

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Bordetella
for BD MAX™ System



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

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIA
VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444204 / VS-BDT124

Table A 1. Reference for product to be used with the BD MAX™ System. / Referencia del producto para ser utilizado con el Sistema BD MAX™.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Las instrucciones de uso (IFU) se incluyen en el kit en versión inglés/español.

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.

NB 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.

Consult www.certest.es if your language is not on the list. Contact viasure@certest.es if your language is not on the website. / Consulte www.certest.es si su idioma no está en la lista. Contacte con viasure@certest.es si su idioma no está en la página web.

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

Nota: El usuario debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido como usuario y/o paciente cualquier incidencia grave relacionada con el producto.

Content

1.	Intended purpose	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, transport, and storage.....	8
8.2.	Sample preparation and DNA extraction	9
8.3.	PCR protocol	9
8.3.1.	Creating PCR test program for VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	9
8.3.2.	BD MAX™ Rack set up	11
8.3.3.	BD MAX™ Instrument set up	12
8.3.4.	BD MAX™ report	12
9.	Result interpretation	13
10.	Limitations of the test	14
11.	Quality control.....	15
12.	Analytical Performance characteristics	16
12.1.	Analytical Linearity	16
12.2.	Analytical sensitivity. Limit of Detection (LoD)	17
12.3.	Measuring range	17
12.4.	Accuracy	17
12.4.1.	Trueness (Veracity).....	17
12.4.2.	Precision.....	18
12.5.	Analytical specificity and reactivity	19
12.5.1.	Analytical Specificity	20
12.5.1.1.	Cross-reactivity and exclusivity assay.....	20
12.5.2.	Analytical reactivity	22
12.6.	Metrological traceability	22
13.	Clinical performance characteristics.....	22

Contenido

1.	Finalidad prevista	24
2.	Introducción y explicación	24
3.	Procedimiento	25
4.	Reactivos suministrados.....	25
5.	Material requerido y no suministrado	25
6.	Condiciones de transporte y almacenamiento	26
7.	Precauciones para el usuario	26
8.	Procedimiento del test	28
8.1.	Recogida, transporte y almacenamiento de muestras	28
8.2.	Preparación de la muestra y extracción de DNA	28
8.3.	Protocolo PCR	29
8.3.1.	Programación de la prueba VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	29
8.3.2.	Preparación de la gradilla del sistema BD MAX™	30
8.3.3.	Configuración del instrumento BD MAX™	32
8.3.4.	Informe BD MAX™	32
9.	Interpretación de resultados.....	32
10.	Limitaciones del test	34
11.	Control de calidad	35
12.	Características del funcionamiento analítico	35
12.1.	Linealidad analítica	35
12.2.	Sensibilidad analítica. Límite de Detección (LoD)	37
12.3.	Rango de medición.....	37
12.4.	Exactitud	37
12.4.1.	Veracidad (Sesgo)	37
12.4.2.	Precisión	38
12.5.	Especificidad y reactividad analítica	40
12.5.1.	Especificidad analítica.....	40
12.5.1.1.	Ensayo de reactividad cruzada y exclusividad	40
12.5.2.	Reactividad analítica.....	42
12.6.	Trazabilidad metrológica	43
13.	Características del funcionamiento clínico	43
	Bibliography/Bibliografía	45
	Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	45
	Trademarks.....	45

ENGLISH

1. Intended purpose

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated qPCR 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 qPCR, 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 simultaneous qualitative detection 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 verify if the amplification reaction works properly. If the PCR reaction is inhibited due to the presence of an artifact/inhibitor or because the reaction mix is incorrectly rehydrated, this control may become negative.

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. paraptussis</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. Keep the vial away from light.

The following table summarises the conditions for transport, storage and use of the overall kit and each component:

Component	Transport Conditions	Storage Conditions	In-use conditions
Entire VIASURE <i>Bordetella</i> Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	2-40°C during the shelf life stated in the label.	Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the label.	* See <i>in-use conditions</i> of each component.
<i>Bordetella</i> reaction tube (1C foil)		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the label. Once pouch is opened with the silica gel: 25°C±5°C for up to 28 days.	Immediate use at Room temperature.

Table 3. Summary of the conditions for transport, storage and use of the VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System and each component.

7. Precautions for users

- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR and *in vitro* diagnostic procedures.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Instructions for use of the VIASURE product and the BD MAX™ System User's Manual must be read carefully before using the VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Do not perform the assay until the information about procedures, safety precautions and limitations described therein have been understood.
- 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 to protect the master mix from sunlight. 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.
- 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.
- Make sure reaction tube and rehydration buffer tube are snapped into place securely during the BD MAX™ rack set up.

- 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.
- The certificate of analysis is not included with the device; however, it could be downloaded from Certest Biotec S.L. website (www.certest.es) in case of need.

8. Test procedure

8.1. Sample collection, transport, and storage

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 4°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 4°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's Infectious diseases laboratory test directory (2023). Website <https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/cdc-lab-tests.pdf>.

Please note: Specimen collection, transport, and storage conditions indicated above are suggested based on the recommendations for respiratory samples collected in transport medium and intended to be used for *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and/or *Bordetella holmesii* DNA detection, which appear in the referenced CDC's Infectious diseases laboratory test directory. Nevertheless, we recommend following laboratory guidelines, and/or microbiology laboratory policy manual for proper transport and preservation of samples.

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.

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:
- Snap-In 2 Barcode: 1C (concerning *Bordetella* reaction tube).
 - Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).
 - 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 4).
- a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

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

Table 4. 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 5), 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 5. Spectral cross-talk parameters.

- 11) In “Test Steps” tab, enter the PCR protocol (Table 6).

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	✓

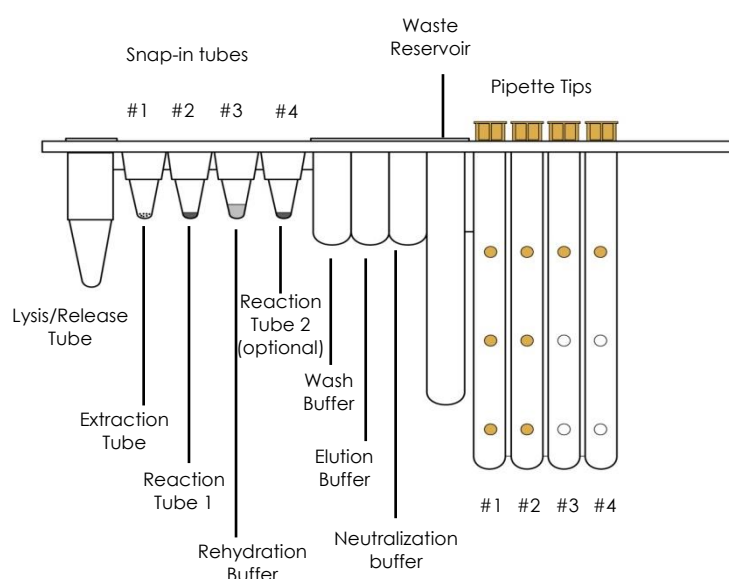
Table 6. PCR protocol.

- 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.
 - 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.
 - 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.
- 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.
 - 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 4). 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 7.

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 for patient's individual samples
+	+	+	+/- 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 7. 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. holmesei* 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.
- 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.
- Possible crosstalk might be observed in empty channels of the BD MAX™ System if there is no target to be detected, so it is required to select only the channels where these are amplified when interpretation of results is performed. Please contact to viasuresupport@certest.es for any queries.
- 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. It is not possible to correlate the Ct values obtained by PCR with the concentration of the sample as they depend on the thermal cycler used and the run itself.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- Please note the intended measurement range of the assay, as samples with concentrations above or below this range may give erroneous results.
- 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. The impact of antibiotics used to prevent the infection or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - The effect of interfering substances has only been evaluated for those indicated in section 12.5.1.1 of this instructions for use. Please, see this section to check the most common endogenous and exogenous substances that induce a total or partial interference of qPCR reaction. Other substances not indicated in this part could lead to erroneous results.
 - 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.
- A negative result does not preclude the presence of *B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii* DNA in a clinical specimen and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak bacterial levels during infections caused by *B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii* have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the pathogen.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and clinical observations, patient history and epidemiological information *B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii* infection, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- 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. Analytical Performance characteristics

12.1. Analytical Linearity

The linearity of the assay was determined by testing nasopharyngeal swab samples (ESwab™ -Copan-) spiked with serial dilutions containing a known concentration of quantified suspension of the targeted *Bordetella* strains (*B. pertussis*, *B. parapertussis* and/or *B. holmesii*). The concentrations of serial dilutions of each *Bordetella* strain were 1.2×10^7 CFU/mL to 1.2×10^{-1} CFU/mL for *Bordetella pertussis*; 1.2×10^7 CFU/mL to 12 CFU/mL for *Bordetella parapertussis*; and 4.1×10^5 CFU/mL to 4.1×10^{-3} CFU/mL for *Bordetella holmesii*.

Example of the amplification plot resulting from an assay is included below:

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).

