

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Bordetella
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Bu kullanım talimatları aşağıdaki referans için geçerlidir:

PRODUCT / ÜRÜN	REFERENCE / REFERANS
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. / BD MAX™ System ile kullanılacak ürün için referans.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Kullanım talimatları (IFU) kite İngilizce/İspanyolca olarak dahil edilmiştir.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Contact viasure@certest.es if your language is not on the list / Diliniz listede yoksa viasure@certest.es ile iletişime geçin.

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.

Not: Kullanıcı, ürünle ilgili herhangi bir ciddi olayı üreticiye ve kullanıcı ve/veya hasta olarak ikamet ettiği Üye Devletin yetkili makamına bildirmelidir.

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

İçerik

1.	Kullanım amacı.....	19
2.	Özet ve Açıklama.....	19
3.	Prosedür ilkesi.....	19
4.	Verilen reaktifler	20
5.	Kullanıcı tarafından tedarik edilecek olan reaktifler ve ekipman	20
6.	Taşıma ve depolama koşulları	21
7.	Kullanıcılara uyarılar	21
8.	Test prosedürü.....	22
8.1.	Numunelerin toplanması, saklanması ve taşınması	22
8.2.	Numunelerin hazırlanması ve DNA ekstraksiyonu	22
8.3.	PCR protokolü.....	23

9.	Sonuçların yorumlanması	26
10.	Testin kısıtlamaları	28
11.	Kalite kontrol	29
12.	Performans özellikleri	29
12.1.	Klinik duyarlılık ve özgüllük	29
12.2.	Analitik hassasiyet.....	30
12.3.	Analitik özgüllük	32
12.4.	Analitik reaktivite	32
	Bibliography/ Bibliyografi.....	33
	Symbols for IVD components and reagents/ IVD bileşenlerinin ve reaktiflerin sembolleri	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.

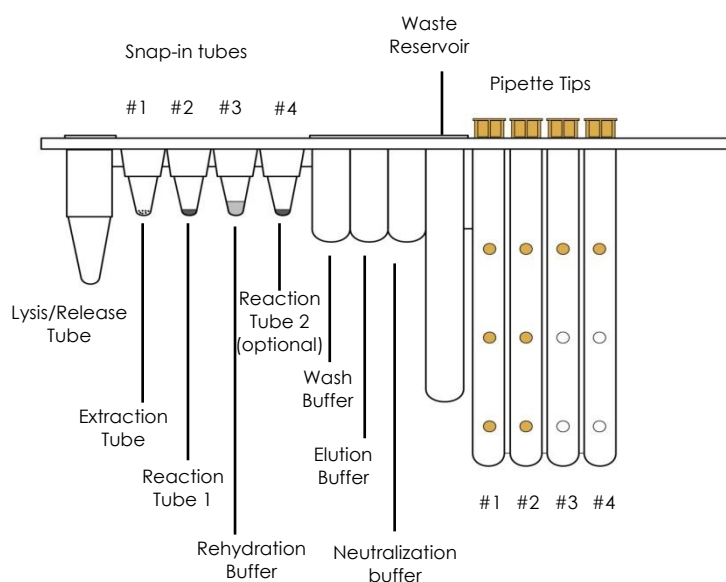
- 12) Click the "Save Test" button.

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
+	+	+	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> and/or <i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Detected ¹
-	-	-	+ ²	<i>B. pertussis</i> , <i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Not Detected ²
+	-	-	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> DNA Detected, <i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Not Detected ¹
+	+	-	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> and/or <i>B. holmesii</i> DNA Detected, <i>B. parapertussis</i> DNA Not Detected ¹
+	-	+	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Detected, <i>B. holmesii</i> DNA Not Detected ¹
-	+ ³	-	+/- ¹	<i>B. holmesii</i> DNA Detected, <i>B. pertussis</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Not Detected ¹
-	+ ³	+	+/- ¹	<i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> DNA Detected, <i>B. pertussis</i> DNA Not Detected ¹
-	-	+	+/- ¹	<i>B. parapertussis</i> DNA Detected, <i>B. pertussis</i> and <i>B. holmesii</i> DNA Not Detected ¹
-	-	-	- ²	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs. ²
IND	IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

1 A sample is considered positive if the Ct value obtained is ≤ 40 . The Internal Control (IC) may or may not show an amplification signal. Sometimes, the IC detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 A sample is considered negative if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive ($Ct \leq 35$). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control. In case of unresolved results (UNR), absence of internal control signal in negative sample it is recommended to repeat the assay following the indications below.

3 *B. holmesii* DNA is detected in two different channels, 475/520 (FAM) and 585/630 (ROX), but due to higher sensitivity of 585/630 (ROX) in positive samples around the LoD it is possible to obtain signal only in that channel.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user; to verify the correct performance of each PCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

NOTE: Sufficient volume is available for one repeat test from the Sample Buffer Tube. For prepared BD MAX™ Sample Buffer Tubes stored at 2–8 °C or 25°C, retesting must be performed within 24 hours.

The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated with nasopharyngeal swabs and nasopharyngeal aspirates. If sputum samples are used, they can be tested with the recommendations cited above.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; nucleic acid must be properly extracted from clinical samples.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Bordetella* suspicious samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for detection of the IS481, hIS1001 and pIS1001 sequences, used in VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, or other respiratory microorganisms, which might result in predictable false positive.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Degradation of the DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown *Bordetella* strains.
 - Organism levels in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable bacteria and does not imply that these bacteria are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of *Bordetella* targets sequences.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that infection by *B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii* is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- A negative result does not preclude the presence of *B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii* DNA in a clinical specimen. If clinical observations, patient history and epidemiological information suggest *B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii* infection, re-testing increasing sample volume should be considered.

- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

11. Quality control

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains an Internal Control (IC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using clinical and spiked nasopharyngeal swabs, and nasopharyngeal aspirates, already characterized as positive or negative for *B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii*. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	CerTest Biotec (Zaragoza, Spain)	Nasopharyngeal swabs (Cerba Xpert)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>B. pertussis</i>
2		Nasopharyngeal aspirates (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
3		Nasopharyngeal swabs and aspirates (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
4		Nasopharyngeal swabs (Eurofins)		<i>B. pertussis</i>
5		Nasopharyngeal swabs (Cerba Xpert + Eurofins + simulated samples)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>

Table 7. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, and specificity for VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
1	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	33	100	0	1	0.971 (0.84 – 0.99)	1 (0.96 – 1)
2	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	43	34	1	0	1 (0.91 – 1)	0.971 (0.85 – 0.99)
		<i>B. parapertussis</i>	28	48	0	2	0.933 (0.77-0.99)	1 (0.92-1)
	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	76	0	1	0.5 (0.01-0.98)	1 (0.95-1)
3	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	76	134	1	1	0.987 (0.93-1)	0.993 (0.95-1)
		<i>B. parapertussis</i>	28	182	0	2	0.933 (0.77-0.99)	1 (0.98-1)
		<i>B. holmesii</i>	1	210	0	1	0.5 (0.01-0.987)	1 (0.98-1)
4	Validated in-house mix pertussis/parapertussis assay	<i>B. pertussis</i>	43	54	0	3	0.935 (0.821-0.986)	1 (0.966-1)
5	Initial characterization*	<i>B. pertussis</i>	98	186	0	4	0.961 (0.903-0.989)	1 (0.980-1)
		<i>B. parapertussis</i>	12	276	0	0	1 (0.735-1)	1 (0.987-1)
		<i>B. holmesii</i>	20	268	0	0	1 (0.832-1)	1 (0.986-1)

