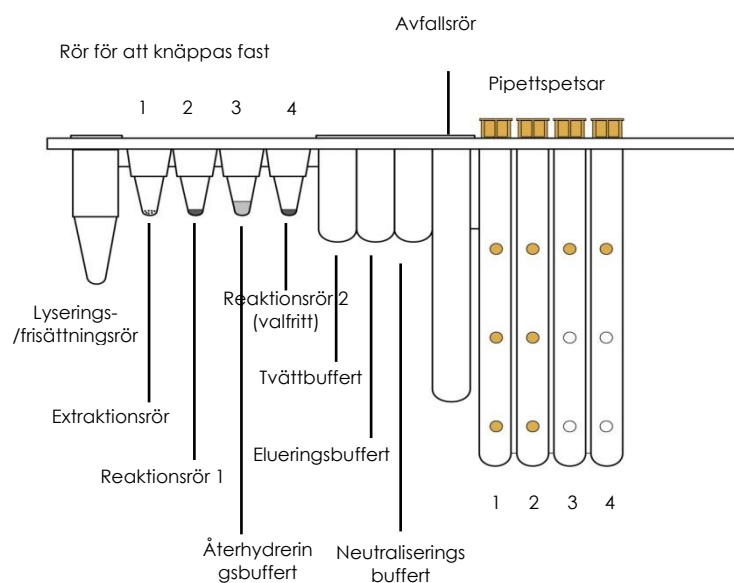
12) Klicka på knappen "Save Test" (Spara test).



### 8.3.2. Installation av BD MAX™-ställ

- 1) För varje prov som ska testas ska du ta ut en Unitized Reagent Strips från BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Knacka försiktigt varje remsa mot en hård yta för att säkerställa att alla vätskor finns på rörens botten och ladda den på provrörsstället för BD MAX™ System.
- 2) Ta ut nödvändigt antal BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (vit folie) från den skyddande påsen. Knäpp fast extraktionsrören (vit folie) på motsvarande positioner på TNA-remsan (rörposition 1, vit färgkodning på stället, Se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng påsen med blixtlåsförseglingen.
- 3) Bestäm och separera lämpligt antal *Bordetella* reaction tubes (1C-folie) och knäpp fast dem på motsvarande positioner på remsan (rörposition 2, grön färgkodning på stället. Se figur 1).
  - a. Avlägsna överskott av luft och stäng aluminiumpåsarna med blixtlåsförseglingen.
  - b. Utför en korrekt rehydrering genom att se till att den frystorkade produkten finns på rörets botten och att den inte klibbar fast på rörets övre del eller på folieförseglingen. Knacka försiktigt varje rör mot en hård yta för att se till att all produkt hamnar på botten av röret.
    - i. Obs! Om du väljer formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med återhydreringsbuffert (typ 5)) (avsnitt 8.3.1) ska du bestämma och separera lämpligt antal ytterligare VIASURE reaction tubes (annan folie) och knäppa fast dem på motsvarande positioner på remsan (rörposition 4, blå färgkodning på stället. Se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng aluminiumpåsarna med blixtlåsförseglingen.
- 4) Ta ut lämpligt antal Rehydration Buffer tube (11-folie) och knäpp fast rören på motsvarande positioner på remsan (rörposition 3, färglös kodning på stället, Se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng påsen med blixtlåsförseglingen.
  - a. Utför en korrekt överföring genom att se till att vätskan finns på rörets botten och att den inte klibbar fast på rörets övre del eller på folieförseglingen. Knacka försiktigt varje rör mot en hård yta för att se till att all buffert hamnar på botten av röret.

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



### 8.3.3. Inställning av BD MAX™-instrument

- 1) Välj fliken "Work List" (Arbetslista) på skärmen "Run" (Kör) i programvara v4.50A eller senare för BD MAX™ System.
- 2) I listrutan "Test" (Test) väljer du VIASURE *Bordetella* (se avsnitt 8.3.1 om det inte redan har skapats).
- 3) Välj lämpligt satslotnummer (finns angivet på den använda extraktionssatsens ytterlåda) från listrutan (valfritt).
- 4) Ange Sample Buffer Tube-identifikationsnumret i fönstret för provrör i arbetslistan, antingen genom att läsa av streckkoden med en streckkodsläsare eller genom manuell inmatning.
- 5) Fyll i fönstret för prov-/patient-ID och/eller accession i arbetslistan och klicka på knappen "Save" (Spara). Fortsätt tills alla Sample Buffer Tubes har angivits. Säkerställ att prov-/patient-ID och Sample Buffer Tubes nogga överensstämmer.
- 6) Placera det förberedda Sample Buffer Tube i BD MAX™ Rack(s).
- 7) Ladda stället/ställen i BD MAX™ System (ställ A är positionerat på den vänstra sidan av BD MAX™ System och ställ B på dess högra sida).
- 8) Placera lämpligt antal BD MAX™ PCR Cartridge i BD MAX™ System.
- 9) Stäng luckan på BD MAX™ System.
- 10) Klicka på "Start Run" (Starta körning) för att påbörja proceduren.

### 8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) Klicka på knappen "Results" (Resultat) i huvudmenyn.
- 2) Dubbelklicka antingen på din körning i listan eller tryck på "visningsknappen".
- 3) Klicka på "Print" (Skriv ut) och välj: "Run Details, Test Details and Plot..." (Körningsinformation, testinformation och kurva ...).
- 4) Klicka på knappen "Print or Export" (Skriv ut eller exportera) på skärmen "Run Reports" (Körningsrapport).

## 9. Resultattolkning

Se användarhandboken för BD MAX™ System för en detaljerad beskrivning av dataanalys.

Dataanalys utförs av programvaran BD MAX™ enligt tillverkarens anvisningar. BD MAX™-programvaran rapporterar Ct-värden och amplifieringskurvor för varje detektorkanal för varje testat prov på följande sätt:

- Ct-värde på 0 anger att det inte fanns något Ct-värde beräknat av programvaran med det specificerade tröskelvärde (se tabell 3). Amplifieringskurvan för provet med ett Ct-värde på 0 måste kontrolleras manuellt.
- Ct-värde på -1 anger att ingen amplifieringsprocess har inträffat.
- Ett annat Ct-värde ska tolkas i korrelation med amplifieringskurvan och enligt riktlinjerna för provtolkning som finns i tabell 6.

Kontrollera signalen för den interna kontrollen för att bekräfta korrekt funktion av amplifieringsblandningen. Kontrollera dessutom att det inte föreligger någon rapport om fel på BD MAX™ System.

Resultat bör avläsas och analyseras med hjälp av följande tabell:

<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
+	+	+	+/- <sup>1</sup>	<i>B. pertussis</i> och/eller <i>B. holmesii</i> och <i>B. parapertussis</i> DNA detekterad <sup>1</sup>
-	-	-	+ <sup>2</sup>	<i>B. pertussis</i> , <i>B. holmesii</i> och <i>B. parapertussis</i> DNA inte detekterad <sup>2</sup>
+	-	-	+/- <sup>1</sup>	<i>B. pertussis</i> DNA detekterad, <i>B. holmesii</i> och <i>B. parapertussis</i> DNA inte detekterad <sup>1</sup>
+	+	-	+/- <sup>1</sup>	<i>B. pertussis</i> och/eller <i>B. holmesii</i> DNA detekterad, <i>B. parapertussis</i> DNA inte detekterad <sup>1</sup>
+	-	+	+/- <sup>1</sup>	<i>B. pertussis</i> och <i>B. parapertussis</i> DNA detekterad, <i>B. holmesii</i> DNA inte detekterad <sup>1</sup>
-	+ <sup>3</sup>	-	+/- <sup>1</sup>	<i>B. holmesii</i> DNA detekterad, <i>B. pertussis</i> och <i>B. parapertussis</i> DNA inte detekterad <sup>1</sup>
-	+ <sup>3</sup>	+	+/- <sup>1</sup>	<i>B. holmesii</i> och <i>B. parapertussis</i> DNA detekterad, <i>B. pertussis</i> DNA inte detekterad <sup>1</sup>
-	-	+	+/- <sup>1</sup>	<i>B. parapertussis</i> DNA detekterad, <i>B. pertussis</i> och <i>B. holmesii</i> DNA inte detekterad <sup>1</sup>
-	-	-	- <sup>2</sup>	Olösta resultat (UNR) erhålls när det förekommer inhibitorer i PCR-reaktionen eller när ett allmänt problem (som inte rapporterats av en felkod) inträffar under bearbetningen av provet och/eller ampliferingen. <sup>2</sup>
IND	IND	IND	IND	Obestämt analysresultat (IND). Beror på fel på BD MAX™ System. Analysresultat som visas vid instrumentfel som är kopplade till en felkod.
INC	INC	INC	INC	Ofullständigt analysresultat (INC). Beror på fel på BD MAX™ System. Analysresultat som visas om körningen inte kan slutföras.

Tabell 15. Provtolkning.

+: Amplifiering inträffade.

-: Ingen amplifiering inträffade.

**1** Ett prov anses vara positivt om Ct-värdet som erhålls är lägre än 40. Den interna kontrollen (IC) kan eller kan inte uppvisa en amplifieringssignal. Ibland är IC-detektion inte nödvändig eftersom ett stort antal kopior av målskvensen kan orsaka föredragen amplifiering av målspecifika nukleinsyror.

**2** Ett prov anses vara negativt om provet inte visar någon amplifieringssignal i detektionssystemet men den interna kontrollen är positiv (Ct-värde ≤ 35). En inhibering av PCR-reaktionen kan uteslutas genom amplifieringen av den interna kontrollen. I fall av olösta resultat (UNR), frånvaro av signal för den interna kontrollen i negativa prover, rekommenderas att analysen upprepas genom att följa nedanstående indikationer.

**3** *B. holmesii* DNA detekteras i två olika kanaler, 475/520 (FAM) och 585/630 (ROX) men på grund av den högre känsligheten hos 585/630 (ROX) i positiva prover omkring LoD kan signalen endast erhållas i den kanalen.

Om ett tvetydigt resultat visas kontinuerligt rekommenderas att konsultera bruksanvisningen, granska den använda extraktionsprocessen, verifiera korrekt prestanda för varje PCR-steg och granska parametrarna samt att kontrollera den sigmoida formen på kurvan och fluorescensintensiteten.

Obs! Tillräcklig volym finns tillgänglig för ett upprepat test från Sample Buffer Tube. Upprepad testning måste utföras inom 24 timmar för beredda BD MAX™ Sample Buffer Tube som förvaras vid 2–8 °C eller 25 °C.

Resultat av testet bör utvärderas av sjukvårdspersonal med beaktande av medicinsk anamnes, kliniska symtom och andra diagnostiska tester.

## 10. Testets begränsningar

- Resultat av testet bör utvärderas av sjukvårdspersonal med beaktande av medicinsk anamnes, kliniska symtom och andra diagnostiska tester.
- Även om denna analys kan användas med andra typer av prover har den validerats med nasofaryngeala svabbar och nasofaryngeala aspirat. Om sputumprover används kan de testas enligt rekommendationer som anges ovan.
- Den frystorkade produkten ska finnas i botten av röret för god testprestanda och inte häfta fast vid rörets överdel eller folieförseglingen. Knacka försiktigt varje rör mot en hård yta för att se till att all produkt hamnar på botten av röret.
- Testets funktion påverkas inte om reaktionsblandningen i stabiliserad form, vanligtvis i botten av röret, inte ser ut som vanligt (utan konisk form, icke-homogen, mindre/större i storlek och/eller annan färg än vit).
- Kvaliteten på testet beror på provets kvalitet. Extraktion av nukleinsyra måste ske på lämpligt sätt från kliniska prov.
- Detta test är kvalitativt och ger inga kvantitativa värden och anger inte antalet förekommande organismer.
- Extremt låga nivåer av mål under detektionsgränsen kan detekteras, men resultaten är kanske inte reproducerbara.
- Det finns en risk för falskt positiva resultat på grund av korskontamination av prover som misstänks innehålla *Bordetella* med höga koncentrationer av mål-DNA eller kontamination på grund av PCR-produkter från tidigare reaktioner.
- Den specifika kombinationen av primer/prob för detektion av IS481, hIS1001 och pIS1001-sekvenser som används i VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System uppvisar inte signifikanta kombinerade homologier med humangenom, humanmikroflora eller andra luftvägsmikroorganismer, vilket kan resultera i förutsägbart falskt positivt resultat.
- Falskt negativa resultat kan inträffa på grund av flera faktorer och kombinationer av dessa, inklusive:
  - Olämplig insamling, transport, förvaring och/eller hantering av prover.
  - Olämpliga processförfaranden (inklusive DNA-extraktion).
  - Nedbrytning av DNA under provtransport/-förvaring och/eller bearbetning.
  - Mutationer eller polymorfismer i primer- eller probbindande regioner kan påverka detektion av nya eller okända stammar av *Bordetella*.
  - Organismnivåer i provet under analysens detektionsgräns.
  - Förekomsten av qPCR-inhibitorer eller andra typer av störande ämnen.
  - Underlåtelse att följa bruksanvisningar och analysförfarandet.
- Ett positivt testresultat anger inte nödvändigtvis förekomsten av livskraftiga bakterier och antyder inte att dessa bakterier är smittsamma eller orsakar kliniska symtom. Ett positivt resultat anger dock förekomsten av *Bordetella*-målsekvenser.
- Om diagnostiska tester för andra luftvägssjukdomar är negativa och patientens kliniska presentation och epidemiologisk information antyder att infektion av *B. pertussis*, *B. parapertussis* och/eller *B. holmesii* är möjlig, ska förekomsten av ett falskt negativt resultat övervägas och en omtestning av patienten bör diskuteras.
- Ett negativt resultat utesluter inte förekomsten av *B. pertussis*, *B. parapertussis* och/eller *B. holmesii* DNA i ett kliniskt prov. Om kliniska observationer, patientens anamnes och epidemiologisk information antyder att infektion av *B. parapertussis* och/eller *B. holmesii* föreligger bör omtestning övervägas med ökad provvolym.

- Om resultaten blir olösta, obestämda eller ofullständiga med användning av VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System krävs omtestning. Olösta prover kan orsakas av förekomsten av inhibitorer i provet eller en inkorrekt återhydrering av röret med frystorkad reaktionsblandning. Om det föreligger ett instrumentfel kommer obestämda eller ofullständiga resultat att erhållas.

## 11. Kvalitetskontroll

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System innehåller en intern kontroll (IC) i varje reaktionsrör som bekräftar korrekt prestanda för tekniken.

## 12. Prestandaegenskaper

### 12.1. Klinisk sensitivitet och specificitet

Den kliniska prestandan hos VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har testats med kliniska och spetsade nasofaryngeala svabbar och nasofaryngeala aspirat, redan identifierade som positiva eller negativa för *B. pertussis*, *B. parapertussis* och/eller *B. holmesii*. Resultaten var enligt följande:

	Plats	Provtyp	Arbetsflöde	Mål
1	CerTest Biotec (Zaragoza, Spanien)	Nasofaryngeala svabbar (Cerba Xpert)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>B. pertussis</i>
2		Nasofaryngeala aspirat (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
3		Nasofaryngeala svabbar och aspirat (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
4		Nasofaryngeala svabbar (Eurofins)		<i>B. pertussis</i>
5		Nasofaryngeala svabbar (Cerba Xpert + Eurofins + simulerade prov)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>

Tabell 16. Plats, provtyp, arbetsflöde och mål.

Sanna positiva och negativa värden, falska positiva och negativa värden, sensitivitet och specificitet för VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System beräknades i relation till respektive jämförelseanalys, i enlighet med följande tabell:

Plats	Jämförelseanalys	Mål	TP	TN	FP	FN	Sensitivitet	Specificitet
1	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	33	100	0	1	0,971 (0,84-0,99)	1 (0,96-1)
2	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	43	34	1	0	1 (0,91-1)	0,971 (0,85-0,99)
		<i>B. parapertussis</i>	28	48	0	2	0,933 (0,77-0,99)	1 (0,92-1)
	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	76	0	1	0,5 (0,01-0,98)	1 (0,95-1)
3	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	76	134	1	1	0,987 (0,93-1)	0,993 (0,95-1)
		<i>B. parapertussis</i>	28	182	0	2	0,933 (0,77-0,99)	1 (0,98-1)
		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	Internt validerad analys för <i>pertussis/parapertussis</i>	<i>B. pertussis</i>	43	54	0	3	0,935 (0,821-0,986)	1 (0,966-1)
5	Inledande identifiering*	<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. Sanna positiva (TP) och negativa (TN) värden, falskt positiva (FP) och negativa (FN) värden, sensitivitet, specificitet för VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

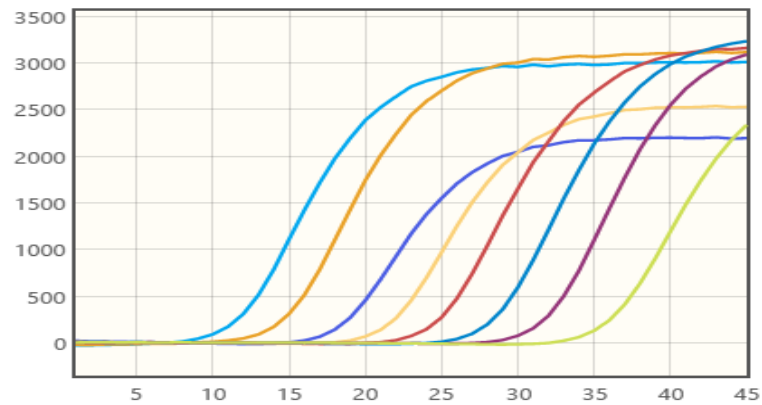
\* Inledande identifiering omfattar SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) och internt validerad analys för pertussis/parapertussis för detektion av *B. pertussis* och *B. parapertussis* och SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm) för detektion av *B. holmesii* i Cerba Xpert-prover.

Resultaten visar en hög överensstämmelse för att detektera *B. pertussis*, *B. parapertussis* och/eller *B. holmesii* med användning av VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

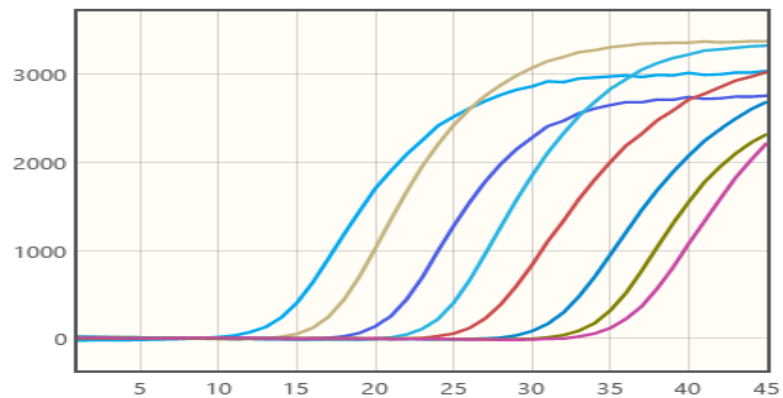
## 12.2. Analytisk sensitivitet

VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en hög detektionsgräns (LoD) på 1,2 CFU/mL prov för *B. pertussis*,  $4 \times 10^{-2}$  CFU/mL prov för *B. holmesii* och 12 CFU/mL prov för *B. parapertussis*, med en positiv frekvens på  $\geq 95\%$ , för nasofaryngeala svabbprover.

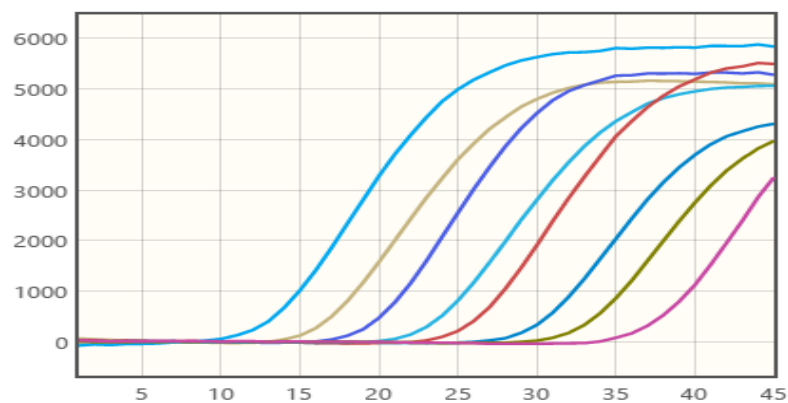
Figur 5. Spädningsserier för en mallkörning av *Bordetella pertussis* ( $7,07 \times 10^4$ – $7,07 \times 10^{-3}$  CFU per reaktion) på BD MAX™ System (475/520 (FAM)-kanal).



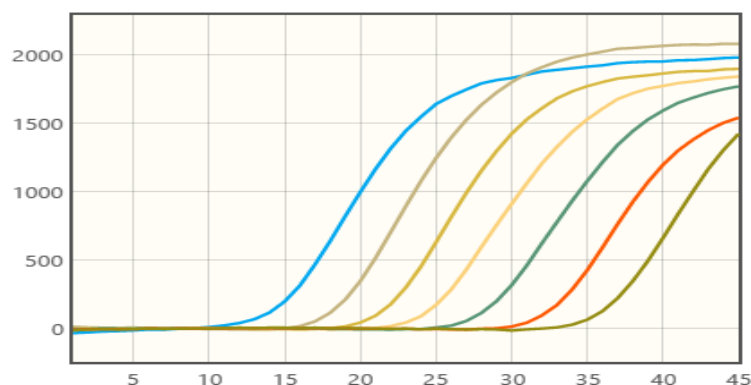
Figur 6. Spädningsserier för en mallkörning av *Bordetella holmesii* ( $2,42 \times 10^3$ – $2,42 \times 10^{-4}$  CFU per reaktion) på BD MAX™ System (475/520 (FAM)-kanal).



Figur 7. Spädningsserier för en mallkörning av *Bordetella holmesii* ( $2,42 \times 10^3$ – $2,42 \times 10^{-4}$  CFU per reaktion) på BD MAX™ System (585/630 (ROX)-kanal).



Figur 8. Spädningsserier för en mallkörning av *Bordetella parapertussis* ( $7.07 \times 10^4$ – $7.07 \times 10^{-2}$  CFU per reaktion) på BD MAX™ System (630/665 (Cy5)-kanal).



### 12.3. Analytisk specificitet

*Bordetella*-analysens specificitet bekräftades genom att testa en panel av olika mikroorganismer associerade med de vanligaste luftvägssjukdomarna. Ingen korsreaktivitet detekterades mellan någon av de mikroorganismer som testades:

Test av korsreaktivitet			
Typer av humant adenovirus 1–5, 8, 15, 31, 40 och 41	-	Influensavirus A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	- <i>Legionella micdadei</i> -
Bocavirus	-	Influensavirus A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	- <i>Legionella pneumophila</i> serogrupp 1 -
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 virus	- MERS coronavirus -
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influensavirus A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	- Humant metapneumovirus A och B -
<i>Chlamydia psittaci</i> genotyp A och C	-	Influensavirus A/Turkey/Germany/R2485+86/2014 (H5N8)	- <i>Moraxella catarrhalis</i> -
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> stam CM-1	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2)-virus (klad 3C2a.1)	- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -
Humant coronavirus 229E, OC43 och NL63	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)-virus	- Humant parainfluensavirus 1, 2, 3 och 4 -
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influensavirus B/Brisbane/60/2008	- <i>Pneumocystis jirovecii</i> typ A1 och g885652 -
Influensavirus A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Influensavirus B/Florida/04/06	- Respiratoriskt syncytialvirus (RSV) typerna A och B -
Influensavirus A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Influensavirus B/Phuket/3073/2013	- Humant rhinovirus -
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella bozemanii</i> serovar 1	- <i>Staphylococcus aureus</i> ssp. aureus -
Influensavirus A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	<i>Legionella dumoffii</i>	- <i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022 -
Influensavirus A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-

Tabell 18. Patogena referensmikroorganismer som använts i denna studie.

### 12.4. Analytisk reaktivitet











Reaktiviteten för VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System utvärderades mot DNA extraherad från *B. pertussis*, *B. parapertussis*, och *B. holmesii* som mallar och uppvisade positiva resultat.



## Bibliography/ Bibliografi

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

## Symbols for IVD components and reagents/ Symboler för IVD-komponenter och reagenser

 In vitro diagnostic device In vitro-diagnostik	 Keep dry Håll torrt	 Use by Utgångsdatum	 Manufacturer Tillverkare	 Batch code Partnummer
 Consult instructions for use Se bruksanvisningen	 Temperature limitation Temperaturgräns	 Contains sufficient for <n> test Innehåller tillräckligt för <n> tester	 Unique Device Identification Unik enhetsidentifiering	 Catalogue number Katalognummer

## Trademarks

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

<b>Change Control / Ändringskontroll</b>		
<b>Version No. / Versionsnr</b>	<b>Changes / Ändringar</b>	<b>Date / Datum</b>
00	Original version / Originalversion.	29/06/2022

Table A 2. Control change table/ Kontrolländringstabell.

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