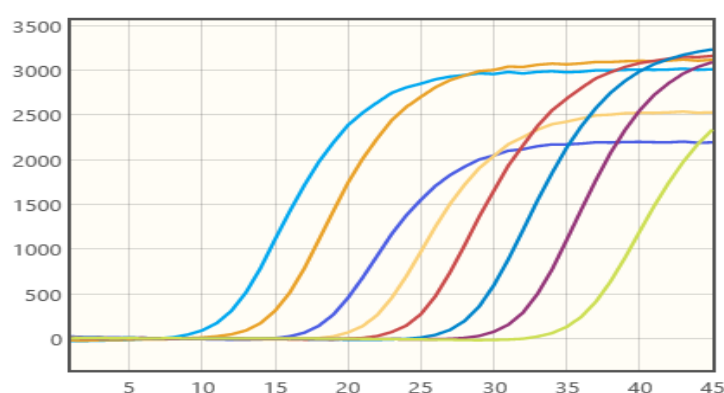


Figure 2. Dilution series of *Bordetella holmesii* (2.42×10^3 - 2.42×10^{-4} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

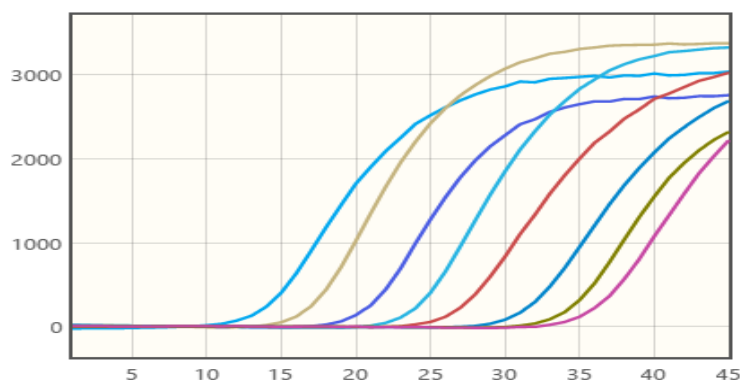


Figure 3. Dilution series of *Bordetella holmesii* (2.42×10^3 - 2.42×10^{-4} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

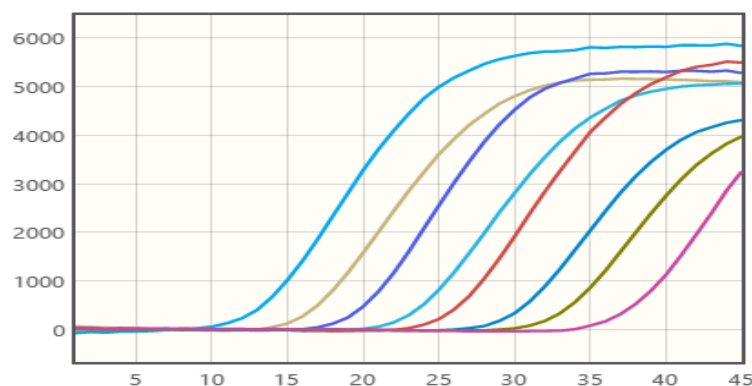
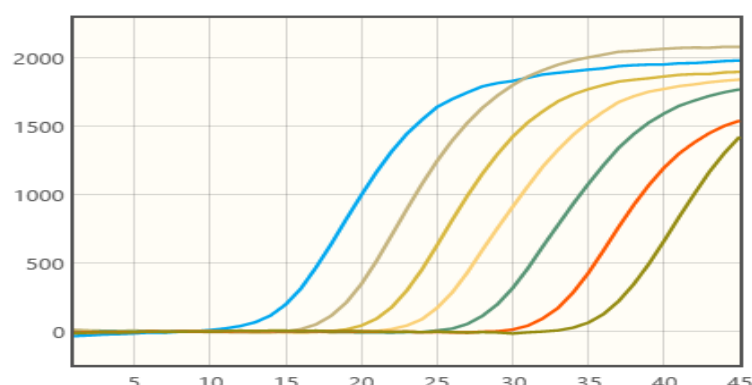


Figure 4. Dilution series of *Bordetella parapertussis* (7.07×10^4 - 7.07×10^{-2} CFU per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.2. Analytical sensitivity. Limit of Detection (LoD)

Analytical sensitivity or limit of detection (LoD) of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was analysed using nasopharyngeal swabs samples in ESwab™ (Copan), and in VTM (Viracell®). The results obtained showed that VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit of 1.2 CFU/mL of sample for *B. pertussis*, 4.1×10^{-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 (same LoD with both types of transport medium).

12.3. Measuring range

The measuring range of the assay was determined by testing a series of ten-fold dilutions containing a known concentration specific DNA belonging to the targeted *Bordetella* strains (*B. pertussis*, *B. parapertussis*, and/or *B. holmesii*). Results allowed to confirm the correct detection of the three targets from 1.2×10^7 CFU/mL for *B. pertussis* and *B. parapertussis*, and 4.1×10^5 CFU/mL para *B. holmesii* to the specific LoD of each target.

12.4. Accuracy

12.4.1. Trueness (Veracity)

The veracity of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was evaluated by testing reference material listed below:

Veracity of the test for *Bordetella pertussis* was evaluated against the following strains with a positive result:

- *Bordetella pertussis* (NCTC 10739).
- *Bordetella pertussis* (Bergey et al. 1923) Moreno-Lopez 1952, strain BORPER 79936 (CECT 7974).

Veracity of the test for *Bordetella parapertussis* was evaluated against the following strains with a positive result:

- *Bordetella parapertussis* (NCTC 5952).

Veracity of the test for *Bordetella holmesii* was evaluated against the following strains with a positive result:

- *Bordetella holmesii* (NCTC 12912).
- *Bordetella holmesii* Weyant et al. 1995 type strain (DSM 13416).

12.4.2. Precision

To determine the precision of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, intra-assay (repeatability), and inter-assay, inter-batch and inter-thermocycler assays (reproducibility) were performed.

Intra-assay, Repeatability

The repeatability was tested by analysing replicates of all samples in the same run using VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. A summary of results is shown in the table below.

Sample	Target	Channel	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
10xLoD Positive samples	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	30.58	0.16	0.52
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	34.62	0.92	2.65
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	32.10	0.54	1.69
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	33.10	0.71	2.15
2-3xLoD Positive samples	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	32.50	0.84	2.57
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	37.13	0.88	2.36
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	33.38	0.48	1.42
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	34.43	0.84	2.44
Negative sample	<i>B. pertussis</i> <i>B. holmesii</i> <i>B. parapertussis</i>	475/520 (FAM)/ 585/630 (ROX)/ 630/665 (Cy5)	Neg	n.a.	n.a.
	Internal Control	530/565 (HEX)	25.08	0.31	1.22

Table 8. Intra-assay repeatability results of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Inter-assay, Reproducibility

The inter-assay reproducibility was determined by testing replicates of the different samples on three different days by three different operators, using the VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. A summary of results is shown in the table below.

Sample	Target	Channel	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
10xLoD Positive samples	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	30.83	0.40	1.30
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	35.30	1.29	3.64
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	32.35	0.78	2.41
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	33.02	0.85	2.57
2-3xLoD Positive samples	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	32.38	0.42	1.29
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	36.61	1.38	3.77
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	33.42	1.04	3.12
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	34.93	0.80	2.28
Negative sample	<i>B. pertussis</i> <i>B. holmesii</i> <i>B. parapertussis</i>	475/520 (FAM)/ 585/630 (ROX)/ 630/665 (Cy5)	Neg	n.a.	n.a.
	Internal Control	530/565 (HEX)	25.18	0.68	2.71

Table 9. Inter-assay reproducibility results of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Inter-batch, Intermediate precision

The inter-batch intermediate precision values were determined with replicates of the different samples by using three batches of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. A summary of results is shown in the table below.

Sample	Target	Channel	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
10xLoD Positive samples	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	31.08	0.38	1.21
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	34.49	1.17	3.39
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	31.86	0.63	1.98
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	32.48	0.39	1.20
2-3xLoD Positive samples	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	32.89	0.37	1.13
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	37.09	1.36	3.67
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	33.93	0.57	1.69
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	34.54	0.65	1.88
Negative sample	<i>B. pertussis</i> <i>B. holmesii</i> <i>B. parapertussis</i>	475/520 (FAM)/ 585/630 (ROX)/ 630/665 (Cy5)	Neg	n.a.	n.a.
	Internal Control	530/565 (HEX)	24.01	0.48	1.99

Table 10. Inter-batch reproducibility results of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Inter-thermocycler (site-to-site)

The inter-thermocycler reproducibility values were determined with replicates of the same samples used for intra-assay, inter-assay and inter-batch, using the VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. These assays were run at two laboratory sites with two different BD MAX™ System (Model: 441916– Serial Number: CT0871 and Model: BD MAX CLINICAL – Serial Number: MX0040). A summary of results is shown in the table below.

Sample	Target	Channel	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
10xLoD Positive samples	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	30.82	0.32	1.04
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	34.37	0.84	2.44
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	32.16	0.48	1.49
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	32.95	0.52	1.57
2-3xLoD Positive samples	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	32.78	0.77	2.35
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	36.94	1.07	2.90
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	33.50	0.62	1.85
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	34.53	0.69	2.00
Negative sample	<i>B. pertussis</i> <i>B. holmesii</i> <i>B. parapertussis</i>	475/520 (FAM)/ 585/630 (ROX)/ 630/665 (Cy5)	Neg	n.a.	n.a.
	Internal Control	530/565 (HEX)	25.26	0.42	1.65

Table 11. Overall site-to-site reproducibility results of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

12.5. Analytical specificity and reactivity

The analytical specificity and reactivity were evaluated for the VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System *in silico* and using different starting material such as certified reference strains, certified reference RNA/DNAs and material from the EQAs programmes.