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

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

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

12.2. Analytical sensitivity

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

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

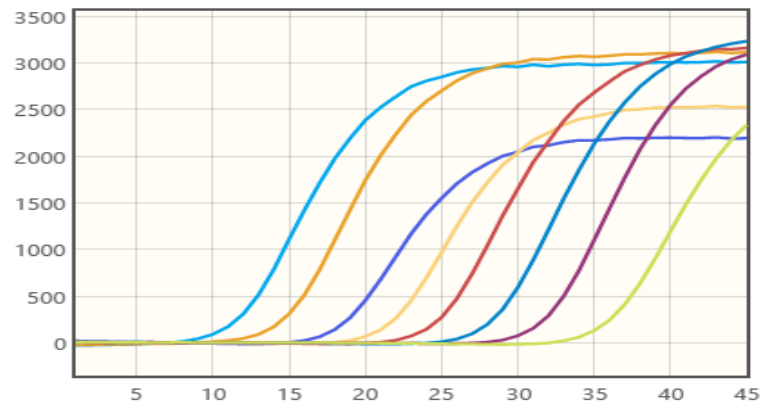


Figure 2. Dilution series of *Bordetella holmesii* (2.42×10^3 - 2.42×10^{-4} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

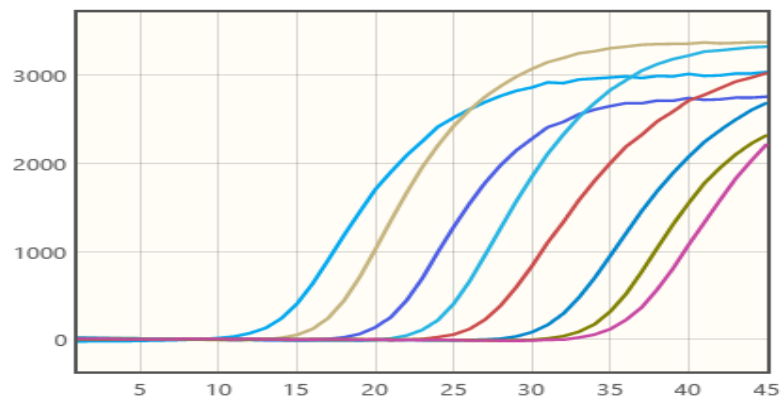


Figure 3. Dilution series of *Bordetella holmesii* (2.42×10^3 - 2.42×10^{-4} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

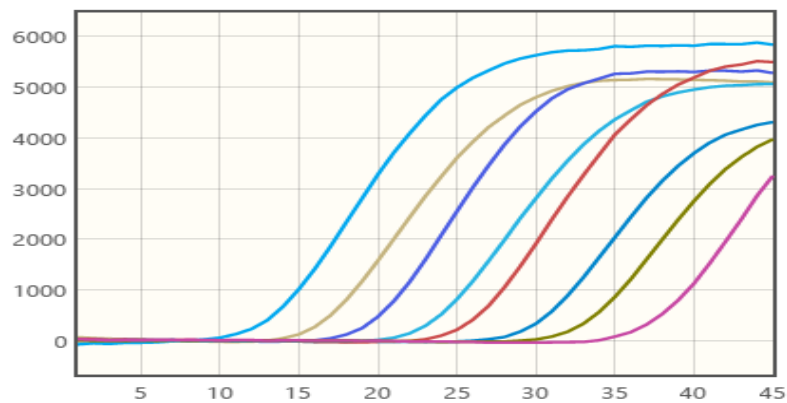
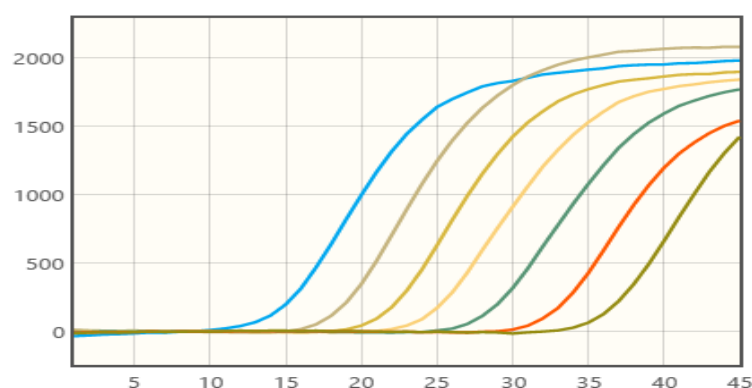


Figure 4. Dilution series of *Bordetella parapertussis* (7.07×10^4 - 7.07×10^{-2} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.3. Analytical specificity

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

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

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

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

TÜRKÇE

1. Kullanım amacı

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, sağlık uzmanları (HCP) tarafından solunum yolu enfeksiyonundan şüphelenilen hastalardan alınan solunum örneklerinde (nazofaringeal swablar ve nazofaringeal aspiratlar) *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* ve/veya *Bordetella holmesii*'den DNA'nın kalitatif tespiti ve ayırt edilmesi için tasarlanmış otomatik bir gerçek zamanlı PCR testidir. Bu testin, hastanın klinik belirti ve semptomları ve epidemiyolojik risk faktörleri ile birlikte *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* ve/veya *Bordetella pertussis*'in tanımlanmasında yardımcı olarak kullanılması amaçlanmıştır. Analizde, BD MAX™ System'i, otomatik olarak DNA'nın ekstraksiyonu için kullanır ve ardından BD MAX™ System için evrensel reaktifler ve atılabilir maddeler ile birlikte sağlanan reaktiflerin kullanıldığı gerçek zamanlı PCR kullanılır. Solunum örneklerinden DNA ekstrakte edilir, real-time PCR kullanılarak amplifiye edilir ve *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* ve *Bordetella holmesii*'ye özgü floresan raportör boya problemleri kullanılarak tespit edilir.

2. Özet ve Açıklama

Bordetella cinsi, 4'ünün insanları enfekte ettiği bilinen 8 türden oluşur: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*, ve *B. bronchiseptica*. Boğmacanın (boğmaca) en önemli nedeni *B. pertussis* enfeksiyonu olup, bunu *B. parapertussis* izler. *B. holmesii*, altta yatan ciddi bir hastalığı olan hastalardan izole edilirken, *B. bronchiseptica* genellikle hayvanlarla sınırlıdır, ancak bazen bağışıklığı baskılanmış hastalardan da izole edilmiştir.

Boğmaca, genellikle öksürme veya hapsirme yoluyla veya enfekte bir kişiyle ortak bir solunum alanında yakın temas yoluyla kişiden kişiye yayılan çok bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalığın klinik seyri, aşağıdaki klinik özellikleri içeren üç aşamaya ayrılır: nezle (koriza, düşük dereceli ateş, hafif ve ara sıra öksürük), paroksizmal (çok sayıda ve hızlı öksürük nöbetleri, siyanoz, kusma ve bitkinlik) ve nekahat dönemi (kademeli iyileşme ve daha az kalıcı paroksizmal öksürükler).

