

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Bordetella
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Ponizsze instrukcje obsługi odnoszą się do następującego kodu:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / KOD
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. / Kod produktu do stosowania z systemem BD MAX™ System.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Instrukcja użytkownika dołączona do zestawu jest w języku angielskim/polskim.

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.

PL Aby pobrać instrukcje użycia w innych językach należy odwiedzić stronę **certest.es/viasure/labeling**. Następnie należy wykonać dostępne tam instrukcje, aby uzyskać dostęp do potrzebnej wersji językowej. Aby uzyskać dalsze informacje, prosimy o kontakt pod adresem: 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 / Contacte con viasure@certest.es si su idioma no está en la lista.

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

Uwaga: Użytkownik powinien powiadomić producenta oraz kompetentny organ Kraju Członkowskiego, na terenie, którego ma siedzibę użytkownik i/lub pacjent o wszelkich poważnych incydentach powiązanych z tym produktem.

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

Treść

1.	Przeznaczenie.....	19
2.	Streszczenie i objaśnienia	19
3.	Zasada oznaczania	20
4.	Dostarczane odczynniki	20
5.	Odczynniki i sprzęt zapewniane przez użytkownika	20
6.	Warunki transportu i przechowywania.....	21
7.	Środki ostrożności dla użytkowników	21
8.	Procedura testowa	22
8.1.	Pobieranie, przechowywanie i transport próbek.....	22
8.2.	Przygotowanie próbki i ekstrakcja DNA	23
8.3.	Protokół PCR	23

9.	Interpretacja wyników	27
10.	Ograniczenia stosowania testu	29
11.	Kontrola jakości	30
12.	Charakterystyka wydajnościowa	30
12.1.	Czułość i swoistość kliniczna	30
12.2.	Czułość analityczna.....	32
12.3.	Swoistość analityczna.....	33
12.4.	Reaktywność analityczna	34
	Bibliography/ Bibliografia.....	35
	Symbols for IVD components and reagents/ Symbole dla elementów i odczynników IVD.....	35
	Trademarks.....	35

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.

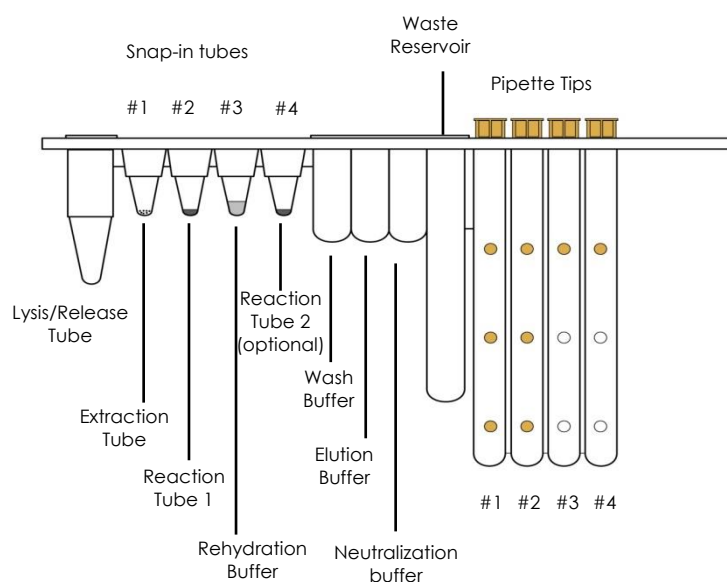
- 12) Click the "Save Test" button.

8.3.2 BD MAX™ Rack set up

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

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

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



8.3.3 BD MAX™ Instrument set up

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

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

8.3.4 BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

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

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

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

Results should be read and analyzed using the following table:

B. pertussis/ B. holmesii (475/520)	B. holmesii (585/630)	B. parapertussis (630/665)	Internal Control (530/565)	Interpretation
+	+	+	+/- ¹	B. pertussis and/or B. holmesii and B. parapertussis DNA Detected ¹
-	-	-	+ ²	B. pertussis, B. holmesii and B. parapertussis DNA Not Detected ²
+	-	-	+/- ¹	B. pertussis DNA Detected, B. holmesii and B. parapertussis DNA Not Detected ¹
+	+	-	+/- ¹	B. pertussis and/or B. holmesii DNA Detected, B. parapertussis DNA Not Detected ¹
+	-	+	+/- ¹	B. pertussis and B. parapertussis DNA Detected, B. holmesii DNA Not Detected ¹
-	+ ³	-	+/- ¹	B. holmesii DNA Detected, B. pertussis and B. parapertussis DNA Not Detected ¹
-	+ ³	+	+/- ¹	B. holmesii and B. parapertussis DNA Detected, B. pertussis DNA Not Detected ¹
-	-	+	+/- ¹	B. parapertussis DNA Detected, B. pertussis and B. holmesii 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).

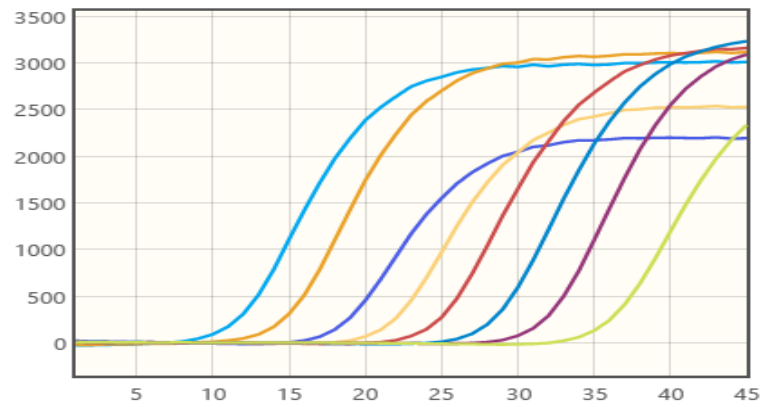


Figure 2. Dilution series of *Bordetella holmesii* (2.42×10^3 - 2.42×10^{-4} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

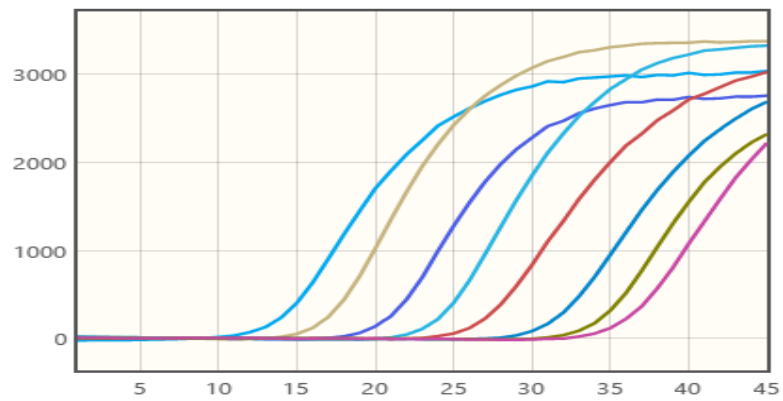


Figure 3. Dilution series of *Bordetella holmesii* (2.42×10^3 - 2.42×10^{-4} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