12.5.1. Analytical Specificity

12.5.1.1. Cross-reactivity and exclusivity assay

Cross-reactivity *in silico* analysis

The *in silico* Analytical Specificity was assessed by using reference sequences of different pathogens from NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), as well as bioinformatic tools such as BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and an in-house bioinformatic analysis software. Results described below only indicate sequences with a homology percentage higher than 80%. Aligned sequences with a percentage of alignment less than 80% of homology were considered unlikely to be detected. Results obtained demonstrated that **all analyzed sequences were below 80% of homology with *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella holmesii* primers and probe set**. Therefore, the VIASURE *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella holmesii* target designs of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System should not cause false positives in detecting *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella holmesii* when other organisms are present.

Cross-reactivity wet testing

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>Chlamydophila 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>Pneumocystis 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> 2022	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-		

Table 12. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

Interference and inhibitors of PCR

A study of interfering substances was performed to test the possible interfering effect of endogenous and exogenous substances on VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. A total of 20 potentially interfering substances were evaluated in triplicate with VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. All prepared samples were extracted using the BD MAX™ ExK TNA-3 on the BD MAX™ System in DUAL format, so that 6 replicates of each condition were analyzed. The potentially interfering substances were added to the negative nasopharyngeal pool matrix enriched with *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella holmesii* at a concentration of 3x LoD.

Positive Matrix Control and Negative Matrix Control (PMC and NMC, respectively) were used for the interpretation of results. PMC corresponds to the negative nasopharyngeal matrix pool spiked with *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella holmesii* at a concentration of 3x LoD without any interfering substance, whereas NMC corresponds to the negative nasopharyngeal matrix pool without spiking with any reference microorganisms nor interfering substance. The following results were obtained:

Substance Name	Concentration tested	Result
PMC	-	-
NMC	-	-
Azithromycin	1.1x10 ⁻² mg/mL	N.I
Benzocaine	3 mg/mL	N.I
Carbocysteine	5 mg/mL	N.I
Phenylephrine	0.33 mg/mL	N.I
Fluticasone	1.26x10 ⁻⁶ mg/mL	N.I
Galphimia glauca, luffa operculata, Sabbadilla	12.5 mg/mL	N.I
Genomic DNA	3.5x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Human mucus (Sputum)	1 % (v/v)	N.I
Albumin	10 mg/mL	N.I
Mucin	2.5 mg/mL	N.I
Mupirocin	1.5x10 ⁻³ mg/mL	N.I
N-acetylcysteine (NAC)	0.15 mg/mL	N.I
Oseltamivir	3.99x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I
Oxymetazoline hydrochloride	0.1 mg/mL	N.I
Nicotine	0.03 mg/mL	I
	7.5x10 ⁻³ mg/mL	N.I
	3.75x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Sodium chloride	0.09 mg/mL	N.I
Tobramycin	3.3x10 ⁻² mg/mL	N.I
Triglycerides	15 mg/mL	N.I
Whole Blood	1 % (v/v)	N.I
Zanamivir	3.3 mg/mL	N.I

Table 13. Potential interference substances. N.I: No reportable interfere / I: Interfere.

Different potentially interfering substances, both endogenous and exogenous, were tested on VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. The results obtained lead to conclude that, at the concentrations tested, no interference of any the evaluated substances is observed at the concentrations indicated for for each condition.

12.5.2. Analytical reactivity

Analytical Reactivity in silico assay

The *in silico* Analytical Reactivity (Inclusivity) of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was assessed by using a search and/or alignment tools as BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and an in-house bioinformatic analysis software. Only complete sequences have been used for the inclusivity analysis. Results are shown in the table below:

Microorganism	Gene	Number of analyzed sequences	Sequences detected of the <i>Bordetella</i> strain analyzed without mismatches	Fw mismatches	Rv mismatches	Probe mismatches
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>IS481</i>	125 (up to 01/12/2022)	100% (125/125)	-	-	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>pIS1001</i>	186 (up to 01/12/2022)	100% (186/186)	-	-	-
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>hIS1001</i>	140 (up to 01/12/2022)	100% (140/140)	-	-	-

Table 14. Number of mismatches and percentage of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella holmesii* sequences with or without mismatches as result of the alignment for the Inclusivity analysis.

To sum up, the inclusivity analysis shown a correct detection of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella holmesii* with the VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Analytical Reactivity wet testing

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.

12.6. Metrological traceability

This assay is not designed for measuring purposes.

13. Clinical performance characteristics

The clinical performance of VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using clinical 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 15. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV and likelihood ratio (LR) 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	PPV	NPV	LR+	LR-
1	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	33	100	0	1	97% (84% – 99%)	100% (96% – 100%)	1 (0.89 – 1)	0.99 (0.95 – 0.99)	193.3 (12.16 – 3072.7)	0.04 (0.01 – 0.13)
2	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	43	34	1	0	100% (91% – 100%)	97% (85% – 99%)	0.97 (0.88 – 0.99)	1 (0.90 – 1)	23.73 (4.95 – 113.70)	0.01 (0.001 – 0.187)
		<i>B. parapertussis</i>	28	48	0	2	93% (77% – 99%)	100% (92% – 100%)	1 (0.88 – 1)	0.96 (0.86 – 0.99)	90.10 (5.71 – 1423)	0.081 (0.03 – 0.268)
	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R- biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	76	0	1	50% (10% – 98%)	100% (95% – 100%)	1 (0.03 – 1)	0.99 (0.93 – 0.99)	77 (3.89 – 1524)	0.5 (0.162 – 1.561)
3	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	76	134	1	1	98% (93% – 100%)	99% (95% – 100%)	0.99 (0.93 – 0.99)	0.99 (0.96 – 0.99)	133.25 (18.9 – 939.24)	0.013 (0.002 – 0.092)
	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. parapertussis</i>	28	182	0	2	93% (77% – 99%)	100% (98% – 100%)	1 (0.87 – 1)	0.99 (0.96 – 0.99)	336.48 (21.08 – 5369.8)	0.081 (0.025 – 0.265)
	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R- biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	210	0	1	50% (10% – 98.7%)	100% (98% – 100%)	1 (0.17 – 1)	0.99 (0.97 – 0.99)	211 (10.6 – 4199.5)	0.5 (0.162 – 1.554)
4	Validated in-house mix pertussis/parapertussis assay	<i>B. pertussis</i>	43	54	0	3	93% (82.1% – 98.6%)	100% (96.6% – 100%)	1 (0.966 – 1)	1 (0.92 – 1)	0.95 (0.85 – 0.99)	101.81 (6.44 – 1609.2)
5	Initial characterization*	<i>B. pertussis</i>	98	172	0	4	96% (90.3% – 98.9%)	100% (97.9% – 100%)	1 (0.85 – 1)	1 (0.81 – 1)	37.17 (2.41 – 573.29)	0.022 (0.001 – 0.347)
		<i>B. parapertussis</i>	12	262	0	0	100% (73.5% – 100%)	100% (98.7% – 100%)	1 (0.73 – 1)	1 (0.87 – 1)	55.77 (3.56 – 872.35)	0.039 (0.003 – 0.593)
		<i>B. holmesii</i>	20	254	0	0	100% (83.2% – 100%)	100% (98.6% – 100%)	1 (0.83 – 1)	1 (0.83 – 1)	41 (2.65 – 634.61)	0.024 (0.002 – 0.378)

Table 16. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, predictive positive values (PPV), Predicted negative values (NPV) and the likelihood ratios (LR) 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.

ESPAÑOL

1. Finalidad prevista

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System es una prueba de qPCR automatizada diseñada para la detección cualitativa y diferenciación de DNA de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y/o *Bordetella holmesii*, en muestras respiratorias (hisopos y aspirados nasofaríngeos) procedentes de pacientes con sospecha de infección respiratoria por su profesional de la salud. El uso previsto del test es ayudar en la identificación de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y/o *Bordetella holmesii* en combinación con los signos y síntomas clínicos de los pacientes y los factores de riesgo epidemiológicos. Este test utiliza el sistema BD MAX™ para llevar a cabo la extracción automatizada del DNA y posterior qPCR utilizando los reactivos suministrados junto con los reactivos universales y desechables del sistema BD MAX™. El DNA es extraído de las muestras respiratorias y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii*.

2. Introducción y explicación

El género *Bordetella* se compone de 8 especies, 4 de las cuales se sabe que infectan a humanos: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*, y *B. bronchiseptica*. Sin embargo, la causa más importante de tosferina (pertussis) es la infección por *B. pertussis*, seguida de *B. parapertussis*. *B. holmesii* se ha aislado en pacientes con una enfermedad grave subyacente, mientras que *B. bronchiseptica* normalmente está restringida a animales, aunque en algunas ocasiones se ha aislado de pacientes inmunocomprometidos.