Aşıya rağmen boğmaca dünyanın çoğu bölgesinde endemiktir. Özellikle boğmacanın yaşamı tehdit eden bir hastalık olarak ortaya çıkabileceği aşılınmamış bebekler olmak üzere, gerektiğinde temaslıların profilaksisini ve uygun tedaviyi başlatmak için güvenilir tanı gereklidir. PCR ve daha yakın zamanda gerçek zamanlı PCR dahil olmak üzere nükleik asit amplifikasyon testleri, *Bordetella* enfeksiyonlarının teşhisi için kültür ve serolojik yöntemlerin bazı sınırlamalarının üstesinden gelir. PCR testlerinin çoğu, genom başına çoklu kopyalarda bulunan yerleşime dizilerinin (IS) saptanmasına dayanır ve PCR testlerinin duyarlılığını artırır.

3. Prosedür ilkesi

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, solunum örneklerinde *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* ve/veya *Bordetella holmesii*'den DNA'nın kalitatif tespiti ve ayırt edilmesi için tasarlanmıştır. DNA'nın izolasyonundan sonra, bu *Bordetella* suşlarının tanımlanması, spesifik primerler ve floresan etiketli bir prob kullanılarak *Bordetella pertussis*/holmesii için IS481, *Bordetella parapertussis* için pIS1001 ve *Bordetella holmesii* için hIS1001 yerleşime dizilerinin korunan bir bölgesinin amplifikasyonu ile gerçekleştirilir.

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, DNA polimerazın 5' eksonükleaz aktivitesine dayanır. DNA amplifikasyonu sırasında, bu enzim tamamlayıcı DNA sekansına bağlı probu ayırarak; söndürücü boyanın raportörden ayırt edilmesini sağlar. Bu reaksiyon, hedef şablonun miktarıyla orantılı olan floresan sinyalinde bir artış meydana getirir. Bu floresans BD MAX™ System'de ölçülür.

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, her tüpte, stabilize edilmiş bir formatta gerçek zamanlı PCR testi için gerekli tüm bileşenleri (spesifik primer/problar, dNTPS, tampon, polimeraz) ve ayrıca ekstraksiyon işlemini ve/veya polimeraz aktivitesinin inhibisyonunu izlemek için bir dahili kontrol içerir.

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

Tablo 10. Hedef, kanal ve genler.

4. Verilen reaktifler

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, Tablo 2'de ayrıntılı olarak verilen aşağıdaki maddeleri ve reaktifleri içerir:

Reaktif/Materyal	Açıklama	Barkod	Miktar
<i>Bordetella</i> reaction tube	Enzimler, primer probları, tampon, dNTP'ler, stabilizatörler ve stabilize edilmiş formatta dahili kontrol içeren bir karışım	1C folyo	12 şeffaf tüp içeren 2 poşet
Rehydration Buffer tube	Stabilize edilmiş ürünü sulandırmak için solüsyon	11 folyo	24 şeffaf tüp içeren 1 poşet

Tablo 11. VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System & Kat. N°: VS-BDT124 (444204) içinde sağlanan reaktif ve materyaller.

5. Kullanıcı tarafından tedarik edilecek olan reaktifler ve ekipman

Aşağıdaki liste, kullanım için gerekli olan ancak VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System içinde bulunmayan materyalleri ve ekipmanları içerir.

- Gerçek Zamanlı PCR cihazı: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 veya 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vorteks.
- Mikropipetler (2 ile 1000 µL arasında hatasız).
- Nükleaz içermeyen su.
- Filtre uçları.
- Pudrasız tek kullanımlık eldivenler.

6. Taşıma ve depolama koşulları

- Kitler, etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar 2-40 °C'de sevk edilip saklanabilir.
- Reaksiyon tüplerini içeren alüminyum poşetler, açıldıktan sonra ürün 28 güne kadar kullanılabilir.

7. Kullanıcılara uyarılar

- Ürün yalnızca moleküler biyolojik teknikler konusunda eğitimli laboratuvar veya sağlık uzmanları ve teknisyenler gibi profesyonel kullanıcılar tarafından kullanılmak üzere tasarlanmıştır.
- *In vitro* tanısal kullanım içindir.
- Son kullanma tarihi geçmiş reaktifleri ve/veya materyalleri kullanmayın.
- Dış kutuyu mühürleyen etiket açılmışsa kiti kullanmayın.
- Koruyucu kutu ulaştığında açılmış veya kırılmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Koruyucu poşetler ulaştığında açık veya kırılmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Reaktif poşetler içinde kurutucu mevcut değilse veya parçalanmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Kurutucu maddeyi reaktif poşetlerinden çıkarmayın.
- Her kullanımdan sonra hemen reaktif koruyucu poşetlerin fermuarını kapatın. Kapatmadan önce poşetlerdeki fazla havayı giderin.
- Folyo kırılmış veya hasar görmüşse reaktifleri kullanmayın.
- Farklı poşetlerden ve/veya kitlerden ve/veya partilerden reaktifleri karıştırmayın.
- Reaktifleri nemden koruyun. Neme uzun süre maruz kalmak ürün performansını etkileyebilir.
- Bileşenleri ışıktan koruyun.
- Laboratuvarın genel alanında başka PCR testlerinin yapıldığı durumlarda, VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, bunun için gerekli herhangi bir reaktif ile Test veya BD MAX™ Sisteminin kontamine olmamasına dikkat edilmelidir. Reaktiflerin mikrobiyal ve ribonükleaz (RNaz)/deoksiribonükleaz (DNaz) kontaminasyonundan daima kaçının. Steril RNaz/DNaz içermeyen, tek kullanımlık, aerosole dirençli veya pozitif deplasmanlı pipet uçlarının kullanılması önerilir. Her numune için yeni uç kullanın. Reaktifler ve kartuşlar (BD MAX™ PCR Cartridge) kullanılmadan önce eldivenler değiştirilmelidir.
- Ortamın amplikonlarla kontaminasyonunu önlemek için, BD MAX™ PCR Cartridge kullandıktan sonra parçalamayın. BD MAX™ PCR Cartridge contaları kontaminasyonu önleyecek şekilde tasarlanmıştır.
- Tek yönlü bir iş akışı tasarlayın. Ekstraksiyon Alanında başlanmalı ve Amplifikasyon ve Tespit Alanında devam edilmelidir. Numuneleri, ekipmanı ve reaktifleri önceki adımın gerçekleştirildiği alana geri götürmeyin.
- İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyun. Koruyucu kıyafet giyin, tek kullanımlık eldivenler, gözlükler ve maske kullanın. Çalışma alanında bir şey yemeyin, içmeyin, sigara kullanmayın veya kozmetik ürünler uygulamayın. Testi bitirdikten sonra ellerinizi yıkayın.
- Numuneler ile numunelere maruz kalan tüm reaktifler ve materyaller potansiyel olarak bulaşıcı ve/veya biyolojik risk taşıyan madde muamelesi görmeli ve ulusal güvenlik düzenlemelerine uygun olarak ele alınmalıdır. Numunelerin toplanması, taşınması, saklanması, kullanımı ve bertarafı sırasında gerekli önlemleri alın.
- Numuneler ve reaktifler biyolojik güvenlik kabininde kullanılmalıdır. Potansiyel olarak bulaşıcı numunelerin işlenmesine yönelik mevcut talimatlara uygun personal protective equipment (PPE) (kişisel koruyucu ekipman) kullanın. Atıkları yerel düzenlemelere ve eyalet düzenlemelerine uygun olarak atın.