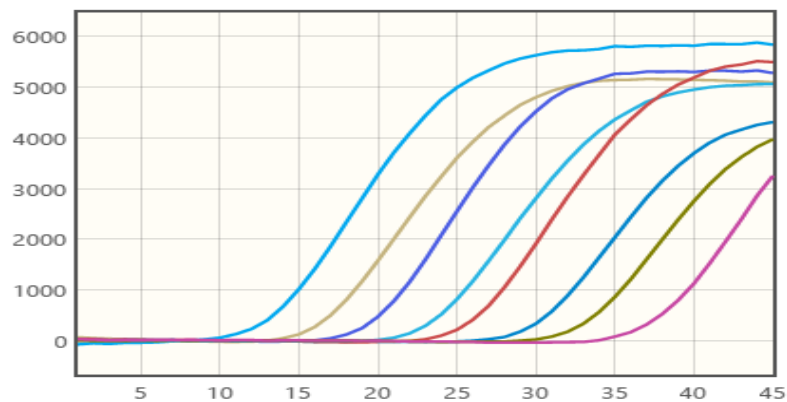
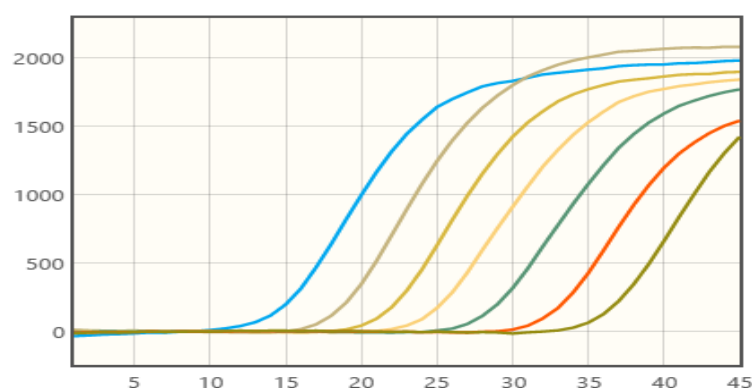


Figure 4. Dilution series of *Bordetella parapertussis* (7.07×10^4 - 7.07×10^{-2} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



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.

POLSKI

1. Przeznaczenie

Zestaw VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System to automatyczny test PCR czasu rzeczywistego przeznaczony do jakościowego wykrywania i różnicowania DNA *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* i/lub *Bordetella holmesii* w próbkach pobranych z układu oddechowego (z wymazów z jamy nosowo-gardłowej i aspiracie z jamy nosowo-gardłowej) od pacjentów z podejrzeniem infekcji układu oddechowego postawionej przez fachowy personel medyczny (HCP, ang. HealthCare Professional). Ten test jest przeznaczony do wspomaganie identyfikacji *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* i/lub *Bordetella holmesii* w połączeniu z klinicznymi objawami podmiotowymi i przedmiotowymi oraz epidemiologicznymi czynnikami ryzyka. Przy oznaczeniu wykorzystywany jest system BD MAX™ System do zautomatyzowanej ekstrakcji DNA, a następnie-PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem dostarczonych odczynników w połączeniu z uniwersalnymi odczynnikami i materiałami jednorazowymi przeznaczonymi do stosowania z systemem BD MAX™ System. DNA jest wyodrębniane z próbek pochodzących z układu oddechowego, amplifikowane w toku reakcji RT-PCR i wykrywane za pomocą sond z fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym swoistych dla *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* i *Bordetella holmesii*.

2. Streszczenie i objaśnienia

Rodzaj *Bordetella* składa się z 6 gatunków, z których 4 infekują ludzi: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* i *B. bronchiseptica*. Najważniejszą przyczyną krztusca jest zakażenie *B. pertussis*, a rzadziej jest on wywołany przez *B. parapertussis*. U pacjentów z ciężką chorobą towarzyszącą izolowano *B. holmesii*, natomiast infekcja *B. bronchiseptica* jest na ogół ograniczona do zwierząt, ale okazjonalnie tę bakterię izolowano w próbkach pobranych od pacjentów o upośledzonej odporności.

Krztusiec to bardzo zakaźna choroba, która rozprzestrzenia się między ludźmi najczęściej przez kaszel lub kichanie czy bliski kontakt z zakażonym we wspólnej przestrzeni. Przebieg kliniczny choroby obejmuje trzy etapy, podczas których występują następujące objawy kliniczne: etap nieżytowy (nieżyt śluzowy nosa, stan podgorączkowy i okazjonalny kaszel), etap napadowy (długo trwające napady gwałtownego kaszlu, zasinienie, wymioty i wyczerpanie) oraz etap rekonwalescencji (stopniowe zdrowienie i mniej uporczywe napady kaszlu).

Pomimo szczepień krztusiec pojawia się endemicznie w większości regionów świata. Rzetelna diagnoza jest niezbędna w celu rozpoczęcia odpowiedniego leczenia i, w razie potrzeby, profilaktyki kontaktów, w szczególności dotyczącej niezaszczepionych niemowląt, u których krztusiec może stanowić zagrożenie życia. Testy amplifikacji kwasów nukleinowych, w tym PCR i od niedawna RT-PCR, pozwalają obejść niektóre z ograniczeń hodowli i metod serologicznych stosowanych w diagnozowaniu infekcji bakteriami *Bordetella*. Większość testów PCR bazuje na wykrywaniu sekwencji insercji (IS, ang. Insertion Sequence) występujących w wielu kopiach genomu, co zwiększa czułość testów.

3. Zasada oznaczania

Zestaw VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System jest przeznaczony do i różnicowania jakościowego wykrywania DNA *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* i/lub *Bordetella holmesii* w próbkach z układu oddechowego. Po izolacji DNA identyfikacji tych szczepów *Bordetella* dokonuje się przez amplifikację konserwatywnego regionu sekwencji insercji IS481 dla *Bordetella pertussis/holmesii*, pIS1001 dla *Bordetella parapertussis* oraz hIS1001 dla *Bordetella holmesii* przy użyciu swoistych starterów i sond oznaczonych barwnikiem fluorescencyjnych.

Zasada działania zestawu VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System opiera się na aktywności egzonukleazy 5' polimerazy DNA. Podczas amplifikacji DNA ten enzym odrywa sondę powiązaną z komplementarną sekwencją DNA, oddzielając wygaszacz od barwnika reporterowego. Reakcja ta generuje wzrost sygnału fluorescencyjnego, który jest proporcjonalny do ilości docelowej matrycy. Ta fluorescencja jest mierzona za pomocą systemu BD MAX™ System.

Zestaw VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zawiera w każdej probówce wszystkie elementy konieczne do oznaczenia PCR w czasie rzeczywistym (swoiste startery/sondy, dNTP, bufor, polimeraza) w postaci stabilizowanej oraz kontrolę wewnętrzną do monitorowania procesu ekstrakcji i/lub hamowania aktywności polimerazy.