La tosferina es una enfermedad muy contagiosa, que, por lo general, se transmite de persona a persona al toser o estornudar, o al estar en contacto estrecho con personas infectadas compartiendo espacios comunes. La evolución clínica de la enfermedad se divide en tres etapas, las cuales incluyen el siguiente cuadro clínico: catarral (coriza, fiebre baja, tos leve y ocasional), paroxismal (paroxismos (accesos) de tos rápida, cianosis, vómitos y agotamiento) y convaleciente (recuperación gradual y tos paroxística menos persistente).

A pesar de la vacunación, la tosferina sigue siendo endémica en muchas zonas del mundo, por lo que se requiere un diagnóstico fiable para comenzar el tratamiento apropiado y la profilaxis de contactos, si así lo requiere. Dicho diagnóstico y tratamiento resulta particularmente necesario en el caso de la exposición de niños no vacunados a pacientes con tosferina, ya que para ellos se podría presentar como una enfermedad mortal. Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo PCR, y más recientemente la PCR a tiempo real, superan algunas de las limitaciones del cultivo y de los métodos serológicos empleados para el diagnóstico de infección por *Bordetella*. La mayoría de los test de PCR se basan en la detección de secuencias de inserción (IS) presentes en múltiples copias por genoma, aumentando la sensibilidad de los test PCR.

3. Procedimiento

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System está diseñado para la detección cualitativa y simultánea de DNA de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y/o *Bordetella holmesii*, en muestras respiratorias. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de dichas cepas de *Bordetella* se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibrida con una región conservada de las secuencias de inserción IS481 de *Bordetella pertussis/holmesii*, pIS1001 de *Bordetella parapertussis*, y hIS1001 de *Bordetella holmesii*.

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana, la cual se puede monitorizar en el equipo BD MAX™.

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene en cada tubo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un **control interno** para verificar si la reacción de amplificación funciona correctamente. Si la reacción PCR se inhibe por la presencia de un artefacto/inhibidor o porque el pocillo está incorrectamente rehidratado, este control puede resultar negativo.

Diana	Canal	Gen
<i>B. pertussis/holmesii</i>	475/520	Secuencia IS481
<i>B. holmesii</i>	585/630	Secuencia hIS1001
<i>B. parapertussis</i>	630/665	Secuencia pIS1001
Control Interno (CI)	530/565	-

Tabla 1. Diana, canal y genes.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 2:

Reactivo/Material	Descripción	Código de barras	Cantidad
<i>Bordetella</i> reaction tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Sellado 1C	2 sobres de 12 tubos transparentes
Rehydration Buffer tube	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Sellado 11	1 sobre de 24 tubos transparentes

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con Cat. N°. VS-BDT124 (444204).

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Equipo de PCR a tiempo real: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 o 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vórtex.
- Micropipetas (entre 2 y 1000 µL).
- Agua libre de nucleasas
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El kit puede usarse hasta 28 días después de abrir las bolsas de aluminio que contienen los tubos de reacción. Mantener el vial alejado de la luz.

La siguiente tabla resume las condiciones de transporte, almacenamiento y uso tanto para el kit completo como para cada componente:

Componente	Condiciones de transporte	Condiciones de almacenamiento	Condiciones "en-uso"
Kit completo VIASURE <i>Bordetella</i> Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta.	Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta.	* Ver condiciones "en-uso" de cada componente.
<i>Bordetella</i> reaction tube (1C foil)		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta. En un sobre abierto con el gel de sílice: 25°C±5°C hasta 28 días.	Uso inmediato a temperatura ambiente.

Tabla 3. Resumen de las condiciones de transporte, almacenamiento y uso para el producto VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System y cada uno de sus componentes.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- Las instrucciones de uso del producto VIASURE y el manual de usuario del sistema BD MAX™ se deben leer cuidadosamente antes de utilizar VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. No llevar a cabo el ensayo PCR hasta haber entendido la información sobre procedimientos, precauciones de seguridad y limitaciones descritas en ellas.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.

- No utilizar los reactivos si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los reactivos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los reactivos con el cierre zip inmediatamente después de cada uso para proteger la mezcla de reacción de la luz. Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Asegurarse de que el tubo de reacción y el tubo de tampón de rehidratación están bien encajados en su sitio durante la preparación de la gradilla del sistema BD MAX™.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test *VIASURE Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, el kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3, o cualquier otro reactivo adicional que se necesite para realizar el ensayo y el sistema BD MAX™ no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiológica o con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles, desechables, libres de RNasa/DNasa, y de barrera para aerosoles o de desplazamiento positivo. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos y las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Para evitar la contaminación del medio ambiente por amplicones, no rompa las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) después de usarlo. Los sellos de las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) están diseñados para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras, y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, el transporte, almacenamiento, manipulación y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad, debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el

medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (CLP), o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.

- Consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener información sobre advertencias, precauciones y procedimientos adicionales.
- El certificado de análisis no se incluye con este producto, sin embargo, se puede descargar de la web de CerTest Biotec S.L. (www.certest.es) en caso de necesidad.

8. Procedimiento del test

8.1. Recogida, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ha sido testado en muestras respiratorias (hisopos y aspirados nasofaríngeos). Otros tipos de muestras deben ser validadas por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras respiratorias se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los aspirados nasofaríngeos pueden ser transportados a 4°C hasta 72 horas, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 72 horas, se recomienda realizar el envío a -20°C o menos. Sin embargo, los hisopos nasofaríngeos en Medio de Transporte Universal (UTM) deberían ser transportados congelados a -20°C o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse a 4°C hasta 72 horas (aspirados nasofaríngeos) o pueden congelarse a -20°C o idealmente a -70°C (en UTM) para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras respiratorias deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas. Para más detalle, consulte "Infectious diseases laboratory test directory" de CDC (2023). Sitio web <https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/cdc-lab-tests.pdf>.

Nota: las condiciones de recogida, transporte y almacenamiento de muestras indicadas anteriormente se sugieren en base a las recomendaciones para muestras respiratorias recogidas en medios de transporte y destinadas a ser utilizadas para la detección de DNA de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y/o *Bordetella holmesii*, que aparecen en el directorio de pruebas de laboratorio para enfermedades infecciosas de CDC anteriormente referenciado. Sin embargo, recomendamos seguir las pautas del laboratorio y/o el manual de políticas del laboratorio de microbiología para el transporte y la conservación adecuados de las muestras.

8.2. Preparación de la muestra y extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra según las recomendaciones del fabricante, detalladas en el instructivo del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipetear 200 µL de muestra en un tubo de tampón de muestras del sistema BD MAX™ (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube) y cerrar el tubo con el tapón con septo. Asegúrese de que la mezcla es completa agitando la muestra en vórtex a alta velocidad durante 1 minuto. Proceder con BD MAX™ System Operation.

Nota: La aplicación de procedimientos de extracción específicos debe ser desarrollada y validada por el usuario y otro tipo de muestras pueden requerir una etapa de tratamiento previo.

8.3. Protocolo PCR

Nota: Por favor, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener instrucciones más detalladas.

8.3.1. Programación de la prueba VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: Si ya ha creado el test para VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, puede omitir el paso 8.3.1 e ir directamente al 8.3.2.

- 1) En la pantalla "Run" (Correr) del Sistema BD MAX™, seleccionar la pestaña "Test Editor" (Editor de prueba).
- 2) Hacer click en el botón "Create" (Crear).
- 3) En la pantalla de "Basic Information" (Información básica), en la ventana "Test Name" (Nombre del test), escribir el nombre del test: ej. VIASURE Bordetella.
- 4) En el menú desplegable "Extraction Type" (Tipo de extracción), seleccionar "ExK TNA-3".
- 5) En el menú desplegable "Master Mix Format" (Formato master mix), elegir "Type 5" (Tipo 5).
 - a. Nota: El producto puede ser usado junto con otros productos VIASURE para BD MAX™, en este caso seleccionar "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) En "Sample extraction parameters" (Parámetros de extracción de muestra) seleccionar "User defined" (Definido por usuario) y ajustar el volumen de la muestra a 350 µL.
- 7) En "Ct Calculation" (Cálculo Ct) seleccionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Análisis de Ct con cruce del umbral).
- 8) Si se está ejecutando la versión de software 5.00 o superior y se tienen tubos con sellado con código de barras, en "Custom Barcodes" (Códigos de barra personalizados) seleccionar la siguiente configuración:
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Código de barras): 1C (en relación a Bordetella reaction tube)
 - b. "Snap-In 3 Barcode" (Código de barras): 11 (en relación a Rehydration Buffer tube).
 - c. "Snap-In 4 Barcode" (Código de barras): otro tubo de reacción VIASURE (sellado diferente) si se elige el formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizada concentrada Master Mix dual con tampón de rehidratación – Tipo 5) (Sección 8.3.1).
- 9) En la pestaña "PCR settings" (Configuración PCR) introducir los siguientes parámetros: "Channel Settings" (Configuración de los canales), "Gains" (Ganancias) y "Threshold" (Umbral) (Tabla 4).