- Yaygın olarak kullanılan ekipmanın, özellikle mikropipetler ve çalışma yüzeylerinin düzenli olarak dekontamine edilmesi önerilir.
- "1907/2006 (REACH) sayılı Yönetmelik (AK) uyarınca, "VIASURE Real Time PCR Detection Kits"; Yönetmelik (AK) No 1272/2008'de (CLP) yer alan tehlike sınıfı kriterlerini karşılayan veya söz konusu yönetmelikte beyan için belirlenen değerden daha yüksek konsantrasyonlarda bulunan maddeler ve/veya karışımlar "içermediklerinden sağlığa ve çevreye zararsız olarak sınıflandırılmaları nedeniyle Malzeme Güvenlik Bilgi Formları (Safety Data Sheets) gerektirmezler.
- Ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için BD MAX™ System Kullanıcı El Kitabına bakın.

8. Test prosedürü

8.1. Numunelerin toplanması, saklanması ve taşınması

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System solunum örneklerinde (nazofaringeal sürüntüler ve aspiratlar) test edilmiştir. Diğer numune türleri kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Toplanan, saklanan ve taşınan numuneler, kullanıcı tarafından doğrulanmış şartlarda muhafaza edilmelidir. Genel olarak, solunum numuneleri taşıma ortamı içeren veya içermeyen (numune türüne göre) temiz kaplarda uygun şekilde toplanmalı ve etiketlenmeli ve testin kalitesini garanti etmek için en kısa sürede işleme konmalıdır. Nazofaringeal aspiratlar patojen materyalin taşınması ile ilgili yerel ve ulusal düzenlemelere uyularak, 72 saate kadar 2 - 8°C sıcaklıkta taşınmalıdır. Uzun süreli taşımalar için (72 saatten fazla), sevkiyatın -20°C veya daha düşük sıcaklıkta yapılması önerilir. Ancak Universal Transport media (UTM) içindeki nazofaringeal sürüntüler -20°C veya daha düşük sıcaklıkta donmuş halde taşınmalıdır. Test için taze örneklerin kullanılması tavsiye edilir. Örnekler 2 ila 8 °C'de 72 saate kadar saklanabilir (nazofaringeal aspiratlar) veya -20 °C'de dondurulabilir ya da koruma için ideal olarak -70 °C'de saklanabilir (UTM içinde). Numune ve nükleik asitlerin bozulmasını önlemek için tekrarlanan donma-çözülme döngülerinden kaçınılmalıdır.

Solunum örnekleri uygun laboratuvar talimatlarına uygun şekilde toplanmalı, taşınmalı ve saklanmalıdır. Ayrıntılı bilgi için CDC kılavuzuna bakın (CDC'nin Bulaşıcı hastalıklar laboratuvarı test rehberi (2022). Web sitesi <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). Enfeksiyon hastalıklarının teşhisi için mikrobiyoloji laboratuvarını kullanma rehberi: Infectious Diseases Society of America ve American Society for Microbiology (Amerika Bulaşıcı Hastalıklar Derneği ve Amerikan Mikrobiyoloji Derneği) 2018 güncellemesi. *Clinical Infectious Diseases* (Klinik Bulaşıcı Hastalıklar), 67(6), e1-e94).

Balgam örnekleri kullanılıyorsa, aşağıda belirtilen önerilere göre test edilebilirler.

8.2. Numunelerin hazırlanması ve DNA ekstraksiyonu

Numune hazırlama işlemini kullanılan ekstraksiyon kiti olan BD MAX™ ExK™ TNA-3'nin kullanım talimatlarındaki önerilere uyarak gerçekleştirin.

1. Bir BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube içine 200 µL örnek pipetleyin ve tüpü bir septum başlığıyla kapatın. Numuneyi 1 dakika boyunca yüksek hızda vorteksleyerek tamamen karıştırın. BD MAX™ System Operation'a (Kullanımına) geçin.

Uygulamaya özel ekstraksiyon hazırlama prosedürlerinin kullanıcı tarafından geliştirilip doğrulanması gerektiğini ve diğer bazı numunelerin ön işlem gerektirebileceğini unutmayın. Örnek olarak, balgam örneklerinde, numuneye 1:1 oranında asetilsistein (önerilen N-Asetil-L-sistein Ref. A7250, Merck KGaA) ekleyin (yani 250 µl balgam ve 250 µl asetilsistein 100 mg/ml), vorteksleyerek karıştırın ve 95°C'de 10 dakika ısıtın. 200 µl ön işleme tabi tutulmuş balgamı bir BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube'e pipetleyin ve tüpü bir septum kapağıyla kapatın. Numuneyi 1 dakika boyunca yüksek hızda vorteksleyerek tamamen karıştırın. BD MAX™ System Operation'a (Kullanımına) geçin.

8.3. PCR protokolü

Not: Lütfen ayrıntılı talimatlar için BD MAX™ System Kullanıcı El Kitabına bakın.

8.3.1. VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System için PCR test programı oluşturma.

Not: BD MAX™ System için VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit için testi zaten oluşturduysanız, 8.3.1 adımını atlayabilir ve doğrudan 8.3.2'ye gidebilirsiniz.

- 1) BD MAX™ System'in "Run" (Çalıştır) ekranında, "Test Editor" (Test Düzenleyici) sekmesini seçin.
- 2) "Create" (Oluştur) düğmesine tıklayın.
- 3) "Test Name" (Test Adı) penceresindeki Basic Information (Temel Bilgi) sekmesinde, testinize bir ad verin: örneğin VIASURE *Bordetella*.
- 4) "Extraction Type" (Ekstraksiyon Tipi) açılır menüsünde, "ExK TNA-3"yi seçin.
- 5) "Master Mix Format" (Master Karışım Formatı) açılır menüsünde, "Type 5"i (Tip 5) seçin.
 - a. Not: Ürün BD MAX™ testi için ek bir VIASURE ile birlikte kullanılabilir, ardından "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Rehidrasyon Tamponlu (Tip 5) Çift Master Karışım Konsantre Liyofilize MM) ögesini seçin.
- 6) "Sample extraction parameters" (Numune ekstraksiyon parametreleri) içinde "User defined" (Kullanıcı tanımlı) seçeneğini seçin ve numune hacmini 350 µL olarak ayarlayın.
- 7) "Ct Calculation" (Ct Hesaplaması)'nda "Call Ct at Threshold Crossing" (Eşiğin Geçilmesi Halinde Ct'yi Ara)'yı seçin.
- 8) Yazılım sürümü 5.00 veya üzeri ise ve barkodlu folyolu takma tüpleri varsa, "Custom Barcodes" (Özel Barkodlar) kısmında aşağıdaki yapılandırmayı seçin:
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Snap-In 2 Barkodu): 1C (*Bordetella* reaction tube (reaksiyon tüpüyle) ilgili olarak).
 - b. "Snap-In 3 Barcode" (Snap-In 3 Barkodu): 11 (Rehidrasyon Buffer tube için)

c. "Snap-In 4 Barcode" (Snap-In 4 Barkodu): "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Bölüm 8.3.1) seçmeniz halinde, başka bir VIASURE reaksiyon tüpü (farklı folyo).

9) "PCR settings" (PCR ayarları) sekmesinde aşağıdaki parametreleri girin: "Channel Settings" (Kanal Ayarları), "Gains" (Kazanımlar) ve "Threshold" (Eşik) (Tablo 3).

a. Not: Ürün BD MAX™ testi için ek bir VIASURE ile birlikte kullanılabilir, snap 2 (yeşil) ve snap 4 (mavi) konumları için PCR Ayarları ve Test Adımları tamamlanmalıdır.