Element wykrywany	Kanał	Gen
<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i>	475/520	Sekwencja IS481
<i>B. holmesii</i>	585/630	Sekwencja hIS1001
<i>B. parapertussis</i>	630/665	Sekwencja pIS1001
Kontrola wewnętrzna (IC)	530/565	-

Tabela 10. Element wykrywany, kanał i geny

4. Dostarczane odczynniki

Zestaw VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zawiera następujące materiały i odczynniki wymienione szczegółowo w tabeli 2.:

Odczynnik/materiał	Opis	Kod kreskowy	Ilość
<i>Bordetella</i> próbówka reakcyjna	Mieszanka enzymów, starterów, sond, buforów, dNTP, stabilizatorów oraz kontroli wewnętrznej w formie stabilizowanej	1C folia	2 woreczki po 12 przezroczystych próbek
Rehydration Buffer tube (próbówka z buforem do rehydratacji)	Roztwór do rekonstrukcji ustabilizowanego produktu	Folia 11	1 woreczek z 24 przezroczystymi próbkami

Tabela 11. Odczynniki i materiały zawarte w zestawie VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System o numerze kat. VS-BDT124 (444204).

5. Odczynniki i sprzęt zapewniane przez użytkownika

Poniżej wymieniono materiały i sprzęt, których użycie jest konieczne, ale które nie należą do zestawu VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Przyrząd do PCR w czasie rzeczywistym: BD MAX™ System (nr ref: 441916).

- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (nr ref.:442827 lub 442828).
- Kartridże do PCR BD MAX™ Cartridges (nr ref: 437519).
- Wirówka
- Mikropipety (dokładność w zakresie 2–1000 µl)
- Woda niezawierająca nukleazy.
- Końcówki z filtrem
- Bezpudrowe rękawice jednorazowe.

6. Warunki transportu i przechowywania

- Zestawy można przesyłać i przechowywać w temperaturze 2–40°C do upływu terminu ważności podanego na etykiecie.
- Po otwarciu aluminiowych woreczków zawierających próbówki reakcyjne, produkt można zużyć w ciągu maksymalnie 28 dni.

7. Środki ostrożności dla użytkowników

- Ten produkt jest przeznaczony do stosowania wyłącznie przez profesjonalnych użytkowników, takich jak fachowi pracownicy laboratorium lub fachowy personel medyczny i technicy, przeszkoleni w zakresie technik biologii molekularnej.
- Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Nie należy używać przeterminowanych odczynników i (lub) materiałów.
- Nie używać zestawu, jeżeli etykieta zamykająca pudełko zewnętrzne została zerwana.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się pudełka ochronnego w chwili dostarczenia.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się woreczków ochronnych w chwili dostarczenia.
- Nie stosować odczynników, jeżeli środek osuszający nie jest obecny lub jest pęknięty wewnątrz woreczków odczynnika.
- Nie należy wyjmować środka osuszającego z woreczków z odczynnikami.
- Po każdym użyciu szybko zamknąć na zamek woreczki ochronne odczynników. Przed zamknięciem woreczków należy usunąć z nich nadmiar powietrza.
- Nie wolno używać odczynników, jeżeli folia została rozerwana lub uszkodzona.
- Nie wolno mieszać odczynników z różnych woreczków i (lub) zestawów i (lub) serii.
- Chronić odczynniki przed wilgocią. Przedłużająca się ekspozycja na wilgoć może wpływać na działanie produktu.
- Chronić elementy przed światłem.
- W razie przeprowadzania innych testów PCR w tej samej części laboratorium, należy zachować ostrożność, aby uniknąć skażenia zestawu Viasure *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, zestawu do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA-3 LUB, jakichkolwiek dodatkowych odczynników potrzebnych do przeprowadzania testów oraz systemu BD MAX™. Należy zawsze unikać skażenia odczynników drobnoustrojami oraz rybonukleazą (RNaza) / dezoksyrybonukleazą (DNaza). Zaleca się stosowanie jałowych, wolnych od RNazy / DNazy, jednorazowych końcówek do pipet, opornych na aerozole lub końcówek do

pipet wporowych. Do każdej próbki należy stosować nową końcówkę. Przed obchodzeniem się z odczynnikami i wkładami trzeba zmieniać rękawiczki (BD MAX™ PCR Cartridge).

- Aby uniknąć skażenia środowiska amplikonami, nie należy rozłamywać wkładu BD MAX™ PCR Cartridge po użyciu. Zamknięcia wkładu BD MAX™ PCR Cartridge mają na celu zapobieganie skażeniu.
- Należy zaplanować przebieg pracy w jednym kierunku. Przeprowadzanie testu należy zaczynać w miejscu wykonywania ekstrakcji, a następnie przechodzić do miejsca wykonywania amplifikacji i detekcji. Nie należy przenosić z powrotem próbek, sprzętu, i odczynników do miejsca, w którym wykonywano wcześniejszy etap testu.
- Należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej. Należy stosować odzież ochronną, jednorazowe rękawiczki, okulary, i maseczkę. W obszarze roboczym nie wolno jeść, pić, palić tytoniu ani nakładać środków kosmetycznych. Po zakończeniu przeprowadzania testu należy umyć ręce.
- Próbkę traktować jako potencjalnie zakaźną i/lub stanowiącą zagrożenie biologiczne, podobnie jak wszelkie odczynniki i materiały, które były narażone na kontakt z próbkami. Należy obchodzić się z nimi zgodnie z krajowymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa. Podczas pobierania, przechowywania, transportu, obsługi i utylizacji próbek należy zachowywać konieczne środki ostrożności.
- Próbkę i odczynniki trzeba obsługiwać w obrębie komory laminarnej. Należy stosować środki ochrony indywidualnej (ŚOI) zgodne z aktualnie obowiązującymi wytycznymi dotyczącymi obsługi potencjalnie zakaźnych próbek. Odpady należy usuwać zgodnie z odpowiednimi przepisami miejscowymi i krajowymi.
- Zaleca się regularne odkażanie często używanego sprzętu, szczególnie mikropipet i powierzchni roboczych.
- Zgodnie z Dyrektywą KE Nr 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits nie wymagają Arkuszy Danych dotyczących Bezpieczeństwa (Safety Data Sheets) Materiału, ponieważ na podstawie deklaracji zostały zakwalifikowane jako produkty bezpieczne dla zdrowia i środowiska, jako niezawierające substancji ani mieszanin spełniających kryteria klasyfikacji substancji niebezpiecznych dostępnych w dyrektywie KE Nr 1272/2008 (CLP) lub występujących w stężeniach przekraczających wartości ustalone w wymienionych przepisach.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności i procedury opisano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™ System.

8. Procedura testowa

8.1. Pobieranie, przechowywanie i transport próbek

Zestaw VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ został przetestowany z próbkami z układu oddechowego (wymazy i aspiraty z jamy nosowo-gardłowej). Inne rodzaje próbek muszą zostać zwalidowane przez użytkownika.

Pobieranie, przechowywanie, i transport z próbek powinien odbywać się w warunkach zwalidowanych przez użytkownika. Ogólnie, w celu zapewnienia jakości testu, próbki z dróg oddechowych należy pobierać i oznaczać odpowiednio w czystych pojemnikach z podłożem transportowym lub bez podłoża (w zależności od rodzaju próbki) i przetwarzać niezwłocznie. Aspiraty z jamy nosowo-gardłowej należy transportować w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 72 godziny, zgodnie z lokalnymi i krajowymi przepisami dotyczącymi transportu materiałów patogennych. W przypadku długotrwałego transportu (ponad 72 godziny) zalecamy przesyłanie w temperaturze

wynoszącej -20°C . Jednakże wymaz z jamy nosowo-gardłowej na uniwersalnym podłożu transportowym (UTM, ang. Universal Transport Media) należy transportować zamrożone w temperaturze wynoszącej maksymalnie -20°C . Zaleca się używać świeżych próbek do testu. Próbkę można przechowywać w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$ przez maksymalnie 72 godziny (aspiraty z jamy nosowo-gardłowej) lub zamrożone w temperaturze -20°C lub najlepiej -70°C (na podłożu UTM) do w celu ich konserwacji. Należy unikać cykli zamrażania i rozmrażania, aby zapobiegać degradacji próbki i kwasów nukleinowych.

Próbki pochodzące z układu oddechowego trzeba pobierać, transportować i przechowywać zgodnie z odpowiednimi wytycznymi laboratoryjnymi. Szczegółowe informacje zawierają wytyczne CDC (katalog testów laboratoryjnych chorób zakaźnych CDC (2022)). Strona internetowa <https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/cdc-lab-tests.pdf> oraz wytyczne IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology (Poradnik dotyczący wykorzystania laboratoriów mikrobiologicznych w rozpoznawaniu chorób zakaźnych: aktualizacja z 2018 roku wydana przez Stowarzyszenie Chorób Zakaźnych Ameryki oraz Amerykańskie Stowarzyszenie na rzecz Mikrobiologii). *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

W przypadku korzystania z próbek płwociny można je testować zgodnie z poniższymi zaleceniami.

8.2. Przygotowanie próbki i ekstrakcja DNA

Przygotować próbkę zgodnie z zalecaniami podanymi w instrukcji użytkownika zastosowanego zestawu do ekstrakcji, BD MAX™ ExK™ TNA-3.

- 1 Pobrać pipetą 200 μl próbki do probówki z buforem BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube i zamknąć probówkę nasadką z podkładką. Zapewnić całkowite wymieszanie poprzez wirowanie próbki przy wysokiej szybkości przez 1 minutę. Przejść do obsługi systemu BD MAX™.

Należy pamiętać, że procedury przygotowania ekstrakcji właściwe dla danej aplikacji powinny zostać opracowane i zwalidowane przez użytkownika, a niektóre inne próbki mogą wymagać obróbki wstępnej. Przykładowo w przypadku próbek płwociny należy dodać do próbki acetylocysteiny (zaleca się użycie produktu N-Acetylo-L-cysteina nr kat. A7250 Merck KGaA) w stosunku 1:1 (tj. 250 μl płwociny i 250 μl acetylocysteiny o stężeniu 100 mg/ml), wymieszać, worteksując i podgrzewać przez 10 minut w temperaturze 95°C . Pobrać pipetą 200 μl wstępnie przetworzonej płwociny do probówki BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube i zamknąć probówkę nasadką z podkładką. Zapewnić całkowite wymieszanie poprzez wirowanie próbki przy wysokiej szybkości przez 1 minutę. Przejść do obsługi systemu BD MAX™.

8.3. Protokół PCR

Uwaga: Proszę zapoznać się ze szczegółowymi informacjami znajdującymi się w podręczniku dla użytkownika BD.

8.3.1. Tworzenie programu testu PCR dla zestawu VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Uwaga: Jeśli użytkownik utworzył już test dla zestawu VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, można pominąć punkt 8.3.1 i przejść bezpośrednio do punktu 8.3.2.

- 1) Na ekranie „Run” (Cykl) systemu BD MAX™ System wybrać kartę „Test Editor” (Edytor testów).
- 2) Kliknąć przycisk „Create” (Utwórz).
- 3) Wpisać nazwę testu (tj. VIASURE *Bordetella*) w oknie „Test Name” (Nazwa testu) na karcie „Basic Information” (Podstawowe informacje).
- 4) W rozwijanym menu „Extraction Type” (Typ ekstrakcji) wybrać „ExK TNA-3”.
- 5) W rozwijanym menu „Master Mix Format” (Format mieszaniny wzorcowej) wybrać „Type 5”.
 - a. Uwaga: Produkt można stosować razem z dodatkowym testem VIASURE dla BD MAX™. W takiej sytuacji należy wybrać „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)”.
- 6) W „Sample extraction parameters” (Parametry ekstrakcji próbki) wybrać „User defined” (Definiowane przez użytkownika) i dopasować objętość próbki do 350 µl.
- 7) W „Ct Calculation” (Obliczenie Ct) wybrać „Call Ct at Threshold Crossing”.
- 8) W przypadku korzystania z oprogramowania w wersji 5.00 lub nowszej oraz używania oznaczonych kodem kreskowym próbek zamkniętych folią, w polu „Custom Barcodes” (Niestandardowe kody kreskowe) należy wybrać następującą konfigurację:
 - a. Snap-In 2 Barcode (Kod kreskowy próbki 3): 1C (dotyczy próbki reakcyjnej z *Bordetella*).
 - b. Snap-In 3 Barcode (Kod kreskowy próbki 3): 11 (dotyczy próbki z buforem do rehydratacji Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 Barcode (Kod kreskowy próbki 4): inna próbka VIASURE reaction tube (inna folia), jeżeli wybrano format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Podwójna stężona, liofilizowana mieszanina wzorcowa MM z buforem rehydratacyjnym (typ 5)) (punkt 8.3.1).
- 9) W zakładce „PCR settings”(Ustawienia PCR) wpisać następujące parametry: „Channel Settings” (Ustawienia kanału), „Gains” (Naddatek) oraz „Threshold” (Wartość progowa) (Tabela 3).
 - a. Uwaga: Produkt można stosować razem z dodatkowym testem VIASURE dla BD MAX™. W takiej sytuacji Ustawienia PCR i Etapy testu należy uzupełnić dla obu pozycji 2 (zielony) oraz 4 (niebieski).

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

Tabela 12. Ustawienia PCR

Uwaga: Zaleca się ustawianie dla każdego kanału minimalnych wartości progowych podanych powyżej jako punktu startowego, ale ostateczne ustawienia musi ustalić użytkownik końcowy w trakcie interpretacji wyników w celu upewnienia się, że wartości progowe przypadają w obrębie fazy eksponencjalnej krzywych fluorescencji i powyżej wszelkich sygnałów tła. Wartości progowe dla różnych instrumentów mogą być różne ze względu na różne intensywności sygnału.

10) Na karcie „PCR settings” (Ustawienia reakcji PCR) należy wpisać też następujące parametry „Spectral Cross Talk” (Przesłuch widmowy) (tabela 4.).

		False Receiving Channel ((Falszywy kanał odbiorczy)					
		Channel (Kanał)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Kanał wzbudzenia)	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0	
	530/565	1.0	-	0.0	0.0	0.0	
	585/630	0.0	0.0	-	2.0	0.0	
	630/665	0.0	0.0	3.0	-	0.0	
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-	

Tabela 13. Parametry „Spectral cross-talk”

11) W zakładce „Test Steps” (Etapy testu) wpisać protokół PCR (Tabela 5)

Step Name (Nazwa etapu)	Profile Type (Typ profilu)	Cycles (Cykle)	Time (s) (Czas (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Wykrywanie)
Initial denaturation (Wstępna denaturacja)	Wstrzymanie	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturacja i hybrydyzacja/wydłużanie (gromadzenie danych))	2- Temperatura	45	10	95°C	-
			41	63°C	✓

Tabela 14. Protokół PCR

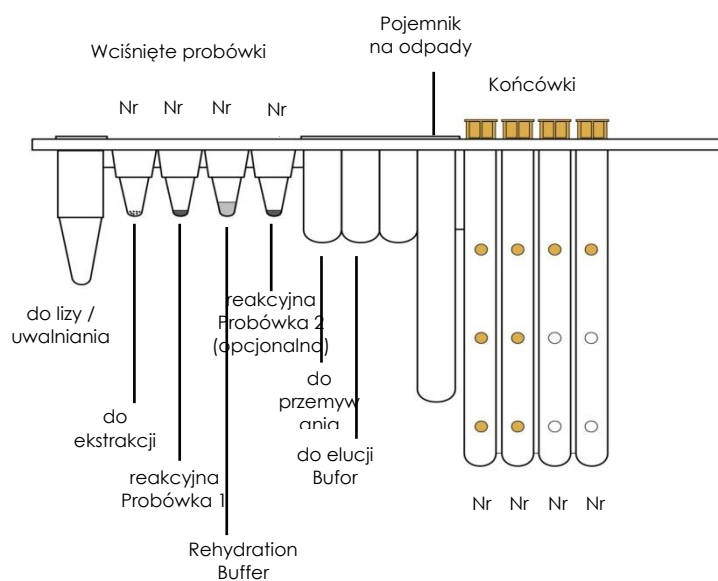
12) Kliknąć przycisk „Save test” (Zapisz test).

8.3.2. Ustawienie statywu BD MAX™

1) Dla każdej próbki, która ma być poddana testowi należy wyjąć jeden Unitized Reagent Strips (indywidualny pasek odczynnikowy) z zestawu BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Delikatnie stuknąć każdym paskiem o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że wszystkie płyny znajdują się na dnie probówek i załadować na statyw na próbki systemu BD MAX™ System.

- 2) Wyjąć potrzebną liczbę próbek do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (biała folia) z zaszetki ochronnej. Wcisnąć próbkę (próbówki) do ekstrakcji w odpowiadające jej (im) miejsca w pasku TNA (Pozycja 1, biały kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
- 3) Określić i oddzielić odpowiednią liczbę próbek reakcyjnych *Bordetella* (folia 1C) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (pozycja 2, zielony kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1).
 - a. Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
 - b. Aby prawidłowo przeprowadzić rehydratację, należy upewnić się, że liofilizowany produkt znajduje się na spodzie próbówki i nie przylega do górnej powierzchni próbówki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie próbówki.
 - i. Uwaga: Jeśli użytkownik wybrał format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Podwójna mieszanina wzorcowa skoncentrowana liofilizowana MM z buforem rehydratacji (typ 5)) (Punkt 8.3.1), należy określić , i oddzielić odpowiednią liczbę dodatkowych próbek reakcyjnych VIASURE (inna folia) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca w pasku (pozycja 4, niebieski kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1). Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
- 4) Wyjąć potrzebną liczbę próbek Rehydration Buffer tube (folia 11) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (Pozycja 3, brak koloru kodowego na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
 - a. Aby zapewnić prawidłowy transfer, należy upewnić się, że płyn znajduje się na spodzie próbówki i nie przylega do górnej powierzchni próbówki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że bufor znajduje się na spodzie próbówki.

Rysunek 1. Listwa odczynnikowa BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) z zestawu BD MAX™ ExK™ TNA-3.



8.3.3. Ustawienie przyrządu BD MAX™

- 1) Wybrać kartę „Work list” (Lista robocza) na ekranie „Run” (Cykl) oprogramowania systemu BD MAX™ System w.4.50A lub wyższej.
- 2) W rozwijanym menu „Test” wybrać VIASURE Bordetella (jeśli jeszcze nie utworzono, patrz Punkt 8.3.1).
- 3) Wybrać odpowiedni numer serii zestawu (można go znaleźć na zewnętrznym pudełku używanego zestawu do ekstrakcji) z rozwijanego menu (opcjonalnie).
- 4) Wpisać numer identyfikacyjny Sample Buffer Tube (próbówki z buforem próbki) do okna „Sample tube” (Probówka z próbką) w ramach „Worklist” (Listy roboczej), skanując kod paskowy skanerem lub wpisując ręcznie.
- 5) Wpisać identyfikator próbki lub pacjenta i (lub) okno „Accession” w ramach „Work List” (Listy roboczej) i kliknąć przycisk „Save” (Zapisz). Kontynuować aż do wpisania wszystkich Sample Buffer Tubes (próbek z buforem próbki). Upewnić się, że identyfikator próbki lub pacjenta oraz Sample Buffer Tubes (próbówki z buforem próbki) zostały dokładnie dopasowane.
- 6) Umieścić przygotowaną Sample Buffer Tube (próbówkę z buforem próbki) w statywie (statywach) BD MAX™ Rack(s).
- 7) Załadować statyw (statywy) do systemu BD MAX™ System (statyw A po lewej stronie systemu BD MAX™ System, a statyw B – po prawej).
- 8) Włożyć potrzebną liczbę wkładów BD MAX™ PCR Cartridge(s) do systemu BD MAX™ System.
- 9) Zamknąć drzwiczki systemu BD MAX™ System.
- 10) Kliknąć „Start Run” (Rozpocznij cykl), aby rozpocząć procedurę.

8.3.4. Raport BD MAX™

- 1) W menu głównym kliknąć przycisk „Results” (Wyniki).
- 2) Kliknąć dwukrotnie na swoim cyklu na liście lub wcisnąć przycisk „View” (Wyświetl).
- 3) Kliknąć „Print” (Drukuj), wybrać: „Run Details, Test Details and Plot...” (Szczegóły Cyklu, Szczegóły Testu i wykres...).
- 4) Kliknąć przycisk „Print or Export” (Drukuj lub eksportuj) na ekranie „Run Reports” (Raporty cyklu).

9. Interpretacja wyników

Szczegółowe informacje na temat analizowania danych podano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™ System.

Analiza danych jest przeprowadzana przez oprogramowanie BD MAX™ zgodnie z instrukcjami producenta. Oprogramowanie BD MAX™ zgłasza wartości Ct i krzywe amplifikacji dla każdego kanału detektora dla każdej badanej próbki w następujący sposób:

- wartość Ct wynosząca 0 wskazuje, że nie została przez oprogramowanie obliczona wartość Ct przy określonym progu (patrz Tabela 3). Krzywą amplifikacji dla próbki wykazującej wartość Ct „0” musi zostać sprawdzona ręcznie.
- Wartość Ct wynosząca -1 wskazuje, że nie nastąpił proces amplifikacji.

- Każdą inną wartość Ct należy zinterpretować w korelacji z krzywą amplifikacji i zgodnie z wytycznymi interpretacji próbki streszczonymi w Tabeli 6.

Należy sprawdzić sygnał kontroli wewnętrznej, aby sprawdzić, czy mieszanina do amplifikacji działa prawidłowo. Dodatkowo należy sprawdzić, czy nie ma raportu o awarii systemu BD MAX™ System.

Wyniki należy odczytywać i analizować za pomocą poniższej tabeli:

<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i> (475/520)	<i>B. holmesii</i> (585/630)	<i>B. paraptussis</i> (630/665)	Kontrola wewnętrzna (530/565)	Interpretacja
+	+	+	+/- ¹	Wykryto DNA <i>B. pertussis</i> i/lub <i>B. holmesii</i> i <i>B. paraptussis</i> ¹
-	-	-	+ ²	Nie wykryto DNA <i>B. pertussis</i> , <i>B. holmesii</i> i <i>B. paraptussis</i> ²
+	-	-	+/- ¹	Wykryto DNA <i>B. pertussis</i> , nie wykryto DNA <i>B. holmesii</i> i <i>B. paraptussis</i> ¹
+	+	-	+/- ¹	Wykryto DNA <i>B. pertussis</i> i/lub <i>B. holmesii</i> , nie wykryto DNA <i>B. paraptussis</i> ¹
+	-	+	+/- ¹	Wykryto DNA <i>B. pertussis</i> i <i>B. paraptussis</i> , nie wykryto DNA <i>B. holmesii</i> ¹
-	+ ³	-	+/- ¹	Wykryto DNA <i>B. holmesii</i> , nie wykryto DNA <i>B. pertussis</i> i <i>B. paraptussis</i> ¹
-	+ ³	+	+/- ¹	Wykryto DNA <i>B. holmesii</i> i <i>B. paraptussis</i> , nie wykryto DNA <i>B. pertussis</i> ¹
-	-	+	+/- ¹	Wykryto DNA <i>B. paraptussis</i> , nie wykryto DNA <i>B. pertussis</i> i <i>B. holmesii</i> ¹
-	-	-	- ²	Wynik nierozstrzygający (UNR, ang. Unresolved) uzyskany w obecności inhibitorów w reakcji PCR lub w razie wystąpienia błędu ogólnego (niezgłaszanego z kodem błędu) w trakcie przetwarzania próbki i/lub amplifikacji. ²
IND	IND	IND	IND	Nieokreślony wynik oznaczenia (IND, ang. Indeterminate). Awaria systemu BD MAX™ System. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku powiązanej z kodem błędu awarii urządzenia.
INC	INC	INC	INC	Niepełny wynik oznaczenia (INC, ang. Incomplete). Awaria systemu BD MAX™ System. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku nieprzeprowadzenia pełnej serii oznaczeń.

Tabela 15. Interpretacja próbki.

+: Amplifikacja wystąpiła

-: Amplifikacja nie wystąpiła.

1 Uznaje się, że próbka dała wynik dodatni, jeśli uzyskana wartość Ct jest ≤ 40 . Kontrola wewnętrzna (IC) może wykazywać sygnał amplifikacji lub go nie wykazywać. Czasami wykrywanie kontroli wewnętrznej (IC) nie jest konieczne ponieważ wysoka liczba kopii sekwencji docelowej może spowodować preferencyjną amplifikację kwasów nukleinowych swoistych dla sekwencji docelowej.

2 Uznaje się, że próbka dała wynik ujemny, jeśli próbka nie wykazuje sygnału amplifikacji w systemie detekcji, ale kontrola wewnętrzna jest dodatnia (wartość Ct jest ≤ 35). Hamowanie reakcji PCR można wykluczyć za pomocą amplifikacji kontroli wewnętrznej. W przypadku wyników nierozstrzygających (UNR), braku sygnału kontroli wewnętrznej w próbce, która dała wynik ujemny, zalecamy powtórzenie próby według podanych poniżej wskazań.

3 DNA *B. holmessi* jest wykrywane w dwóch różnych kanałach, 475/520 (FAM) i 585/630 (ROX), ale ze względu na wyższą czułość 585/630 (ROX) w próbkach dodatnich w okolicach LoD, istnieje możliwość uzyskania sygnału wyłącznie w obrębie tego kanału.

W przypadku ponownego uzyskania dwuznacznego wyniku zaleca się ponownie zapoznać się z instrukcją użycia i przeanalizować proces izolacji stosowany przez użytkownika w celu zweryfikowania prawidłowości wykonywania każdego etapu reakcji PCR oraz sprawdzenia parametrów. Należy również sprawdzić, czy uzyskano esowaty kształt krzywej oraz natężenie fluorescencji.

UWAGA: W próbówce z buforem próbki jest dostępna wystarczająca objętość do jednego powtórzenia testu. W przypadku przygotowanych próbek z buforem próbki BD Max™ przechowywanych w temperaturze 2–8°C lub 25°C ponowny test należy przeprowadzić w ciągu 24 godzin.

Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych, oraz innych testów diagnostycznych.

10. Ograniczenia stosowania testu

- Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych, oraz innych testów diagnostycznych.
- Choć ten test można stosować przy innych rodzajach próbek, zweryfikowano go w odniesieniu do wymazów i aspiratów z jamy nosowo-gardłowej. W przypadku korzystania z próbek płwociny można je testować zgodnie z powyższymi zaleceniami.
- Aby zapewnić dobrą wydajność testu, liofilizowany produkt powinien znajdować się na spodzie próbki, a nie przylegać do górnej powierzchni próbki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie próbki.
- Na ogół występujący na spodzie próbki inny od standardowego wygląd mieszaniny reakcyjnej w formie stabilnym (bez kształtu stożkowego, niejednorodny, mniejszy/większy i/lub w kolorze innym od białego) nie ma wpływu na funkcjonalność testu.
- Jakość testu zależy od jakości próbki; konieczna jest prawidłowa ekstrakcja z próbek klinicznych.
- Jest to test jakościowy i nie zapewnia on wartości ilościowych ani nie wskazuje liczby obecnych drobnoustrojów.
- Możliwe jest wykrycie niezwykle niskich poziomów sekwencji docelowych poniżej granicy wykrywania, ale wyniki mogą nie być powtarzalne.
- Istnieje możliwość uzyskania fałszywie dodatnich wyników z powodu skażenia krzyżowego przez próbki podejrzane o obecność *Bordetella* zawierające wysokie stężenia docelowej sekwencji DNA lub skażenia spowodowanego produktami PCR z poprzednich reakcji.
- Swoiste kombinacje starterów i sond do wykrywania sekwencji IS481, hIS1001 i pIS1001 wykorzystane w zestawie VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System nie wykazuje znaczących kombinowanych homologii z ludzkim genomem, ludzką mikroflorą, wirusem lub innymi drobnoustrojami układu oddechowego, co mogłoby prowadzić do przewidywalnych wyników fałszywie dodatnich.
- Wyniki fałszywie ujemne mogą wynikać z kilku czynników oraz ich kombinacji, w tym z powodu:
 - nieprawidłowego pobierania, transportu, przechowywania i/lub metod przechowywania próbek.
 - nieprawidłowych procedur przetwarzania (w tym izolacji DNA).

- DNA podczas transportu/przechowywania i/lub przetwarzania próbki.
 - mutacji lub polimorfizmów w regionach wiązania startera lub sondy, które mogą wpływać na wykrywanie nowych lub nieznanymi szczepów *Bordetella*.
 - Liczba drobnoustrojów w próbce poniżej granicy wykrywania testu.
 - obecności inhibitorów reakcji qPCR albo innych typów substancji interferujących.
 - nieprzestrzegania instrukcji użycia i procedury przeprowadzania testu.
- Wynik dodatni testu nie musi koniecznie oznaczać obecności żywych bakterii i nie sugeruje, że te bakterie są zakaźne czy też są przyczyną objawów klinicznych. Jednakże wynik dodatni wskazuje na obecność docelowych sekwencji *Bordetella*.
 - Jeśli badania diagnostyczne pod kątem innych chorób układu oddechowego są ujemne, a objawy kliniczne pacjenta i informacje epidemiologiczne sugerują możliwość zakażenia przez *B. pertussis*/ *B. parapertussis* i/lub *B. holmesii*, wówczas należy wziąć pod uwagę wynik fałszywie ujemny i rozważyć ponowne przetestowanie pacjenta.
 - Wynik ujemny nie wyklucza obecności DNA *B. pertussis*, *B. parapertussis* i/lub *B. holmesii* w próbce klinicznej. Jeśli obserwacje kliniczne, wywiad pacjenta i informacje epidemiologiczne sugerują zakażenie *B. pertussis*, *B. parapertussis* i/lub *B. holmesii*, należy rozważyć ponowne wykonanie badania próbki o zwiększonej objętości.
 - W przypadku uzyskania wyników nierozstrzygujących, nieokreślonych lub niepełnych przy użyciu zestawu VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System konieczne będzie powtórzenie testu. Wyniki nierozstrzygujące mogą być skutkiem obecności inhibitorów w próbce lub niewłaściwej rehydratacji w próbce z liofilizowaną mieszaniną reakcyjną. W razie awarii urządzenia uzyskuje się wyniki nieokreślone lub niepełne.

11. Kontrola jakości

Zestaw VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zawiera kontrolę wewnętrzną (IC) w każdej próbce reakcyjnej, potwierdzającą prawidłowe zastosowanie techniki.

12. Charakterystyka wydajnościowa

12.1. Czulość i swoistość kliniczna

Wydajność kliniczną zestawu VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System przetestowano przy użyciu klinicznych próbek wymazów i aspiratów z jamy nosowo-gardłowej oraz próbek wymazów i aspiratów, do których sztucznie dodano drobnoustroje. Które w obu przypadkach już wcześniej scharakteryzowano jako dodatnie lub ujemne w zakresie obecności *B. pertussis*, *B. parapertussis* i/lub *B. holmesii*.. Uzyskano następujące wyniki:

	Ośrodek	Rodzaj próbki	Przebieg działań	Element wykrywany
1	CerTest Biotec (Saragossa, Hiszpania)	Wymazy z jamy nosowo-gardłowej (Cerba Xpert)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>B. pertussis</i>
2		Aspiraty z jamy nosowo-gardłowej (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
3		Wymazy i aspiraty z jamy nosowo-gardłowej (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
4		Wymazy z jamy nosowo-gardłowej (Eurofins)		<i>B. pertussis</i>
5		Wymazy z jamy nosowo-gardłowej (Cerba Xpert + Eurofins + próbki symulowane)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>

Tabela 16. Ośrodek, rodzaj próbki, przebieg pracy i cel.

Wartości prawdziwie dodatnie i ujemne, wartości fałszywie dodatnie i ujemne, wartości czułości i swoistości dla zestawu VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System obliczono w odniesieniu do każdej analizy porównawczej w sposób przedstawiony w poniższej tabeli:

Ośrodek	Test porównawczy	Element wykrywany	PD	PU	FD	FU	Czułość	Swoistość
1	Test na krztusiec/parakrztusiec SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	33	100	0	1	0.971 (0.84 – 0.99)	1 (0.96 – 1)
2	Test na krztusiec/parakrztusiec SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis (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)
3	Test na krztusiec/parakrztusiec SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	76	0	1	0.5 (0.01-0.98)	1 (0.95-1)
		<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)
5	Wstępna charakterystyka*	<i>B. holmesii</i>	1	210	0	1	0.5 (0.01-0.987)	1 (0.98-1)
		<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)
4	Zwalidowana mieszanka wewnętrznych testów na krztusiec/parakrztusiec	<i>B. pertussis</i>	43	54	0	3	0.935 (0.821-0.986)	1 (0.966-1)
5	Wstępna charakterystyka*	<i>B. holmesii</i>	20	268	0	0	1 (0.832-1)	1 (0.986-1)
		<i>B. parapertussis</i>	12	276	0	0	1 (0.735-1)	1 (0.987-1)
		<i>B. pertussis</i>	98	186	0	4	0.961 (0.903-0.989)	1 (0.980-1)

Tabela 17. Wartości prawdziwie dodatnie i ujemne, wartości fałszywie dodatnie i ujemne, wartości czułości i swoistości, wartości dla zestawu VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

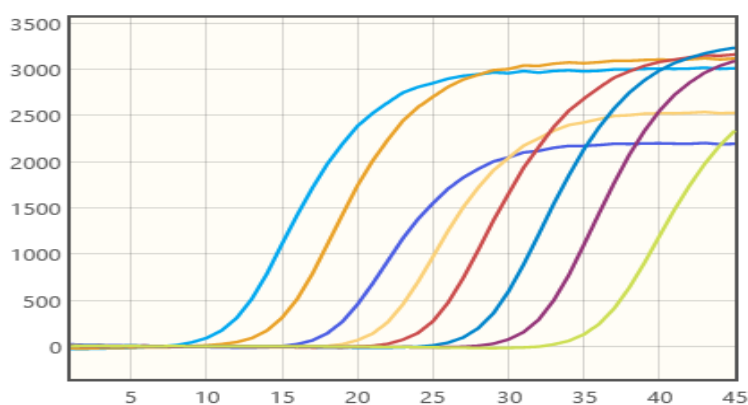
* Wstępna charakterystyka obejmuje test SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) oraz zwalidowaną mieszankę wewnętrznych testów na krztusiec/parakrztusiec do wykrywania *B. pertussis* i *B. parapertussis* oraz test SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm) do wykrywania *B. holmesii* w próbkach Cerba Xpert.

Wyniki wykazują wysoką zgodność w zakresie wykrywania *B. pertussis*, *B. parapertussis* i/lub *B. holmesii* przy użyciu zestawu VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

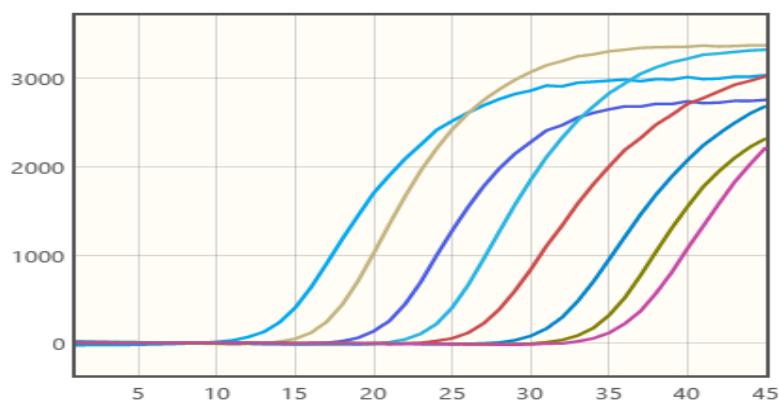
12.2. Czulość analityczna

Zestaw VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wykazuje granicę wykrywania (LoD) wynoszącą 1,2 CFU/ml próbki w przypadku *B. pertussis*, 4×10^{-2} CFU/ml próbki w przypadku *B. holmesii* i 12 CFU/ml próbki w przypadku *B. parapertussis*, przy odsetku wyników dodatnich $\geq 95\%$ w odniesieniu do wymazów z jamy nosowo-gardłowej.

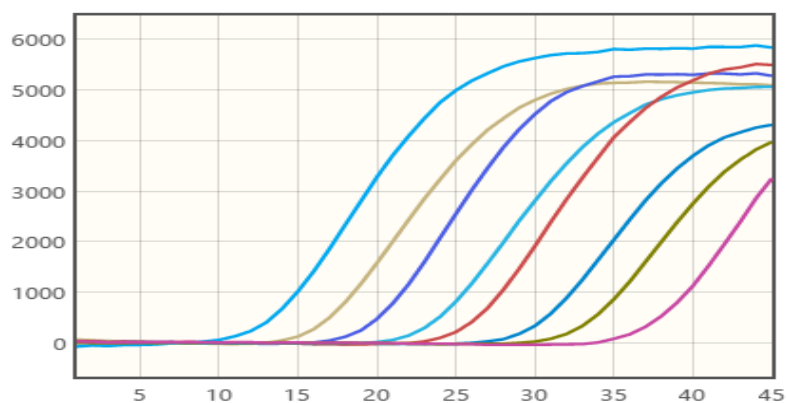
Ilustracja 5. Rozcieńczenia seryjne dla serii oznaczeń matrycy *Bordetella pertussis* ($7,07 \times 10^4$ - $7,07 \times 10^{-3}$ CFU na reakcję) w systemie BD MAX™ System (kanał 475/520 (FAM)).



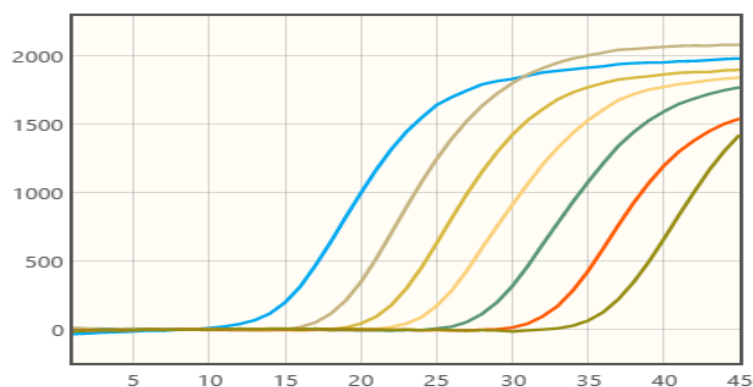
Ilustracja 6. Rozcieńczenia seryjne dla serii oznaczeń matrycy *Bordetella holmesii* ($2,42 \times 10^3$ - $2,42 \times 10^{-4}$ CFU na reakcję) w systemie BD MAX™ System (kanał 475/520 (FAM)).



Ilustracja 7. Rozcieńczenia seryjne dla serii oznaczeń matrycy *Bordetella holmesii* ($2,42 \times 10^3$ - $2,42 \times 10^{-4}$ CFU na reakcję) w systemie BD MAX™ System (kanał 585/630 (ROX)).



Ilustracja 8. Rozcieńczenia seryjne dla serii oznaczeń matrycy *Bordetella parapertussis* ($7,07 \times 10^4$ - $7,07 \times 10^{-2}$ CFU na reakcję) w systemie BD MAX™ System (kanał 630/665 (Cy5)).



12.3. Swoistość analityczna

Swoistość oznaczenia *Bordetella* potwierdzono, badając panel składający się z różnych mikroorganizmów powiązanych z chorobami układu oddechowego. Nie wykryto reaktywności krzyżowej w odniesieniu do żadnego z następujących przebadanych mikroorganizmów:

Badania reaktywności krzyżowej			
Ludzki adenowirus typu 1-5, 8, 15, 31, 40 i 41	-	Wirus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	- Legionella micdadei -
Bokawirus	-	Wirus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	- Serogrupa 1 Legionella pneumophila -
Bordetella bronchiseptica	-	Wirus grypy Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175	- Koronawirus MERS -
Chlamydia caviae	-	Wirus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	- Ludzki metapneumowirus A i B -
Chlamydia psittaci genotyp A i C	-	Wirus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	- Moraxella catarrhalis -
Chlamydophila pneumoniae, szczep CM-1	-	Wirus Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (Clade 3C2a.1)	- Mycoplasma pneumoniae -
Ludzki koronawirus 229E, OC43 i NL63	-	Wirus Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	- Ludzkie wirusy paragrypy 1, 2, 3 i 4 -
Haemophilus influenzae MinnA	-	Wirus Influenza B/Brisbane/60/2008	- Pneumocytis jirovecii typ A i g885652 -
Wirus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Wirus Influenza B/Florida/04/06	- Ludzki wirus syncytialny dróg oddechowych (RSV) Typ A i B -
Wirus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Wirus Influenza B/Phuket/3073/2013	- Ludzki rhinovirus -
Wirus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	Serowar 1 Legionella bozemanii	- Staphylococcus aureus subsp. aureus -
Wirus Influenza A/DE-SH/Reihenente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Legionella dumoffii	- Streptococcus pneumoniae Z022 -
Wirus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Legionella longbeachae	-

Tabela 18. Referencyjne patogenne mikroorganizmy używane w tym badaniu.











12.4. Reaktywność analityczna

Reaktywność zestawu VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System oceniano przy użyciu DNA wyodrębnionego z *B. pertussis*, *B. parapertussis* i *B. holmesii* jako matrycy, z uzyskaniem wyników dodatnich.

Bibliography/ Bibliografia

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

Symbols for IVD components and reagents/ Symbole dla elementów i odczynników IVD

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Urządzenie do diagnostyki w warunkach <i>in vitro</i>	 Keep dry Przechowywać w suchym miejscu	 Use by Użyć przed	 Manufacturer Producent	 LOT Batch code Kod serii
 i	Consult instructions for use Zapoznać się z instrukcją obsługi	 Temperature limitation Ograniczenie temperatury	 Contains sufficient for <n> test Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów	 UDI Unique Device Identification Niepowtarzalny identyfikator wyrobu	 REF Catalogue number Numer katalogowy

Trademarks

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

Change Control / Znaki towarowe		
Version No. / Wersja nr	Changes / Zmiany	Date
00	Original version / Wersja oryginalna.	22/11/2022

Table A 2. Control change table/ Tabla de control de cambios.

Revision: 22nd November 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