- a. Nota: El producto puede ser usado junto con otros productos VIASURE para BD MAX™, en este caso completar "PCR Settings" y "Test Steps" para ambas posiciones, 2 (verde) y 4 (azul).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Ganancia)	Threshold (Umbral)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	<i>B. pertussis/holmesii</i>	50	200	0	40
530/565 (HEX)	CI	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)	-	-	-	-	-

Tabla 4. PCR settings (Configuración PCR).

Nota: Se recomienda establecer como valor mínimo de partida de *threshold* los indicados anteriormente para cada canal. Sin embargo, el usuario final debe ajustar los valores de *threshold* finales durante la interpretación del resultado para garantizar que el *threshold* se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de *threshold* puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal.

- 10) En la pestaña "PCR settings" (Configuración PCR) introducir también los parámetros "Spectral Cross Talk" (Cross-talk espectral) (Tabla 5).

	Channel (Canal)	False Receiving Channel (Canal de falsa recepción)				
		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal de excitación)	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	-

Tabla 5. Parámetros "Spectral cross-talk" (Cross-talk espectral).

- 11) En la pestaña "Test Steps" (Pasos de la prueba), introducir el protocolo de PCR (Tabla 6).

Step Name (Nombre de la etapa)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tiempo (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Detección)
Initial denaturation (Desnaturalización inicial)	Choque térmico	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Desnaturalización y alineamiento/extensión (recogida de datos))	2-Temperaturas	45	10	95°C	-
			41	63°C	✓

Tabla 6. Protocolo PCR.

- 12) Hacer click en el botón "Save Test" (Guardar prueba).

8.3.2. Preparación de la gradilla del sistema BD MAX™

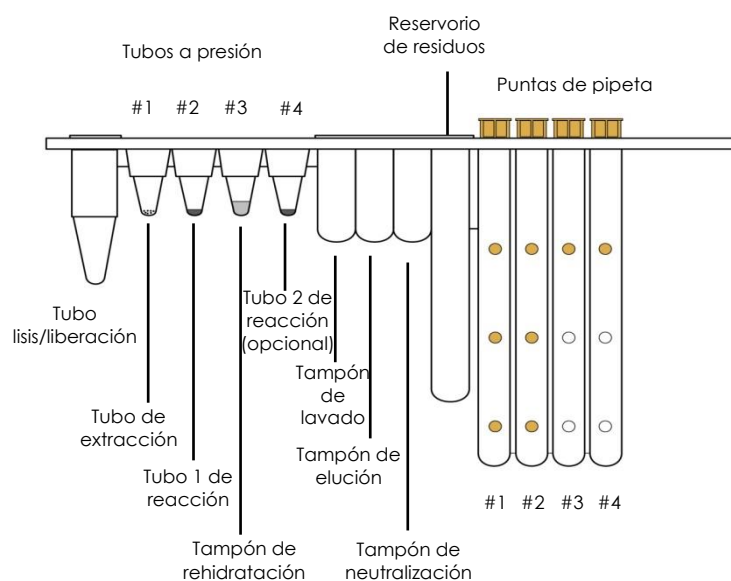
- Para cada muestra, coger una tira de reactivos individual del kit de extracción (BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit). Golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos y colocar la tira de reactivos en la gradilla del sistema BD MAX™.
- Determinar y separar el número de tubos de reactivo de extracción necesarios (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sello blanco)) de su bolsa protectora. Colocar el tubo de reactivo de extracción

(sello blanco) en su posición correspondiente dentro de la tira de reactivos TNA (Posición 1. Código de color blanco en la gradilla. Ver Figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar las bolsas protectoras con el zip.

- 3) Calcular y separar el número adecuado de *Bordetella* reaction tube (sello 1C) y colocarlos en su posición correspondiente de la tira (Posición 2. Código de color verde en la gradilla. Ver Figura 1).
 - a. Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.
 - b. Para llevar a cabo una rehidratación correcta, asegurarse que el producto liofilizado esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido al área superior del tubo o del sellado del tubo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.

Nota: Si elige el formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizada concentrada Master Mix dual con tampón de rehidratación – Tipo 5) (Sección 8.3.1), calcular y separar el número adecuado de tubos de reacción de los test VIASURE adicionales (sellado de color diferente) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 4. Código de color azul en la gradilla. Ver Figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.
- 4) Coger el número necesario de Rehydration Buffer tubes (sello 11) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 3. Sin código de color en la gradilla. Ver Figura 1).
 - a. Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres con el zip.
 - b. Para llevar a cabo una transferencia correcta, asegúrese de que el líquido esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido a la parte superior del tubo o al sello del mismo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.

Figura 1. Tira de reactivos individuales BD MAX™ TNA Reagent (TNA) del kit de extracción BD MAX™ Ex™ TNA-3 kit.



8.3.3. Configuración del instrumento BD MAX™

- 1) Seleccionar la pestaña "Work List" (Lista de trabajo) en la pantalla "Run" (Correr) utilizando el software v4.50A o uno superior del sistema BD MAX™.
- 2) En el menú desplegable "Test" (Test), seleccionar VIASURE *Bordetella* (si todavía no está creado, consultar la sección 8.3.1).
- 3) Seleccionar en el menú desplegable el número de lote del kit de extracción empleado (situado en el estuche exterior). Este paso es opcional.
- 4) Introducir el número de identificación/el código de barras del "Sample Buffer Tube" (Tubo de tampón de muestra) en la ventana de "Sample tube" (Tubo de muestra) dentro de la pestaña "Work List" (Lista de trabajo), ya sea escaneando el código de barras con el lector o mediante entrada manual.
- 5) Introducir "Specimen/Patient ID" (identificación de la muestra/paciente) y/o "Accession" (Acceso) en la pestaña "Work List" (Lista de trabajo) y haga clic en el botón "Save" (Guardar). Continúe hasta que se introduzcan todos los tubos de tampón de muestra. Asegúrese de que la identificación muestra/paciente y los tubos de tampón de muestra estén correctamente colocados.
- 6) Colocar el tampón de muestra preparado en la(s) gradilla(s) del sistema BD MAX™.
- 7) Colocar la(s) gradilla(s) en el sistema BD MAX™ (la gradilla A se encuentra en el lado izquierdo del sistema BD MAX™ y la gradilla B en el lado derecho).
- 8) Colocar el número necesario de BD MAX™ PCR Cartridges en el sistema BD MAX™.
- 9) Cerrar la puerta del sistema BD MAX™.
- 10) Presionar "Start Run" (Empezar a correr) para comenzar con el procedimiento.

8.3.4. Informe BD MAX™

- 1) En el menú principal, hacer click en el botón "Results" (Resultados).
- 2) Hacer doble click en la prueba incluida en la lista de ensayos o seleccionar la prueba y presionar el botón "view" (Ver).
- 3) Hacer click en el botón "Print" (Imprimir), seleccionar: "Run Details, Test Details and Plot..." (Detalles de ejecución, detalles de prueba y gráfica ...).
- 4) Hacer click en el botón "Print or Export" (Imprimir o Exportar) de la pantalla "Run Report" (Sacar informe).

9. Interpretación de resultados

Para una descripción detallada de cómo analizar los datos, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™.

El análisis de los datos se realiza con el software del sistema BD MAX™ de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. El software del sistema BD MAX™ proporciona los valores de Ct y muestra las curvas de amplificación para cada uno de los canales de detección de cada muestra que se analiza de la siguiente manera:

- Un valor de Ct de 0 indica que el software no calculó ningún valor de Ct con el umbral especificado (ver Tabla 4). Si la curva de amplificación muestra un "0" como valor de Ct, es necesario analizarla manualmente.
- Un valor de Ct de -1 indica que no ha habido proceso de amplificación.

- Cualquier otro valor de Ct debería de ser interpretado en correlación con la curva de amplificación y según las pautas de interpretación descritas en la Tabla 7.

Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. Además, comprobar que no hay ningún fallo del sistema BD MAX™.

Los resultados deben leerse y analizarse utilizando la siguiente tabla:

B. pertussis/ B. holmesii (475/520)	B. holmesii (585/630)	B. paraptussis (630/665)	Control Interno (530/565)	Interpretación de muestras individuales de pacientes
+	+	+	+/- ¹	DNA de B. pertussis y/o B. holmesii y B. paraptussis Detectado ¹
-	-	-	+ ²	DNA de B. pertussis, B. holmesii y B. paraptussis No Detectado ²
+	-	-	+/- ¹	DNA de B. pertussis Detectado, B. holmesii y B. paraptussis No Detectado ¹
+	+	-	+/- ¹	DNA de B. pertussis y/o B. holmesii Detectado, DNA de B. paraptussis No Detectado¹
+	-	+	+/- ¹	DNA de B. pertussis y B. paraptussis Detectado, DNA de B. holmesii No Detectado¹
-	+ ³	-	+/- ¹	DNA de B. holmesii Detectado, DNA de B. pertussis y B. paraptussis No Detectado¹
-	+ ³	+	+/- ¹	DNA de B. holmesii y B. paraptussis Detectado, DNA de B. pertussis No Detectado¹
-	-	+	+/- ¹	DNA de B. paraptussis Detectado, DNA de B. pertussis y B. holmesii No Detectado¹
-	-	-	- ²	Resultado no resuelto (UNR) debido a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR o a un problema general (no informado por un código de error) durante el procesamiento de la muestra y/o la etapa de amplificación.²
IND	IND	IND	IND	Resultado indeterminado (IND) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de un fallo del instrumento vinculado a un código de error.
INC	INC	INC	INC	Resultado de ensayo incompleto (INC) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de que no se complete la prueba.