Channel (Kanal)	Alias (Takma İsim)	Gain (Kazanım)	Threshold (Eşik)	Ct Min (Ct Asgari)	Ct Max (Ct Azami)
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)	-	-	-	-	-

Tablo 12. "PCR settings" (PCR ayarları).

Not: Her kanal için başlangıç noktası olarak yukarıda listelenen minimum eşik değerlerinin ayarlanması önerilir, ancak eşiklerin floresan eğrilerinin üstel fazı dahilinde ancak arka plan sinyallerinin üzerinde kalmasını sağlamak için nihai ayarların sonuç enterpolasyonu sırasında son kullanıcı tarafından belirlenmesi gerekir. Farklı cihazlar için eşik değeri, farklı sinyal yoğunlukları nedeniyle değişebilir.

10) "PCR settings" (PCR ayarları) sekmesinde aşağıdaki parametreleri de girin: "Spectral Cross Talk" (Spektral Tartışma) (Tablo 4).

		False Receiving Channel (Yanlış Alıcı Kanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasyon Kanalı)	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	-	

Tablo 13. "Spectral Cross Talk" (Spektral tartışma) parametreleri.

11) "Test Steps" (Test Adımları) sekmesine PCR protokolünü girin (Tablo 5).

Step Name (Adım İsmi)	Profile Type (Profil Tipi)	Cycles (Döngüler)	Time (s) (Süreler)	Temperature (Sıcaklık)	Detect (Tespit)
Initial denaturation (Başlangıç denatürasyonu)	Tutma	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denatürasyon ve Yeniden Birleştirme/Genişletme (Veri toplama))	2- Sıcaklık	45	10	95°C	-
			41	63°C	✓

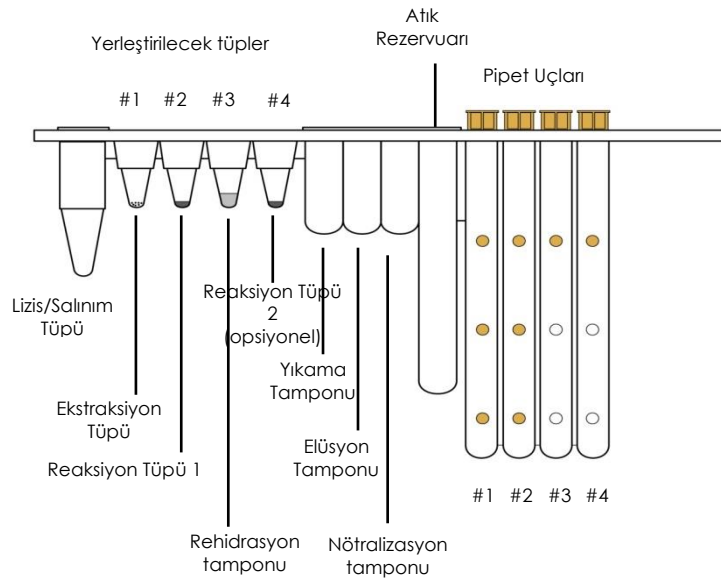
Tablo 14. PCR protokolü.

12) "Save Test (Testi Kaydet)" düğmesine tıklayın.

8.3.2. BD MAX™ Raf kurulumu.

- 1) Test edilecek her bir numune için, BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit içinden bir adet Unitized Reagent Strips çıkarın. Tüm sıvıların tüplerin alt kısmında olduğundan ve BD MAX™ System numune raflarına yüklendiğinden emin olmak için her bir şeridi hafifçe sert bir yüzeye vurun.
- 2) Gerekli sayıda BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes Ekstraksiyon Tüpü'nü (B4) (beyaz folyo) koruyucu poşetlerinden çıkarın. Ekstraksiyon Tüpünü/Tüplerini (beyaz folyo) TNA şeridindeki ilgili pozisyonlara yerleştirin (1. Yerleştirme pozisyonu, raftaki beyaz renkli kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve poşeti fermuar ile kapatın.
- 3) Uygun sayıda *Bordetella* reaction tube (1C folyo) belirleyin ve ayırın ve şeritte karşılık gelen konumlarına yerleştirin (2. Yerleştirme pozisyonu, raftaki yeşil renkli kodlama. Şekil 1'e bakın).
 - a. Fazla havayı çıkartın ve alüminyum poşetleri fermuar ile kapatın.
 - b. Rehidrasyonu doğru şekilde gerçekleştirebilmek için, lütfen liyofilize ürünün tüpün dibinde olduğundan ve tüpün üst kısmına veya folyo kapamasına yapışmadığından emin olun. Tüm ürünün tüpün altında olduğundan emin olmak için her bir tüpü sert bir yüzeye hafifçe vurun.
 - i. Not: "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Rehidrasyon Tamponlu Çift Master Karışimli Konsantre Liyofilize MM (Tip 5)) (Bölüm 8.3.1) formatını seçtiyseniz, uygun sayıda ilave VIASURE reaksiyon tüpünü (farklı folyo) belirleyin ve ayırın ve şeritteki konumlarına yerleştirin (4. Yerleştirme pozisyonu, raftaki mavi renkli kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve alüminyum poşetleri fermuar ile kapatın.
- 4) Gerekli sayıda Rehydration Buffer tubes (11 folyo) çıkarın ve şeritteki konumlarına yerleştirin (3. Yerleştirme pozisyonu, raftaki renksiz kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve poşeti fermuar ile kapatın.
 - a. Aktarımı doğru şekilde gerçekleştirebilmek için, sıvının tüpün dibinde olduğundan ve tüpün üst kısmına veya folyo kapamasına yapışmadığından emin olun. Tüm tamponun tüpün altında olduğundan emin olmak için her tüpü sert bir yüzeye hafifçe vurun.

Şekil 1. BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit içindeki BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA).



8.3.3. BD MAX™ Cihaz kurulumu.

- 1) BD MAX™ System yazılımı v4.50A veya daha üstü sürümünde "Run" (Çalıştır) ekranında "Work List" (İş Listesi) sekmesini seçin.
- 2) "Test" aşağı açılır menüsünde VIASURE *Bordetella* ögesini seçin (daha önce oluşturulmadıysa, Bölüm 8.3.1'e bakın).
- 3) Aşağı açılır menüden uygun kit parti numarasını (kullanılan ekstraksiyon kitinin dış kutusunda bulunur) seçin (isteğe bağlı).
- 4) Barkod tarayıcı ile tarayarak veya elle girerek İş Listesinin (Worklist) Numune tüpü (Sample tube) penceresine Sample Buffer Tube (Numune Tampon Tüpü) kimlik numarasını girin.
- 5) İş Listesinin (Worklist) Numune/Hasta Kimliği ve/veya Erişim (Specimen/Patient ID and/or Accession) penceresini doldurun ve "Save" (Kaydet) düğmesine tıklayın. Tüm Sample Buffer Tube öğeleri (Numune Tampon Tüpleri) girilene kadar devam edin. Numune/hasta kimliğinin ve Sample Buffer Tube öğesinin (Numune Tampon Tüplerinin) doğru şekilde eşleştiğinden emin olun.
- 6) Hazırlanan Sample Buffer Tube öğesini (Numune Tampon Tüpünü) BD MAX™ Racks'a yerleştirin.
- 7) Rafları BD MAX™ System'e yükleyin (A Rafı, BD MAX™ System'in sol tarafında ve B Rafı sağ tarafta yer alır).
- 8) BD MAX™ System'e gerekli sayıda BD MAX™ PCR Cartridges yerleştirin.
- 9) BD MAX™ System'in kapağını kapatın.
- 10) Prosedüre başlamak için "Start Run" (Çalıştırmaya Başla) düğmesine tıklayın.

8.3.4. BD MAX™ raporu

- 1) Ana menüde "Results" (Sonuçlar) düğmesine tıklayın.
- 2) Ya listenizdeki çalıştır tuşuna çift tıklayın ya da "view button"a (görüntüle düğmesi) basın.
- 3) "Print" (Yazdır) ögesine tıklayın ve: "Run Details, Test Details and Plot..." (Çalıştırma Detayları, Test Detayları ve Çizit....) ögesini seçin.
- 4) "Run Reports" (Raporları Çalıştır) ekranında "Print or Export" (Yazdır veya Dışa Aktar) düğmesine tıklayın.

9. Sonuçların yorumlanması

Verilerin nasıl analiz edileceğine dair ayrıntılı açıklama için, BD MAX™ System Kullanım Kılavuzuna bakın.

Verilerin analizi, üreticinin talimatlarına göre BD MAX™ yazılımı tarafından yapılır. BD MAX™ yazılımı, aşağıdaki şekilde test edilen her bir numunenin her bir tespit kanalı için Ct değerlerini ve amplifikasyon eğrilerini raporlar:

- 0'ın Ct değeri, belirtilen Eşik değerine sahip yazılım tarafından hesaplanan hiçbir Ct değerinin olmadığını gösterir (bkz. Tablo 3). "0" Ct değeri gösteren numunenin amplifikasyon eğrisi manuel olarak kontrol edilmelidir.

- 1'lik Ct değeri, amplifikasyon işleminin gerçekleşmediğini gösterir.

- Diğer herhangi bir Ct değeri, amplifikasyon eğrisi ile ilintili olarak ve Tablo 6'te verilen numune yorumlama kılavuzlarına göre yorumlanmalıdır.

Amplifikasyon karışımının doğru çalıştığını doğrulamak için Dahili Kontrol sinyalinin kontrol edin. Ek olarak, herhangi bir BD MAX™ System hatası raporu olup olmadığını kontrol edin.

Sonuçlar aşağıdaki tabloyu kullanarak okunmalı ve analiz edilmelidir:

<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i> (475/520)	<i>B. holmesii</i> (585/630)	<i>B. paraptussis</i> (630/665)	Dahili kontrol (530/565)	Yorumlama
+	+	+	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> ve/veya <i>B. holmesii</i> ve <i>B. paraptussis</i> DNA'sı Tespit Edildi ¹
-	-	-	+ ²	<i>B. pertussis</i> , <i>B. holmesii</i> ve <i>B. paraptussis</i> DNA'sı Tespit Edilmedi ²
+	-	-	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> DNA'sı Tespit Edildi, <i>B. holmesii</i> ve <i>B. paraptussis</i> DNA'sı Tespit Edilmedi ¹
+	+	-	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> ve/veya <i>B. holmesii</i> DNA'sı Tespit Edildi, <i>B. paraptussis</i> DNA'sı Tespit Edilmedi ¹
+	-	+	+/- ¹	<i>B. pertussis</i> ve <i>B. paraptussis</i> DNA'sı Tespit Edildi, <i>B. holmesii</i> DNA'sı Tespit Edilmedi ¹
-	+ ³	-	+/- ¹	<i>B. holmesii</i> DNA'sı Tespit Edildi, <i>B. pertussis</i> ve <i>B. paraptussis</i> DNA'sı Tespit Edilmedi ¹
-	+ ³	+	+/- ¹	<i>B. holmesii</i> ve <i>B. paraptussis</i> DNA'sı Tespit Edildi, <i>B. pertussis</i> DNA'sı Tespit Edilmedi ¹
-	-	+	+/- ¹	<i>B. paraptussis</i> DNA'sı Tespit Edildi, <i>B. pertussis</i> ve <i>B. holmesii</i> DNA'sı Tespit Edilmedi ¹
-	-	-	- ²	PCR reaksiyonunda inhibitörlerin olması ya da numune işleme ve/veya amplifikasyon adımlarında genel bir sorun (hata kodu ile rapor edilmemiş) meydana gelmesi durumunda Çözülenmemiş (UNR) Sonuç elde edilir. ²
IND	IND	IND	IND	Belirsiz tahlil sonucu (IND). BD MAX™ System arızası nedeniyle. Bir hata koduna bağlı cihaz arızası durumunda gösterilen tahlil sonucu.
INC	INC	INC	INC	Eksik tahlil sonucu (INC). BD MAX™ System arızası nedeniyle. Çalışmanın tamamlanamaması durumunda gösterilen tahlil sonucu.

Tablo 15. Numunelerin yorumlanması.

+: Amplifikasyon meydana geldi.

-: Amplifikasyon meydana gelmedi.

1 Elde edilen Ct değeri ≤ 40 ise, numune pozitif olarak kabul edilir. Dahili Kontrol (IC) bir amplifikasyon sinyali gösterebilir veya göstermeyebilir. Bazen, hedefin yüksek kopya sayısı, hedefe özel nükleik asitlerin tercihli amplifikasyonuna neden olabileceğinden, IC tespiti gerekli değildir.

2 Tespit sistemi içerisinde amplifikasyon sinyali göstermiyorsa ancak dahili kontrol pozitifse (Ct ≤ 35), numune negatif olarak kabul edilir. PCR reaksiyonunun inhibisyonu, dahili kontrolün amplifikasyonu ile hariç tutulabilir. Çözülenmemiş sonuçlarda (UNR), negatif numunede dahili kontrol sinyalinin olmaması durumunda aşağıdaki belirtileri izleyerek testi tekrarlamaz önerilir:

3 *B. holmesii* DNA, 475/520 (FAM) ve 585/630 (ROX) olmak üzere iki farklı kanalda tespit edilir, ancak LoD çevresindeki pozitif örneklerde 585/630 (ROX) daha yüksek hassasiyet nedeniyle o kanalda yalnızca sinyal elde etmek mümkündür.

Devam eden bir belirsiz sonuç durumunda, kullanım talimatlarının, kullanıcı tarafından kullanılan ekstraksiyon işleminin gözden geçirilmesi; her bir PCR adımının doğru uygulandığının teyidi ve parametrelerin gözden geçirilmesi; ve eğrinin sigmoid şekilde olduğunun ve floresan yoğunluğunun kontrol edilmesi önerilir.

NOT: Sample Buffer Tube'de bir tekrar testi için yeterli hacim mevcuttur. 2-8 °C veya 25 °C'de saklanan, hazırlanmış BD MAX™ Sample Buffer Tube için tekrar testi 24 saat içinde yapılmalıdır.

Test sonuçları tıbbi geçmiş, klinik semptomlar ve diğer tanı testleri baz alınarak, bir sağlık uzmanı tarafından değerlendirilmelidir.