Tabla 7. Interpretación.

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

1 Una muestra se considera positiva si el valor Ct obtenido ≤ 40 . El Control Interno (CI) puede mostrar o no una señal de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

2 Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno sí la presenta ($Ct \leq 35$). La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno. En caso de obtener un resultado sin resolver (UNR), ausencia de la señal de control interno en muestras negativas, se recomienda repetir el ensayo siguiendo las indicaciones que se detallan a continuación.

3 DNA de B. holmesii se detecta en dos canales diferentes, 475/520 (FAM) y 585/630 (ROX), pero debido a la mayor sensibilidad del canal 585/630 (ROX) en muestras positivas alrededor del LoD es posible obtener una señal solo en este canal.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la PCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

NOTA: Se dispone de volumen suficiente para repetir el análisis a partir del mismo tubo de buffer una vez añadida la muestra. Para tubos almacenados a 2-8°C o 5°C, el reanálisis deberá realizarse dentro de las próximas 24 horas.

El resultado de la prueba debe ser en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con hisopos y aspirados nasofaríngeos.
- Para obtener un buen rendimiento de la prueba, el producto liofilizado debe encontrarse en la parte inferior del tubo y no adherido a la parte superior del tubo o al sello de aluminio. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.
- Es posible observar fenómenos "crosstalk" en canales vacíos del sistema BD MAX™ si no hay diana que detectar, por lo que es necesario seleccionar solo los canales donde éstas amplifiquen cuando se lleve a cabo la interpretación de resultados. Para cualquier consulta contacte con viasuresupport@certest.es.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. No es posible correlacionar los valores Ct obtenidos en la PCR con la concentración de la muestra, ya que éstos dependen del termociclador utilizado y de la propia ejecución.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Tenga en cuenta el rango de medición previsto del ensayo, ya que las muestras con concentraciones por encima o por debajo de este rango pueden dar resultados erróneos.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con muestras sospechosas de *Bordetella*, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana, o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las combinaciones de cebadores y sondas específicas para la detección de las secuencias IS481, hIS1001 y pIS1001, empleadas en el test VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, no mostraron homologías combinadas significativas con el genoma humano, microflora humana u otros microorganismos respiratorios, que pudieran originar falsos positivos predecibles.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de nuevas o desconocidas cepas de *Bordetella*.

- Niveles de organismo en la muestra por debajo del límite de detección del ensayo.
 - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de los antibióticos utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma.
 - El efecto de sustancias interferentes solo se ha evaluado para aquellas indicadas en la sección 12.5.1.1 de estas instrucciones de uso. Por favor, consulte dicha sección para comprobar las sustancias exógenas y endógenas más comunes que inducen una interferencia total o parcial de la reacción qPCR. Otras sustancias no indicadas en este apartado pueden dar lugar a resultados erróneos.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de bacterias viables y no implica que estas bacterias sean infecciosas o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana de *Bordetella*.
 - Resultados negativos no excluyen la presencia de DNA de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y/o *B. holmesii* en una muestra clínica y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de bacterias durante las infecciones causadas por *B. pertussis*, *B. parapertussis* y/o *B. holmesii*. La recogida de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el patógeno.
 - Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades respiratorias son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por *B. pertussis*, *B. parapertussis* y/o *B. holmesii*, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
 - En el caso de obtener con VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System resultados no resueltos, indeterminados o incompletos, se requiere volver a testar de nuevo. Los no resueltos pueden deberse a la presencia de inhibidores en la muestra o debido a una rehidratación incorrecta del tubo de mezcla de reacción liofilizada. Si hay un fallo en el instrumento, se podrán obtener resultados indeterminados o incompletos.

11. Control de calidad

VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene un Control Interno (CI) en cada tubo de reacción que confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del funcionamiento analítico

12.1. Linealidad analítica

La linealidad del ensayo se determinó analizando muestras de hisopos nasofaríngeos (ESwab™ -Copan-) contaminadas con diluciones seriadas con una concentración conocida de una suspensión cuantificada de las cepas diana de *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* y/o *B. holmesii*). La concentración de las diluciones seriadas de cada cepa de *Bordetella* fue $1,2 \times 10^7$ CFU/mL a $1,2 \times 10^{-1}$ CFU/mL para *Bordetella pertussis*; $1,2 \times 10^7$ CFU/mL a 12 CFU/mL para *Bordetella parapertussis*; y $4,1 \times 10^5$ CFU/ml a $4,1 \times 10^{-3}$ CFU/mL para *Bordetella holmesii*.

A continuación se incluye un ejemplo de la gráfica de amplificación resultante de un ensayo realizado en el sistema BD MAX™:

Figura 1. Diluciones seriadas de *Bordetella pertussis* ($7,07 \times 10^4$ - $7,07 \times 10^{-3}$ CFU por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

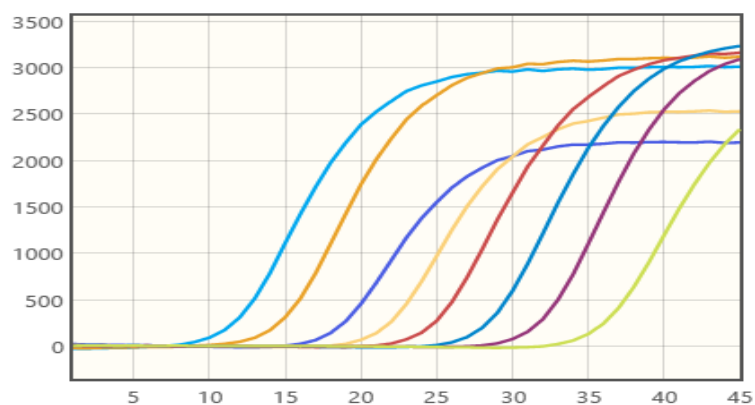


Figura 2. Diluciones seriadas de *Bordetella holmesii* ($2,42 \times 10^3$ - $2,42 \times 10^{-4}$ CFU por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

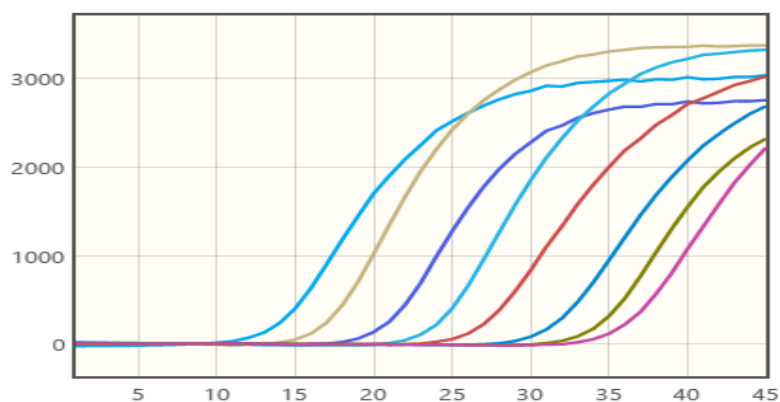


Figura 3. Diluciones seriadas de *Bordetella holmesii* ($2,42 \times 10^3$ - $2,42 \times 10^{-4}$ CFU por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 585/630 (ROX)).

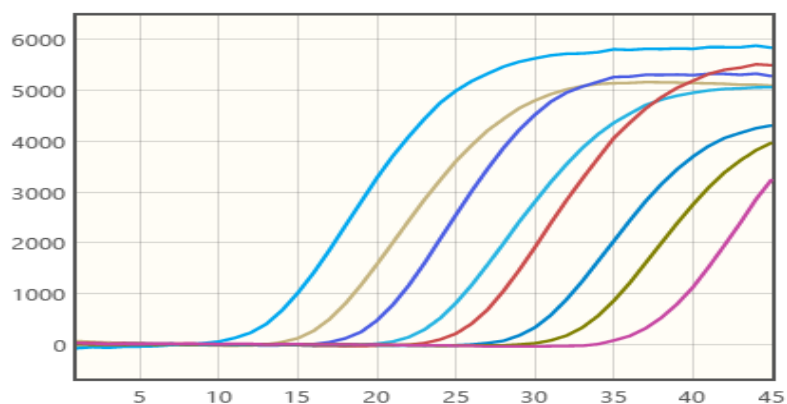
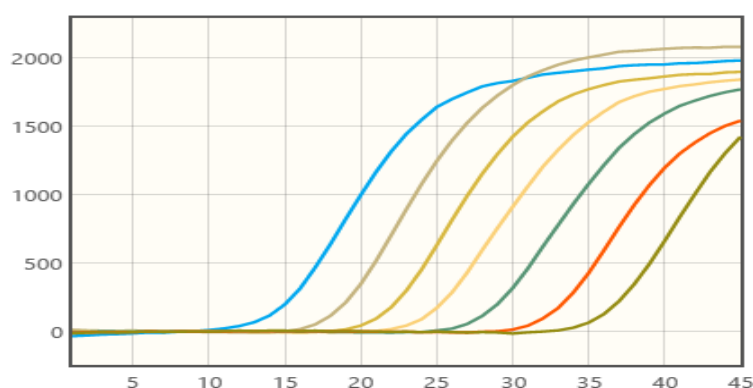


Figura 4. Diluciones seriadas de *Bordetella parapertussis* ($7,07 \times 10^4$ - $7,07 \times 10^{-2}$ CFU por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 585/630 (Cy5)).



12.2. Sensibilidad analítica. Límite de Detección (LoD)

La sensibilidad analítica o límite de detección (LoD) de VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ha sido analizada utilizando muestras de hisopos nasofaríngeos en medio ESwab™ (Copan) y VTM (Vircell®). Los resultados obtenidos muestran que VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tiene un límite de detección de 1,2 CFU/mL de muestra para *B. pertussis*, $4,1 \times 10^{-2}$ CFU/mL de muestra para *B. holmesii*, y 12 CFU/mL de muestra para *B. parapertussis*, con una tasa de positividad $\geq 95\%$, en muestras de hisopos nasofaríngeos (mismo LoD con los dos tipos de medio de transporte).

12.3. Rango de medición

El rango de medición del ensayo se determinó probando una serie de diluciones 1:10 que contenían una concentración conocida de DNA específico de las cepas diana de *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* y/o *B. holmesii*). Los resultados permitieron confirmar la correcta detección de las tres dianas en el rango de medición de 1.2×10^7 CFU/mL para *B. pertussis* y *B. parapertussis* y 4.1×10^5 CFU/mL para *B. holmesii* hasta la concentración LoD específica de cada diana.

12.4. Exactitud

12.4.1. Veracidad (Sesgo)

La veracidad de VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit fue evaluada frente al material de referencia listado a continuación:

La veracidad del test para *Bordetella pertussis* se ha evaluado frente a las siguientes cepas con un resultado positivo:

- *Bordetella pertussis* (NCTC 10739).
- *Bordetella pertussis* (Bergey et al. 1923) Moreno-Lopez 1952, cepa BORPER 79936 (CECT 7974).

La veracidad del test para *Bordetella parapertussis* se ha evaluado frente a las siguientes cepas con un resultado positivo:

- *Bordetella parapertussis* (NCTC 5952).

La veracidad del test para *Bordetella holmesii* se ha evaluado frente a las siguientes cepas con un resultado positivo:

- *Bordetella holmesii* (NCTC 12912).
- *Bordetella holmesii* Weyant et al. 1995 cepa tipo (DSM 13416).

12.4.2. Precisión

Para determinar la precisión de VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, se realizaron ensayos intra-ensayo (repetibilidad), inter-ensayo (reproducibilidad), inter-lote (precisión intermedia) e inter-termociclador (entre laboratorios).

Intra-ensayo, Repetibilidad

La repetibilidad se probó analizando réplicas de todas las muestras en la misma carrera utilizando VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente tabla.

Muestra	Diana	Canal	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestras positivas 10xLoD	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	30.58	0.16	0.52
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	34.62	0.92	2.65
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	32.10	0.54	1.69
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	33.10	0.71	2.15
Muestras positivas 2-3xLoD	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	32.50	0.84	2.57
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	37.13	0.88	2.36
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	33.38	0.48	1.42
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	34.43	0.84	2.44
Muestra negativa	<i>B. pertussis</i> <i>B. holmesii</i> <i>B. parapertussis</i>	475/520 (FAM)/ 585/630 (ROX)/ 630/665 (Cy5)	Neg	n.a.	n.a.
	Internal Control	530/565 (HEX)	25.08	0.31	1.22

Tabla 8. Resultados de repetibilidad intra-ensayo de VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Inter-ensayo, Reproducibilidad

La reproducibilidad se probó analizando réplicas de las diferentes muestras en tres días diferentes por tres operadores distintos con VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente tabla.

Muestra	Diana	Canal	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestra positiva 10xLoD	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	30.83	0.40	1.30
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	35.30	1.29	3.64
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	32.35	0.78	2.41
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	33.02	0.85	2.57
Muestra positiva 2-3xLoD	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	32.38	0.42	1.29
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	36.61	1.38	3.77
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	33.42	1.04	3.12
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	34.93	0.80	2.28
Muestra negativa	<i>B. pertussis</i> <i>B. holmesii</i> <i>B. parapertussis</i>	475/520 (FAM)/ 585/630 (ROX)/ 630/665 (Cy5)	Neg	n.a.	n.a.
	Internal Control	530/565 (HEX)	25.18	0.68	2.71

Tabla 9. Resultados de reproducibilidad inter-ensayo de VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Inter-lote, Precisión intermedia

Los valores de precisión intermedia inter-lote se determinaron analizando réplicas de las diferentes muestras mediante el uso de tres lotes de VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente tabla.

Muestra	Diana	Canal	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestra positiva 10xLoD	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	31.08	0.38	1.21
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	34.49	1.17	3.39
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	31.86	0.63	1.98
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	32.48	0.39	1.20
Muestra positiva 2-3xLoD	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	32.89	0.37	1.13
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	37.09	1.36	3.67
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	33.93	0.57	1.69
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	34.54	0.65	1.88
Muestra negativa	<i>B. pertussis</i> <i>B. holmesii</i> <i>B. parapertussis</i>	475/520 (FAM)/ 585/630 (ROX)/ 630/665 (Cy5)	Neg	n.a.	n.a.
	Internal Control	530/565 (HEX)	24.01	0.48	1.99

Tabla 10. Resultados de precisión intermedia inter-lote de VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Inter-termociclador, Entre laboratorios

Los valores de reproducibilidad inter-termociclador fueron determinados con réplicas de las mismas muestras utilizadas para el intra-ensayo, inter-ensayo y ensayo inter-lote, utilizando VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Los ensayos se realizaron en dos laboratorios con dos sistemas BD MAX™ diferentes (Modelo: 441916 - Número de serie: CT0871 y Modelo: BD MAX CLINICAL - Número de serie: MX0040). Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente tabla.

Muestra	Diana	Canal	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
10xLoD Positive samples	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	30.82	0.32	1.04
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	34.37	0.84	2.44
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	32.16	0.48	1.49
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	32.95	0.52	1.57
2-3xLoD Positive samples	<i>B. pertussis</i>	475/520 (FAM)	32.78	0.77	2.35
	<i>B. holmesii</i>	475/520 (FAM)	36.94	1.07	2.90
	<i>B. holmesii</i>	585/630 (ROX)	33.50	0.62	1.85
	<i>B. parapertussis</i>	630/665 (Cy5)	34.53	0.69	2.00
Negative sample	<i>B. pertussis</i> <i>B. holmesii</i> <i>B. parapertussis</i>	475/520 (FAM)/ 585/630 (ROX)/ 630/665 (Cy5)	Neg	n.a.	n.a.
	Internal Control	530/565 (HEX)	25.26	0.42	1.65

Tabla 11. Resultados de ensayo inter-termociclador de VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

12.5. Especificidad y reactividad analítica

La especificidad y reactividad analítica se evaluaron para el producto VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System *in silico*, y empleando diferentes materiales de partida como cepas de referencia certificadas, RNA/DNAs de referencia certificados, así como material procedente de programas EQA.

12.5.1. Especificidad analítica

12.5.1.1. Ensayo de reactividad cruzada y exclusividad

Reactividad cruzada: ensayo *in silico*

La especificidad analítica *in silico* se evaluó utilizando secuencias de referencia de diferentes patógenos del NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), así como herramientas bioinformáticas como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y un software propio de análisis bioinformático. Los resultados descritos a continuación sólo indican las secuencias con un porcentaje de homología superior al 80%. Las secuencias alineadas con un porcentaje de alineación inferior al 80% de homología se consideraron improbables de detectar. Los resultados obtenidos demostraron que **todas las secuencias analizadas presentaban un porcentaje de homología inferior al 80% con los cebadores y el conjunto de sondas de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii***. Por lo tanto, los diseños diana de VIASURE *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii* de VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System no deberían causar falsos positivos en la detección de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii* cuando hay otros organismos presentes.

Reactividad cruzada: ensayo experimental

La especificidad del ensayo de *Bordetella* fue confirmada testando un panel de diferentes microorganismos asociados a síntomas respiratorios. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados:

Pruebas de reactividad cruzada					
Adenovirus humano tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 y 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> serogrupo 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	-	Metapneumovirus humano A y B	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipo A y C	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> cepa CM-1	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus (Clade 3C2a.1)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Coronavirus humano 229E, OC43 y NL63	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	Virus Parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> Tipo A1 y g885652	-
Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Virus Respiratorio Sincitial (VRS) tipos A y B	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	Rinovirus humano	-
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>	-		

Tabla 12. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

Interferencias e inhibidores de PCR

Se realiza un estudio de sustancias interferentes para probar el posible efecto de interferencia de sustancias endógenas y exógenas en VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Se han evaluado un total de 20 sustancias potencialmente interferentes por triplicado con VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Todas las muestras preparadas fueron extraídas utilizando el kit BD MAX™ ExK TNA-3 en el sistema BD MAX™ en formato DUAL, de modo que se analizaron 6 réplicas de cada tipo. Las sustancias potencialmente interferentes se añadieron a la matriz nasofaríngea negativa enriquecida con *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii* con una concentración de 3x LoD.

Para la interpretación de los resultados se utilizaron el control de matriz positiva y el control de matriz negativa (PMC y NMC, respectivamente). El PMC corresponde a la matriz nasofaríngea negativa enriquecida con *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii* a una concentración de 3xLoD sin ninguna sustancia interferente, mientras que el NMC corresponde a la matriz nasofaríngea negativa sin enriquecimiento con ningún microorganismo de referencia ni sustancia interferente. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
PMC	-	-
NMC	-	-
Azithromycin	1.1x10 ⁻² mg/mL	N.I
Benzocaine	3 mg/mL	N.I
Carbocysteine	5 mg/mL	N.I
Phenylephrine	0.33 mg/mL	N.I
Fluticasone	1.26x10 ⁻⁶ mg/mL	N.I
Galphimia glauca, luffa operculata, Sabbadilla	12.5 mg/mL	N.I
Genomic DNA	3.5x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Human mucus (Sputum)	1 % (v/v)	N.I
Albumin	10 mg/mL	N.I
Mucin	2.5 mg/mL	N.I
Mupirocin	1.5x10 ⁻³ mg/mL	N.I
N-acetylcysteine (NAC)	0.15 mg/mL	N.I
Oseltamivir	3.99x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I
Oxymetazoline hydrochloride	0.1 mg/mL	N.I
Nicotine	0.03 mg/mL	I
	7.5x10 ⁻³ mg/mL	N.I
	3.75x10 ⁻³ mg/mL	N.I
Sodium chloride	0.09 mg/mL	N.I
Tobramycin	3.3x10 ⁻² mg/mL	N.I
Triglycerides	15 mg/mL	N.I
Whole Blood	1 % (v/v)	N.I
Zanamivir	3.3 mg/mL	N.I

Tabla 13. Sustancias potencialmente interferentes. N.I: Interferencias no notificables / I: Interferencia

Diferentes sustancias potencialmente interferentes, tanto endógenas como exógenas, han sido evaluadas con VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Los resultados obtenidos permiten concluir que, a las concentraciones evaluadas no se observan interferencias para ninguna de las sustancias evaluadas a las concentraciones indicadas para cada condición.

12.5.2. Reactividad analítica

Reactividad analítica: análisis in silico

La reactividad analítica *in silico* (inclusividad) de VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System se evaluó utilizando herramientas de búsqueda y/o alineación como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y un programa interno de análisis bioinformático. Sólo se utilizaron secuencias completas para el análisis de inclusividad. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Microorganismo	Gen	Número de secuencias analizadas	Secuencias detectadas de <i>Bordetella</i> sin discordancias	Discordancias Fw	Discordancias Rv	Discordancias Sonda
<i>Bordetella pertussis</i>	IS481	125 (hasta 01/12/2022)	100% (125/125)	-	-	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	pIS1001	186 (hasta 01/12/2022)	100% (186/186)	-	-	-
<i>Bordetella holmesii</i>	hIS1001	140 (hasta 01/12/2022)	100% (140/140)	-	-	-

Tabla 14. Número de discordancias y porcentaje de secuencias de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii* con o sin discordancias como resultado de las alineaciones para el ensayo de inclusividad.

En resumen, el análisis de inclusividad mostró una detección correcta de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii* con VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Reactividad analítica: evaluación experimental

La reactividad de VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System se evaluó frente al DNA extraído de *B. pertussis*, *B. parapertussis*, y *B. holmesii* como referencia, mostrando resultados positivos.

12.6. Trazabilidad metrológica

Este dispositivo no está destinado para fines de medición.

13. Características del funcionamiento clínico

El funcionamiento clínico de VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System fue evaluado utilizando muestras clínicas de hisopos nasofaríngeos, así como aspirados nasofaríngeos, ya caracterizados como positivos o negativos para *B. pertussis*, *B. parapertussis* y/o *B. holmesii*. Los resultados fueron los siguientes:

	Centro	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Diana
1	CerTest Biotec (Zaragoza, España)	Hisopos nasofaríngeos (Cerba Xpert)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>B. pertussis</i>
2		Aspirados nasofaríngeos (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
3		Hisopos y aspirados nasofaríngeos (Cerba Xpert)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>
4		Hisopos nasofaríngeos (Eurofins)		<i>B. pertussis</i>
5		Hisopos nasofaríngeos (Cerba Xpert + Eurofins + muestras simuladas)		<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i>

Tabla 15. Resumen de los centros, tipos de muestra, flujo de trabajo llevado a cabo durante las evaluaciones clínicas y dianas.

Los verdaderos valores positivos y negativos, los valores falsos positivos y falsos negativos, la sensibilidad, especificidad, PPV, NPV y cociente de verosimilitud (LR) para VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System se calcularon en relación a cada ensayo comparador, tal como se muestra en la siguiente tabla:

Centro	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV	LR+	LR-
1	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	33	100	0	1	97% (84% – 99%)	100% (96% – 100%)	1 (0.89 – 1)	0.99 (0.95–0.99)	193.3 (12.16–3072.7)	0.04 (0.01–0.13)
2	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	43	34	1	0	100% (91% – 100%)	97% (85% – 99%)	0.97 (0.88 – 0.99)	1 (0.90 – 1)	23.73 (4.95 – 113.70)	0.01 (0.001 – 0.187)
		<i>B. parapertussis</i>	28	48	0	2	93% (77%–99%)	100% (92%–100%)	1 (0.88–1)	0.96 (0.86 – 0.99)	90.10 (5.71 – 1423)	0.081 (0.03 – 0.268)
	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	76	0	1	50% (10%–98%)	100% (95%–100%)	1 (0.03 – 1)	0.99 (0.93 – 0.99)	77 (3.89 – 1524)	0.5 (0.162 – 1.561)
3	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. pertussis</i>	76	134	1	1	98% (93%–100%)	99% (95%–100%)	0.99 (0.93–0.99)	0.99 (0.96–0.99)	133.25 (18.9–939.24)	0.013 (0.002–0.092)
	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid)	<i>B. parapertussis</i>	28	182	0	2	93% (77%–99%)	100% (98%–100%)	1 (0.87–1)	0.99 (0.96–0.99)	336.48 (21.08–5369.8)	0.081 (0.025–0.265)
	SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm)	<i>B. holmesii</i>	1	210	0	1	50% (10%–98.7%)	100% (98%–100%)	1 (0.17–1)	0.99 (0.97–0.99)	211 (10.6–4199.5)	0.5 (0.162–1.554)
4	Validated in-house mix pertussis/parapertussis assay	<i>B. pertussis</i>	43	54	0	3	93% (82.1%–98.6%)	100% (96.6%–100%)	1 (0.966–1)	1 (0.92–1)	0.95 (0.85–0.99)	101.81 (6.44–1609.2)
5	Caracterización inicial*	<i>B. pertussis</i>	98	172	0	4	96% (90.3%–98.9%)	100% (97.9%–100%)	1 (0.85–1)	1 (0.81–1)	37.17 (2.41–573.29)	0.022 (0.001–0.347)
		<i>B. parapertussis</i>	12	262	0	0	100% (73.5%–100%)	100% (98.7%–100%)	1 (0.73–1)	1 (0.87–1)	55.77 (3.56–872.35)	0.039 (0.003–0.593)
		<i>B. holmesii</i>	20	254	0	0	100% (83.2%–100%)	100% (98.6%–100%)	1 (0.83–1)	1 (0.83–1)	41 (2.65–634.61)	0.024 (0.002–0.378)

Tabla 16. Valores positivo y negativo verdaderos, valores positivo y negativo falsos, sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (PPV), valores predictivos negativos (NPV) y cociente de verosimilitud (LR) para VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

* La caracterización inicial incluye el ensayo SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) y la mezcla interna validada pertussis/parapertussis para la detección de *B. pertussis* y *B. parapertussis*, y los ensayos SmartCycler Bordetella® pertussis/parapertussis assay (Cepheid) + RIDA®GENE Bordetella (R-biopharm) para la detección de *B. holmesii* en muestras Cerba Xpert.

Estos resultados muestran un alto nivel de concordancia para detectar *B. pertussis*, *B. parapertussis* y/o *B. holmesii* utilizando VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Bibliography/Bibliografía

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

Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

	In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		Unique Device Identification Identificación única de dispositivo		Catalogue number Número de referencia

Trademarks

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

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 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

Australian sponsor information /

Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road.

Información distribuidor en Australia:

Macquarie Park NSW 2113, Australia

New Zealand sponsor information /

Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive.

Información distribuidor en Nueva Zelanda:

Mt. Wellington Auckland 1060, New Zealand

Change Control / Control de cambios		
Version No. / Versión nº	Changes / Cambios	Date / Fecha
00	Original version / Versión original	19/05/2022
01	Principle of the procedure, transport and storage conditions, precautions for users, sample collection, transport and storage, sample preparation, limitations of the test, analytical performance characteristics and clinical performance characteristics sections have been updated. / Actualización de las secciones: procedimiento, condiciones de transporte y almacenamiento, precauciones para el usuario, preparación de la muestra, limitaciones del test, características del funcionamiento analítico y características del funcionamiento clínico.	12/05/2023

Table A 2. Control change table.

Revision: 12th May 2023

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