10. Testin kısıtlamaları

- Test sonuçları tıbbi geçmiş, klinik semptomlar ve diğer tanı testleri baz alınarak, bir sağlık uzmanı tarafından değerlendirilmelidir.
- Her ne kadar bu analiz diğer numune tipleriyle birlikte kullanılabilse de, nazofaringeal swablar ve nazofaringeal aspiratlar ile doğrulanmıştır. Balgam örnekleri kullanılıyorsa, yukarıda belirtilen önerilerle test edilebilirler.
- İyi bir test performansı için liyofilize ürün, tüpün altında olmalı ve tüpün üst alanına veya folyo kapamaya yapışmamalıdır. Tüm ürünün tüpün altında olduğundan emin olmak için her bir tüpü sert bir yüzeye hafifçe vurun.
- Reaksiyon karışımının, normalde tüpün altında, normalden farklı (konik şekil olmayan, homojen olmayan, boyut olarak daha küçük/daha büyük ve/veya beyazımsı renkten farklı) stabilize formatta görünümü, testin işlevini değiştirmez.
- Testin kalitesi numunenin kalitesine bağlıdır; nükleik asit, klinik örneklerden uygun şekilde ekstrakte edilmelidir.
- Bu test kantitatif bir testtir ve kantitatif değerler sağlamaz veya mevcut organizma sayısını göstermez.
- Bu gibi durumlarda, tespit sınırının altında son derece düşük hedef seviyeleri tespit edilebilir, ancak sonuçlar tekrarlanamayabilir.
- Yüksek konsantrasyonlarda hedef DNA içeren *Bordetella* şüphesi olan numunelerin çapraz kontaminasyonu nedeniyle veya önceki reaksiyonlardan kalan PCR ürünleriyle kontaminasyon gibi sebepler yüzünden yalancı pozitif sonuçların ortaya çıkma olasılığı bulunmaktadır.
- VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System içinde kullanılan IS481, hIS1001 and pIS1001 dizilerinin saptanması için spesifik primer ve prob kombinasyonları; insan genomu, insan mikroflorası veya öngörülebilir yalancı pozitif ile sonuçlanabilecek diğer solunum mikroorganizmaları ile önemli birleşik homolojiler göstermez.
- Yalancı Negatif sonuçlar, aşağıdakiler dahil çeşitli faktörlerden ve bunların kombinasyonlarından kaynaklanabilir:
 - Uygun olmayan örneklerin toplanması, taşınması, depolanması ve/veya muamele yöntemleri.
 - Uygun olmayan işleme prosedürleri (DNA ekstraksiyonu dahil).
 - Numunelerin taşınması/depolanması ve/veya işlenmesi sırasında DNA'nın bozulması.
 - Primer veya prob bağlama bölgelerindeki mutasyonlar veya polimorfizmler, yeni veya bilinmeyen *Bordetella* suşlarının tespitini etkileyebilir.
 - Numunedeki organizma seviyeleri, tahlil için tespit limitinin altında.
 - qPCR inhibitörlerinin veya diğer türden müdahale edici maddelerin varlığı.
 - Kullanım talimatlarına ve test prosedürüne uyulmaması.
- Pozitif test sonucu, mutlaka canlı bakteri varlığını göstermez ve bu bakterinin bulaşıcı olduğu veya klinik semptomlara neden olan ajanlar olduğu anlamına gelmez. Ancak pozitif sonuç, *Bordetella* hedef dizilerinin varlığının göstergesidir.

- Diğer solunum yolu hastalıkları için tanısal testler negatifse ve hastanın klinik sunumu ve epidemiyolojik bilgileri, *B. pertussis*, *B. parapertussis* ve/veya *B. holmesii* enfeksiyonunun mümkün olduğunu gösteriyorsa, sonucun yalancı negatif olabileceği düşünülmeli ve hastanın yeniden test edilmesi değerlendirilmelidir.
- Negatif bir sonuç, klinik bir numunede *B. pertussis*, *B. parapertussis* ve/veya *B. holmesii* DNA'sının varlığını engellemez. Klinik gözlemler, hasta öyküsü ve epidemiyolojik bilgiler *B. pertussis*, *B. parapertussis* ve/veya *B. holmesii* enfeksiyonunu düşündürürse, numune hacmi artırılarak yeniden test gerçekleştirilmesi düşünülmelidir.
- BD MAX™ System için VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System kullanılarak Çözümlememiş, Belirsiz veya Eksik sonuçların alınması durumunda, yeniden test yapılması gerekecektir. Çözümlememiş sonuçlar, numunede inhibitörlerin varlığından veya liyofilize edilmiş reaksiyon karışımı tüpünün yanlış rehidrasyonundan kaynaklanabilir. Bir cihaz arızası varsa, Belirsiz veya Eksik sonuçlar elde edilecektir.

11. Kalite kontrol

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System , her reaksiyon tüpünde tekniğin doğru biçimde uygulandığını onaylayan Internal Control (IC) içerir.

12. Performans özellikleri

12.1. Klinik duyarlılık ve özgüllük

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System'in klinik performansı, klinik ve spayk nazofaringeal swablar ve halihazırda *B. pertussis*, *B. parapertussis* ve/veya *B. holmesii* için pozitif veya negatif olarak karakterize edilen nazofaringeal aspiratlar kullanılarak test edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki gibiydi:

	Saha	Numune türü	İş akışı	Hedef
1	CerTest Biotec (Zaragoza, İspanya)	Nazofaringeal swablar (Cerba Xpert)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>B. pertussis</i>
2		Nazofaringeal aspiratlar (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
3		Nazofaringeal swablar ve aspiratlar (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
4		Nazofaringeal swablar (Eurofins)		<i>B. pertussis</i>
5		Nazofaringeal swablar (Cerba Xpert + Eurofins + simüle numuneler)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>

Tablo 16. Saha, numune türü, iş akışı ve hedef.

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System için gerçek pozitif ve negatif değerler, yalancı pozitif ve negatif değerler, duyarlılık ve özgüllük, aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi her bir karşılaştırmalı test ile bağlantılı olarak hesaplanmıştır:

Saha	Karşılaştırma testi	Hedef	TP	TN	FP	FN	Hassasiyet	Özgüllük
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	Doğrulanmış kurum içi boğmaca/parapertussis testi	<i>B. pertussis</i>	43	54	0	3	0,935 (0,821-0,986)	1 (0,966-1)
5	İlk karakterizasyon*	<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)

Tablo 17. VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System için gerçek pozitif (TP) ve negatif (TN) değerler, yalancı pozitif (FP) ve negatif (FN) değerler, duyarlılık, özgüllük.

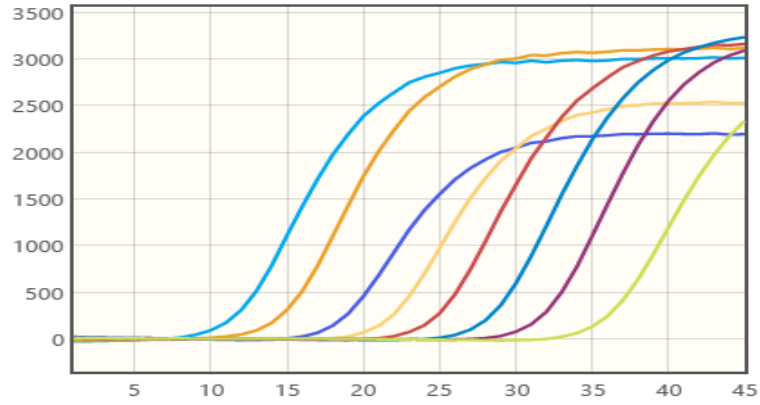
* Başlangıç karakterizasyonu, Cerba Xpert örneklerinde SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis testini (Cepheid) ve *B. Pertussis* ve *B. parapertussis* tespiti için doğrulanmış kurum içi pertussis/parapertussis miksajını ve SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis testini (Cepheid) + *B. holmesii* tespiti için RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm) testini içerir.

Sonuçlar, VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System kullanılarak *B. pertussis*, *B. parapertussis* ve/veya *B. holmesii*'nin tespiti için yüksek düzeyde uyum olduğunu göstermektedir.

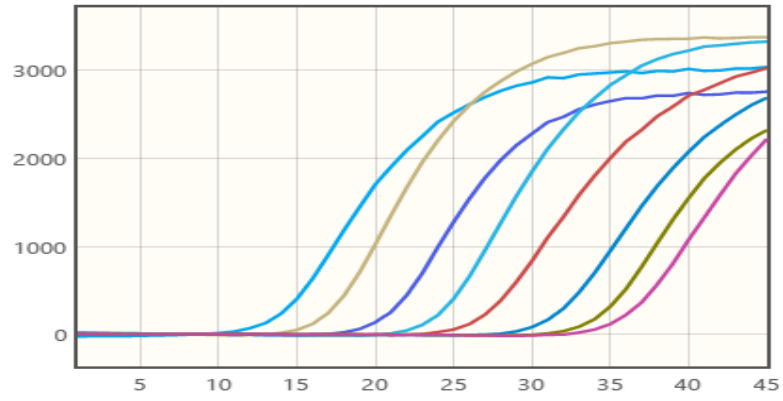
12.2. Analitik hassasiyet

VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, nazofaringeal sürüntü örneklerinde $\geq 95\%$ 'lik bir pozitif oran ile *B. pertussis* için 1,2 CFU/mL numune, *B. holmesii* için 4×10^{-2} CFU/mL numune ve *B. parapertussis* için 12 CFU/mL numune tespit limitine (LoD) sahiptir.

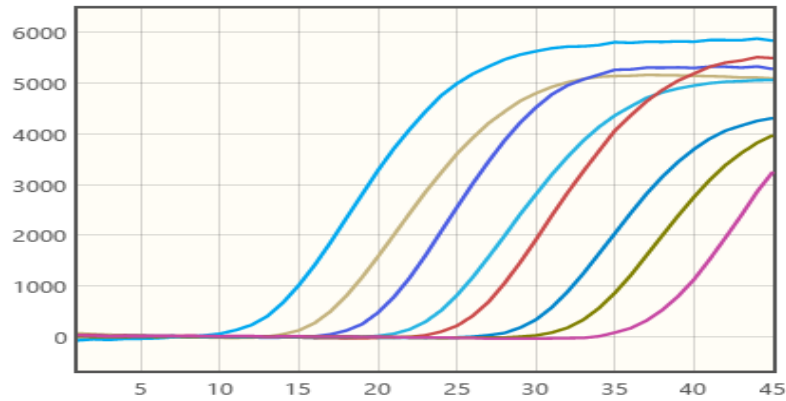
Şekil 5. *Bordetella pertussis* dilüsyon serisi (reaksiyon başına $7*10^4$ - $7,07*10^{-3}$ CFU) şablonu BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanalı) üzerinde çalışır.



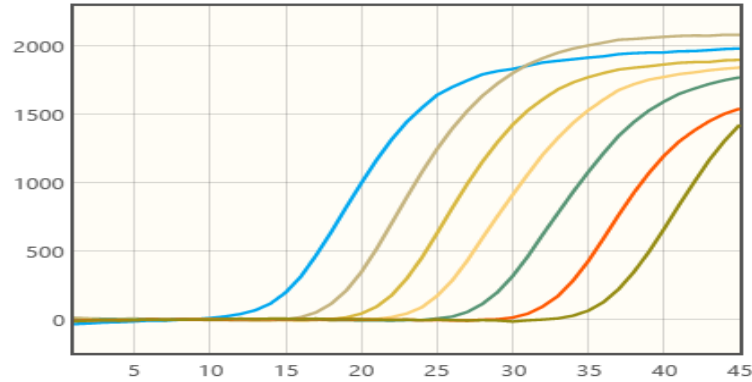
Şekil 6. *Bordetella holmesii* dilüsyon serisi (reaksiyon başına $2,42*10^3$ - $2,42*10^{-4}$ CFU) şablonu BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanalı) üzerinde çalışır.



Şekil 7. *Bordetella holmesii* dilüsyon serisi (reaksiyon başına $2,42*10^3$ - $2,42*10^{-4}$ CFU) şablonu BD MAX™ System (585/630 (ROX) kanalı) üzerinde çalışır.



Şekil 8. *Bordetella parapertussis* dilüsyon serisi (reaksiyon başına $7,07 \times 10^4$ - $7,07 \times 10^{-2}$ CFU) şablonu BD MAX™ System (630/665 (Cy5) kanalı) üzerinde çalışır.



12.3. Analitik özgüllük

Bordetella testinin özgünlüğü, solunum yolu hastalıklarıyla ilişkili farklı mikroorganizmalardan oluşan bir panel test edilerek doğrulandı. Test edilen aşağıdaki mikroorganizmaların hiçbiri arasında çapraz reaktivite tespit edilmemiştir:

Çapraz reaktivite testi					
İnsan Adenovirus tipleri 1-5, 8, 15, 31, 40 ve 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 Koronavirüs	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virüsü	-	İnsan metapnömonivirüs A ve B	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotip A ve C	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virüsü	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i> strain CM-1	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virüsü (Clade 3C2a.1)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
İnsan coronavirus 229E, OC43 ve NL63	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	İnsan parainfluenza 1, 2, 3 ve 4 virüsleri	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virüs	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Tip A1 ve g885652	-
Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virüsü	-	Influenza B/Florida/04/06 virüs	-	Respiratuvar sinsityal virüs (RSV) tip A ve B	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virüs	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virüs	-	İnsan rinovirus	-
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) virüsü	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virüsü	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-		-

Tablo 18. Bu çalışmada kullanılan referans patojenik mikroorganizmalar.











12.4. Analitik reaktivite

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System'in reaktivitesi, şablon olarak *B. pertussis*, *B. parapertussis* ve *B. holmesii*'den ekstrakte edilen DNA'ya karşı değerlendirildi ve pozitif sonuçlar verdi.

Bibliography/ Bibliyografi

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/ IVD bileşenlerinin ve reaktiflerin sembolleri

 In vitro diagnostic device In vitro tanı cihazı	 Keep dry Kuru halde tutun	 Use by Son kullanma tarihi	 Manufacturer Üretici	 Batch code Parti kodu
 Consult instructions for use Kullanım talimatlarına bakın	 Temperature limitation Sıcaklık sınırlaması	 Contains sufficient for <n> test <n> testi için yeterli içerik	 Unique Device Identification Benzersiz Cihaz Kimliği	 Catalogue number Katalog numarası

Trademarks

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

Change Control / Kontrol Deęiřimi		
Version No. / Versiyon No.	Changes / Deęiřiklikler	Date / Tarih
00	Original version / Orijinal versiyon.	29/06/2022

Table A 2. Control change table/ Kontrol deęiřim tablosu.

Revision: 29th June 2022

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev02