FR

CE 0123

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella

PCR POUR LA DÉTECTION QUALITATIVE ET LA DIFFÉRENCIATION DE BORDETELLA PERTUSSIS, BORDETELLA PARAPERTUSSIS, BORDETELLA BRONCHISEPTICA ET BORDETELLA HOLMESII DANS LES ÉCOUVILLONS NASOPHARYNGÉS OU LES PRÉLÈVEMENTS NASAUX PAR ASPIRATION.

Dispositif médical de diagnostic in vitro réservé à un usage professionnel.

REF 3150068_SEC01 / 3150068_SEC02

1 I DESTINATION

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella est un test de diagnostic moléculaire *in vitro* pour la détection qualitative par qPCR et la différenciation de 4 espèces bactériennes du genre *Bordetella* rencontrées en médecine humaine : *B. pertussis, B. parapertussis, B. bronchiseptica* et *B. holmesii*. Le test est une aide au diagnostic de la coqueluche réalisée à partir d'un extrait d'ADN obtenu à partir d'écouvillons nasopharyngés ou de prélèvements nasaux par aspiration. Ce test non automatisé est destiné au diagnostic *in vitro* en laboratoire par des professionnels uniquement.

2 I RÉSUMÉ CLINIQUE

Le genre Bordetella est composé de 9 espèces différentes. Les principales espèces responsables des maladies respiratoires chez l'homme sont :

- *B. pertussis* qui est l'agent responsable de la coqueluche et dont le réservoir est exclusivement humain,
- *B. parapertussis*, une espèce proche de *B. pertussis* mais qui ne sécrète pas de toxine *pertussique* et qui peut être responsable d'un syndrome de la coqueluche généralement moins grave,
- *B. bronchiseptica*, qui affecte un grand nombre de mammifères et qui est responsable chez l'homme d'infections respiratoires principalement chez les personnes immunodéprimées,
- et *B. holmesii*, qui peut également être responsable de symptômes respiratoires semblables à ceux de la coqueluche, voire d'une septicémie.

Chez les patients non vaccinés ou ceux dont le statut vaccinal contre la coqueluche est inconnu, qui présentent une toux persistante, le test Bordetella doit être effectué dès que possible afin d'instaurer un traitement antibiotique et d'isoler le patient afin de briser la chaîne d'infection.

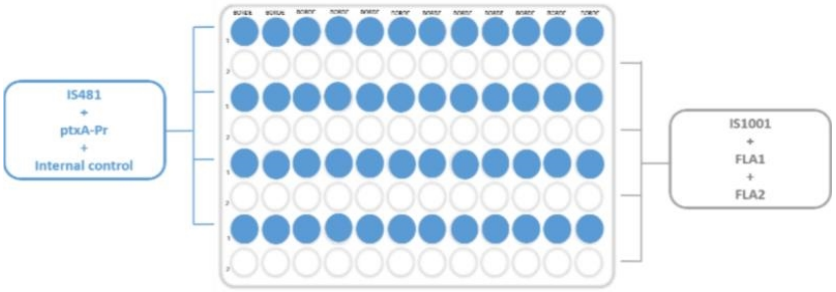
Le diagnostic de la coqueluche par PCR doit être effectué dans les trois premières semaines suivant l'apparition des symptômes.

3 I PRINCIPE DU TEST

Le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella est un test de diagnostic *in vitro* basé sur la technologie PCR (Polymerase Chain Reaction, ou encore ACP pour Amplification en Chaîne par Polymérase) en temps réel par hydrolyse d'une sonde fluorescente. Il est composé de microplaques de 96 puits préremplies de deux Master Mix prêts à l'emploi contenant des dNTP, du MgCl2, des amorces et des sondes fluorescentes, de l'enzyme Taq polymérase et du tampon de réaction.

Le test consiste en une étape de PCR multiplex réalisée dans un thermocycleur en temps réel, permettant l'amplification spécifique et la détection simultanée de cibles moléculaires portant les séquences d'intérêt : l'opéron TOX (séquence IS481), la région promotrice de la toxine pertussique (ptxA-Pr), la séquence d'insertion h-IS1001 spécifique à *B. holmesii*, et le gène de la flagelline spécifique à *B. parapertussis* et qui permet de la différencier de *B. bronchiseptica* en deux étapes (séquences FLA1 et FLA2), ainsi que le contrôle interne de procédure – (gène RNAse P humain) qui permet d'évaluer la qualité du prélèvement de l'échantillon biologique, et de valider les étapes d'extraction et de purification de l'ADN.

À cette fin, deux Master Mixes contenant des sondes marquées avec les fluorophores FAM, HEX et Cy5 sont utilisés.



Dans le Master Mix de couleur bleue contenu dans les puits marqués « 1 » sur la plaque préremplie, le fluorophore FAM est utilisé pour l'amplification spécifique de la séquence IS481, HEX pour la séquence ptxA-Pr et Cy5 pour le gène RNAse P. Dans le Master Mix clair contenu dans les puits marqués « 2 » sur la plaque, le fluorophore FAM est utilisé pour l'amplification spécifique de la séquence IS1001, HEX pour la séquence FLA1 et Cy5 pour la séquence FLA2.
La détermination de l'espèce Bordetella dépend de la combinaison de la détection de ces gènes, comme décrit au point 10.
L'augmentation du signal fluorescent n'est détectée que si la séquence cible complémentaire de la sonde amplifiée est présente dans l'échantillon. Le signal fluorescent est donc directement proportionnel à l'amplification de la cible pendant la phase d'amplification. Le Cq (cycle de quantification) correspond au nombre de cycles à partir duquel la fluorescence commence à augmenter de manière exponentielle par rapport à l'arrière-plan. Le kit peut être utilisé sur deux types d'échantillons :
- écouvillons nasopharyngés
- prélèvements nasopharyngés/endonasaux par aspiration

Avant leur utilisation avec le kit d'amplification BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella (point 9), les échantillons doivent d'abord être prélevés et traités selon les procédures détaillées aux points 7 et 8 en utilisant le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (réf 3150060 et références associées) et le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (réf 3150059 et références associées), ou traités pour obtenir des extraits d'ADN purifiés à l'aide d'un kit approprié.

4 I CONTENU DU KIT

Matériel inclus

- 2 microplaques de 96 puits divisibles préremplies avec les Master Mixes
- 1 tube de contrôle positif (CONTRÔLE +, bouchon rouge)
- 1 tube de contrôle négatif (CONTRÔLE -, bouchon vert)
- 2 sachets de barrettes de bouchons optiques, pour le scellement des microplaques

Matériel requis, mais non fourni

- Kit d'extraction de l'ADN
- Gants jetables non poudrés
- Pipettes et embouts à filtre
- Thermocycleur PCR en temps réel
- Microplaque PCR ou microtubes centrifugeuse

Le thermocycleur PCR utilisé pour le test doit présenter les principales caractéristiques suivantes :
• Système "ouvert"
• Tests PCR quantitatifs en temps réel.
• Bloc thermocycleur programmable

Référence	Bloc thermocycleur
3150068_SEC01	0,1 ml profil bas
3150068_SEC02	0,2 ml profil haut

• Source d'excitation : LED, lampe ou laser
• Jeux de filtres (longueurs d'onde d'excitation/émission) adaptés à la détection des fluorophores « rapporteurs » des sondes FAM, HEX et Cy5.

- Connexion à un ordinateur utilisant un logiciel d'analyse spécifique qui permet la récupération des données de fluorescence, les tests de quantification absolue et l'interprétation des résultats.

Le kit a été développé et validé avec les thermocycleurs PCR en temps réel suivants :

Référence	Thermocycleur
3150068_SEC01	Système de détection PCR en temps réel CFX96™ Touch (Bio-Rad) Système de détection PCR en temps réel CFX96™ Opus (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) Système QuantStudio 5 (Applied Biosystems) LightCycler 480 (Roche) Amplix-DT lite 48 (Technologie ADN)
3150068_SEC02	Système de détection PCR en temps réel CFX96™ Touch (Bio-Rad) Système de détection PCR en temps réel CFX96™ Opus (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) Système QuantStudio 5 (Applied Biosystems) Amplix-DT lite 48 (Technologie ADN)

Si un autre thermocycleur est utilisé, veuillez effectuer votre propre validation du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella en utilisant les contrôles fournis et/ou des échantillons respiratoires qualifiés avant d'utiliser le test.

5 I PRÉCAUTIONS

- Suivre attentivement cette notice d'utilisation. Le non-respect de l'une des instructions de cette notice d'utilisation peut nuire à la performance du test et avoir des conséquences néfastes.
- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire et porter des gants de laboratoire jetables non poudrés tout au long de la procédure de test.
- La gestion quotidienne d'un grand nombre d'échantillons et la grande sensibilité de la technique PCR peuvent, en l'absence de précaution, générer des résultats faussement positifs par contamination. Les opérations de pré-manipulation PCR, de post-manipulation PCR et d'extraction de l'ADN doivent donc être effectuées dans des pièces séparées. Porter des gants jetables dans chaque zone et les changer avant de passer d'une zone à l'autre.
- Le test et le bouchon sont à usage unique. Ne pas réutiliser. Ne pas ouvrir les tubes PCR à la fin du test.
- Ne pas utiliser le test si le film aluminium est ouvert ou endommagé. Une fois le film aluminium retiré, utiliser le test immédiatement.
- Ne pas utiliser le kit s'il est arrivé décongelé.
- Ne pas utiliser le kit en cas de rupture ou de fuite. En cas de dommage à l'emballage uniquement (pas de rupture ou de fuite), le kit reste utilisable.
- Protéger le kit de la lumière.
- Centrifuger les tubes avant de les ouvrir, en les ouvrant l'un après l'autre et en les refermant bien entre chaque pour éviter toute contamination.
- Le CTRL+ contient des quantités importantes de séquences d'ADN. Il peut donc potentiellement contaminer les autres composants du kit si les bonnes pratiques de biologie moléculaire ne sont pas respectées. Pour limiter ce risque de contamination, il est recommandé de stocker ce composant en dehors du kit lors de la première ouverture du kit.
- Les contrôles négatifs et positifs inclus dans le kit reproduisent les résultats obtenus avec des échantillons négatifs ou positifs respectivement. Ils doivent être utilisés à chaque nouveau test.

Pour s'assurer qu'il n'y a pas de contamination lors de la manipulation, il appartient à l'utilisateur d'inclure dans sa démarche qualité interne, à la fréquence choisie, un puits de contrôle négatif expérimental dans lequel 8 µl d'eau de qualité biologie moléculaire sont ajoutés au Master Mix.

- Lors de l'utilisation de contrôles négatifs et positifs avec une série de patients, il est recommandé de déposer d'abord le contrôle négatif, puis les échantillons de patients, et de terminer par le dépôt du contrôle positif.
- Jeter les pièces souillées ou les composants vides du kit dans une poubelle adaptée aux déchets biologiques.
- Le dispositif contient du matériel d'origine bactérienne ou animale et peut transmettre des agents infectieux et doit être manipulé avec une extrême prudence.

- Si, en relation avec l'utilisation de BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella, un décès ou une détérioration grave de la santé est survenu, il convient de le signaler au fabricant et à l'autorité compétente de votre pays. En cas de doute, le signaler.
- La fiche de données de sécurité est disponible sur demande. Un résumé de la sécurité et des performances sera disponible en ligne sur Eudamed.

6 I STOCKAGE DU RÉACTIF ET STABILITÉ

Le kit est expédié à l'état congelé. Les composants du kit doivent arriver congelés. Conserver le kit à une température de -20 °C. Dans ces conditions, les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du kit. Ne pas utiliser le kit ni aucun de ses composants après la date d'expiration. Protéger le kit et les réactifs de la lumière directe.
Les contrôles positif et négatif peuvent subir jusqu'à 15 cycles de congélation/décongélation.
Ne retirer ni ne décongeler que le nombre requis de barrettes de puits. Les barrettes étant prêtes à l'emploi, il n'y a pas lieu de les soumettre à des cycles répétés de congélation/décongélation.

7 I PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella permet l'amplification de l'ADN des 4 espèces de Bordetella. Le test peut être réalisé à partir d'un extrait d'ADN purifié provenant d'échantillons nasopharyngés (écouvillons) ou de prélèvements nasopharyngés/endonasaux par aspiration ; ou des mêmes échantillons prélevés avec le kit de prélèvement d'échantillon BIOSYNEX AMPLIQUICK (réf 3150060 et références associées) et traités avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (réf 3150059 et références associées).

- Prélever des échantillons nasopharyngés à l'aide d'écouvillons stériles déchargés dans des tubes stériles contenant un milieu de transport, ou ceux disponibles dans le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (réf 3150060 et références associées).
- Effectuer des prélèvements nasopharyngés/endonasaux par aspiration à l'aide d'un aspirateur de mucus conformément aux recommandations du fabricant. Dans le cas de l'utilisation du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (réf. 3150059), les prélèvements par aspiration doivent être directement utilisés sans passer par l'état de déchargement dans un milieux de transport.

Les échantillons déchargés dans le milieu de transport BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection peuvent être extraits immédiatement ou dans les 4 heures s'ils sont conservés à température ambiante, ou conservés entre 2 °C et 8 °C pendant 24 heures.

Le transport des échantillons cliniques doit respecter les réglementations locales pour le transport des agents infectieux.

8 I EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES

L'extraction des acides nucléiques doit être effectuée avant le protocole d'amplification à l'aide d'un système d'extraction approprié pour l'ADN bactérien. Merci de suivre les instructions du fabricant.
Le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella a été validé avec les kits d'extraction suivants :

- kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (réf. 3150059 et références associées). **BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis ne peut être utilisé qu'avec des échantillons nasopharyngés collectés avec BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection. Les prélèvements par aspiration peuvent être utilisés avec BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis sans déchargement dans un milieu de transport.**
- Kit QIAamp ADN Mini (Qiagen – Réf. 51306)
- NuceloMag Dx Pathogen (Macherey Nagel – 744215.4)
- Kit d'extraction d'ADN bactérien Amplix sur système automatisé Amplix (Technologie ADN - Réf. OP05006)

Si une autre méthode ou un autre kit d'extraction d'ADN est utilisé, veuillez effectuer votre propre validation de méthode du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella en utilisant des échantillons respiratoires qualifiés avant d'utiliser le test (ne pas utiliser les contrôles fournis).

Il n'est pas nécessaire d'extraire les contrôles positif et négatif avec le kit d'extraction d'acide nucléique. Si l'utilisation de l'ADN purifié est retardée, avant de l'ajouter au Master Mix, le stocker à 4 °C ou sur de la glace le jour du test.

9 I PROTOCOLE D'AMPLIFICATION

Pour le modèle de la plaque, veuillez-vous référer au point 3.

Il est recommandé de placer les bandes de master mix sur un support réfrigéré ou sur de la glace pendant l'ajout des échantillons.

1. Se munir d'une plaque cassable en bandes de 8 puits, et sélectionner le nombre de bandes nécessaires. Si moins d'une bande entière de 8 puits est nécessaire, la bande peut être coupée horizontalement à l'aide d'une paire de ciseaux.
2. Centrifuger les bandes pendant quelques secondes pour recueillir les gouttelettes sur les bords des puits ou sur le joint.
3. Retirer soigneusement le film d'aluminium et le jeter. Une fois le film aluminium retiré, utiliser la bande immédiatement.
4. Ajouter 8 µl d'échantillon de test ou de contrôle selon le modèle de la plaque.
5. Fermer les puits à l'aide des bouchons transparents fournis.
6. Centrifuger les bandes pendant quelques secondes.
7. Les placer dans le thermocycleur et exécuter le programme d'amplification suivant :

Programme PCR

Étape	Répétitions	Température	Durée	Acquisition
Activation TaqF	1x	95°C	3 min	-
Dénaturation	50x	95°C	10 sec	-
Hybridation / Élongation		58°C	45 sec	Oui

Entrer **20 µl** de volume de réaction dans le programme du thermocycleur.
Merci de vous référer aux instructions d'utilisation du thermocycleur utilisé pour les informations de programmation.

Réglage des canaux de détection :

Master mix de couleur bleue	
Cible	Fluorochrome
IS481	FAM
ptxA-Pr	HEX
RNAse P (contrôle de procédure)	Cy5
Master mix clair	
Cible	Fluorochrome
IS1001	FAM
FLA1	HEX
FLA2	Cy5

10 I ANALYSE DES DONNÉES ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

A. Critères de validation des études

Contrôle négatif :

La fluorescence émise doit être inférieure au seuil, à l'exception du canal Cy5 du master mix de couleur bleue. Il s'agit d'un indicateur d'amplification non spécifique. Si la fluorescence est supérieure au seuil, vérifiez la présence d'une courbe atypique. Dans le cas d'une courbe d'amplification, une contamination ou une erreur de distribution dans les microtubes est à envisager. Seul le contrôle interne RNAse P doit être amplifié.

Contrôle positif :

La valeur du contrôle positif doit de préférence être détectée avant 30 cycles (Cq ≤ 30). En l'absence d'amplification du contrôle positif, l'existence d'un problème d'amplification ou de détection de la fluorescence (thermocycleur défectueux ou instrument non adapté à la méthode) doit être envisagée.

Contrôle interne de l'amplification :

Le contrôle interne exogène RNAse P permet de s'assurer que les enzymes du master mix sont fonctionnelles et de valider les étapes de prélèvement et d'extraction des acides nucléiques. En effet, la courbe d'amplification du contrôle de procédure RNAse P doit être observée dans le canal Cy5 des puits contenant le Master Mix de couleur bleue.
Néanmoins, deux situations d'absence d'amplification du contrôle interne peuvent être observées :

- si les gènes cibles sont initialement présents dans l'échantillon avec un nombre élevé de copies, le contrôle interne peut ne pas être amplifié. Ce résultat est cohérent et n'invalide pas le test. Il doit être interprété comme un résultat positif malgré l'absence de signal du contrôle interne. Ce phénomène est le résultat d'une compétition d'amplification entre le contrôle interne et les cibles présentes en grand nombre de copies.
- Si les gènes cibles dans les canaux FAM et HEX ne sont pas amplifiés, ainsi que le contrôle interne dans le canal Cy5 du master mix de couleur bleue, aucun résultat ne peut être rendu. Cette situation met en évidence la présence d'inhibiteurs de la PCR. La PCR doit être répétée à partir de l'échantillon primaire et de préférence sur un extrait d'ADN.

B. Interprétation qualitative (positive ou négative)

Les signaux supérieurs au seuil **et correspondant visuellement à une courbe d'amplification PCR classique** sont considérés comme des résultats positifs.
Certains échantillons peuvent présenter des courbes atypiques qui ne sont pas caractéristiques des courbes d'amplification. Dans ce cas, le résultat ne doit pas être considéré comme interprétable et l'analyse de l'échantillon doit être répétée avec les contrôles.

Canaux de détection						Interprétation
Master mix de couleur bleue 1			Master mix clair 2			
FAM (IS481)	HEX (ptxA-Pr)	Cy5 (RNAseP)	FAM (IS1001)	HEX (FLA1)	Cy5 (FLA2)	
-	-	+	-	-	-	Contrôle négatif
+	+	+	+	+	+	Contrôle positif
+	+	+	-	-	-	Patient présentant un ADN spécifique de *B. pertussis*
+	+	-	-	-	-	
+	-	+	-	-	-	Patient présentant un ADN spécifique de *B. holmesii*
+	-	-	-	-	-	
+ Si Cq >30	-	+/-	-	-	-	Patient présentant un ADN de *Bordetella spp*
-	-	+	+	+	+	Patient présentant un ADN spécifique de *B. parapertussis*
-	-	-	+	+	+	
-	-	+/-	+ Si Cq >30	-	-	Patient présentant un ADN de *B. parapertussis ou de B. bronchiseptica*
+/-*	-	+	+/-*	-	+	Patient présentant un ADN spécifique de *B. bronchiseptica*
+/-*	-	-	+/-*	-	+	
-	-	-	-	-	-	Résultat invalide, refaire le test

*Le résultat dépend de la souche. En effet, selon la souche, certaines espèces peuvent être porteuses ou non du gène. Ainsi, la souche FR3523 de *B. bronchiseptica* est positive pour IS1001 alors que la souche de référence RB50 est négative pour ce gène.

Le Master Mix 1 (bleu) permet la détection de *B. pertussis* ou *B. holmesii* et le Master Mix 2 (incolore) la détection de *B. parapertussis*. La combinaison de l'expression des différents gènes détectés dans les deux puits permet d'identifier l'autre espèce *B. bronchiseptica*.

11 I PERFORMANCES

- **Sensibilité analytique**

La limite de détection (LoD) du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella est définie comme la concentration qui peut être détectée à 95 % au moins sur un échantillon spécifique d'ADN de *Bordetella*.

Limites de détection sur les échantillons d'ADN extraits par espèce :
La LoD_{95} sur l'ADN extrait est exprimée en nombre de copies d'ADN/µl. Les extraits d'ADN quantifiés ont été achetés à Vircell (Amplirun®). Les LoD ont été évaluées pour *Bordetella holmesii* sur le Master Mix 1 car il est positif pour le gène IS481, pour *Bordetella pertussis* sur le Master Mix 1 car il est positif pour les deux cibles IS481 et ptxA-Pr et pour *Bordetella parapertussis* sur le master mix 2 car il est positif pour IS1001 et les deux gènes FLA.

L'ADN quantifié de *B bronchiseptica* n'étant pas disponible sur le marché, la LoD_{95} n'a pas pu être évaluée pour cette espèce.
Les LoD_{95} de BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella sur l'ADN extrait ont été statistiquement déterminés pour chaque souche et séquence de gènes. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Souche de Bordetella	LoD_{95} (copies/µL)
Bordetella pertussis	IS481: 0,043 ptxA-P : 4,017
Bordetella parapertussis	IS1001: 0,265 FLA 1 : 18,418 FLA 2 : 16,033
Bordetella holmesii	IS481: 0,253

Limites de détection pour les échantillons prélevés avec le milieu de transport AMPLIQUICK Sample Collection et traités avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kit :
Les LoD ont été déterminées en effectuant une série de dilutions d'un échantillon de référence avec une concentration connue de CFU/mL dans des écouvillons nasopharyngés qualifiés et négatifs pour Bordetella, déchargés dans le milieu de transport BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection ou dans des échantillons de prélèvements nasaux par aspiration négatifs et traités avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kit.

Les LoD_{95} de BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella sur l'ADN traité avec BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis ont été statistiquement déterminés pour chaque souche et séquence de gènes. Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

Souche de Bordetella	LoD_{95} pour les écouvillons nasopharyngés				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA 4
Bordetella pertussis	22,837 CFU/ml	451,291 CFU/ml	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	38,264 CFU/ml	528,032 CFU/ml	429,806 CFU/ml
Bordetella holmesii	113,354 CFU/ml	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1791,123 CFU/ml

Souche de Bordetella	LoD_{95} pour les prélèvements nasaux par aspiration				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA 4
Bordetella pertussis	36,679 CFU/ml	2758,238 CFU/ml	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	52,0 CFU/ml	1535,5 CFU/ml	445,297 CFU/ml
Bordetella holmesii	87,674 CFU/ml	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1101,8 CFU/ml

- **Spécificité analytique**

Le modèle des oligonucléotides (amorces et sondes) a été validé *in silico* par alignement BLAST. La comparaison des séquences obtenues montre une détection spécifique des cibles BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella.
Aucune amorce ou sonde ne détecte d'ADN bactérien autre que celui des 4 espèces de Bordetella ciblées.

18 extraits d'ADN de souches qualifiées et référencées ont été testés.
11 extraits d'ADN provenant du Centre National de Référence français de la coqueluche et autres Bordetelloses, 3 séquences d'ADN de contrôle provenant d'une biobanque (Amplirun®,Vircell) et 4 cultures de souche bactérienne standard (Zeptometrix®).

	Contrôle de l'ADN		IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA1	FLA2
Biobanque	*ADN Bordetella pertussis*		+	+	-	-	-
	ADN Bordetella parapertussis		-	-	+	+	+
	ADN Bordetella holmesii		+	-	-	-	-
	Espèces	**Souche**	**IS481**	**ptxA-Pr**	**IS1001**	**FLA1**	**FLA2**
Culture standard	*Bordetella pertussis*	A639	+	+	-	-	-
	Bordetella parapertussis	A747	-	-	+	+	+
	Bordetella holmesii	F061	+	-	-	-	-
	Bordetella bronchiseptica	Z341	-	-	-	+	-
NRC	*Bordetella bronchiseptica*	RB50	+	-	-	-	+
		LAR	+	-	-	+	+
		FR3523	-	-	+	-	+
	Bordetella Petrii	KMBW	-	-	-	-	-
		FR5141	-	-	-	-	-
	Bordetella avium	CIP103348T	-	-	-	-	-
		FR6062	-	-	-	-	-
	Bordetella hinzii	CIP104527T	-	-	-	-	-
		FR5948	-	-	-	-	-
	Bordetella trematum	CIP105351T	-	-	-	-	-
		FR5853	-	-	-	-	-

Réactivité croisée

Un panel de 76 échantillons d'ADN et 38 échantillons d'ARN provenant d'une biobanque répertoriée dans les tableaux suivants a été testé avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella. Pour tous ces échantillons, aucune amplification des cibles d'intérêt n'a été observée.

ADN		
Acanthamoeba castellanii	*Escherichia coli (ETEC)*	*Neisseria meningitidis Sg A*
Adénovirus	*Escherichia coli (VTEC)*	*Neisseria meningitidis Sg B*
Adénovirus 41	*Francisella tularensis*	*Neisseria meningitidis Sg C*
Aspergillus fumigatus	*Gardnerella vaginalis*	*Papillomavirus type 16*
Bacillus cereus	*Giardia intestinalis*	*Papillomavirus type 18*
Bartonella henselae	*Haemophilus ducreyi*	*Parvovirus B19 (Plasmid)*
Bartonella Quintana	*Haemophilus influenzae*	*Rickettsia conorii*
Virus BK	*Helicobacter pylori*	*Salmonella enteritidis*
Borrelia afzelii	*Herpès simplex 1*	*Salmonella typhi*
Borrelia burgdorferi	*Herpès simplex 2*	*Staphylococcus aureus (MecA-)*
Brucella abortus	*Hhv-6*	*Staphylococcus aureus (MecA+)*
Campylobacter jejuni	*Hhv-8*	*Streptococcus agalactiae*
Candida albicans	*Klebsiella pneumoniae (NDM-1)*	*Toxoplasma gondii*
Candida auris	*Legionella pneumophila*	*Treponema pallidum*
Chlamydia trachomatis	*Leishmania chagasi*	*Trichomonas vaginalis*
Chlamydophila pneumoniae	*Leishmania infantum*	*Trypanosoma cruzi*
Chlamydophila psittaci	*Listeria monocytogenes*	*Ureaplasma parvum*
Clostridium difficile	*Moraxella catarrhalis*	*Ureaplasma urealyticum*
Coccidioides immitis	*Mycobacterium avium*	*Virus varicelle-zona*
Coxiella burnetii	*Mycobacterium intracellulare*	*Vibrio cholerae*
Cryptosporidium parvum	*Mycobacterium kansasii*	*Yersinia enterocolitica*
Enterococcus faecalis (VanB)	*Mycobacterium tuberculosis*	*Borrelia garinii*
Enterococcus faecium (VanA)	*Mycobacterium ulcerans*	*Cytomégalovirus*
Virus d'Epstein - Barr	*Mycoplasma genitalium*	*Streptococcus pneumoniae*
Escherichia coli (EAEC)	*Mycoplasma hominis*	
Escherichia coli (EIEC)	*Neisseria gonorrhoeae*	

ARN		
Coronavirus Oc43	*Para-influenza humain de type 1*	*Para-influenza 4 A*
Virus du Chikungunya	*Influenza A H1*	*Virus respiratoire syncytial (sous-type A)*
Coronavirus	*Virus de la grippe A H3*	*Virus respiratoire syncytial (sous-type B)*
Coronavirus SARS (2003)	*Grippe A H5*	*Rhinovirus*
Coxsackie de type A6	*Virus de la grippe B*	*Rotavirus*
Coxsackie de type B1	*Rougeole*	*Rubella*
Coxsackie de type B5	*Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient ou MERS-CoV*	*SARS-CoV-2*
Virus de la Dengue de type 1	*Oreillons*	*Virus de la méningoencéphalite à tiques*
Virus de la Dengue de type 2	*Norovirus*	*Virus du Nil occidental*
Virus de la Dengue de type 3	*Nouvelle grippe A H1n1*	*Virus de la fièvre jaune*
Virus de la Dengue de type 4	*Para-influenza de type 1*	*Virus Zika*
Echovirus 5	*Para-influenza de type 2*	*Virus Zika (lignée asiatique)*
Entérovirus 68	*Para-influenza de type 3*	

- **Étude des interférences**

La présence d'inhibiteurs de la PCR dans l'échantillon peut induire une interférence positive ou négative sur les résultats du test. La présence de divers inhibiteurs dans les échantillons a été testée.

Sprays nasaux

Aucune interférence positive ou négative n'a été constatée en chargeant jusqu'à 10 % dans le milieu de transport BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection d'une matrice de sécrétions nasopharyngées traitées avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis, avec les substances suivantes :

Produit	Substance active
Nasacort	Triamcinolone acétonide
Aturgyl	Oxymétazoline
Béconase	Dipropionate de béclométasone
Budésonide	Budésonide
Mométasone	Mometasone
Avamys	Furoate de fluticasone
Fixorinox	Propionate de fluticasone

Sang

La présence de sang dans les écouvillons nasopharyngés peut induire une interférence positive ou négative sur le résultat du test PCR. Notre étude montre que des concentrations de sang allant jusqu'à 1 % n'interfèrent pas avec la réaction PCR lorsque le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella est utilisé avec les kits BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection et BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis. La sensibilité diminue à partir d'une concentration de sang de 2 %. Par conséquent, la concentration de sang dans l'échantillon ne doit pas dépasser 1 %.

- **Performances cliniques**

Les performances cliniques ont été déterminées sur 146 échantillons provenant de 4 laboratoires différents et qualifiés de positifs ou négatifs pour *B. pertussis* ou *B. parapertussis* à l'aide de tests PCR marqués CE et référencés par le Ministère de la Santé français.

Ces tests permettent l'identification de ces deux souches par l'amplification des gènes IS481 et IS1001, également présents dans les souches *B. holmesii* et *B. bronchiseptica*.

Les échantillons ont été qualifiés avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella sur des extraits d'ADN purifiés ou après traitement avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis.

	Nombre d'échantillons	*B. pertussis*		*B. parapertussis*		*Co-infections*	*Négatif pour Bordetella*
		+	-	+	-		
Laboratoire 1	63	58	1	8	51	8*	5
Laboratoire 2	12	12	0	2	10	2	0
Laboratoire 3	31	0	0	0	0	0	31
Laboratoire 4	40	0	0	0	0	0	40

*Parmi les 8 échantillons qualifiés de positifs pour *B. pertussis* et *B. parapertussis* du laboratoire 1, aucune co-infection n'a été confirmée en utilisant le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella ainsi qu'un autre kit marqué CE sur le marché.

Le tableau de contingence ci-dessous montre la performance du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK sur des échantillons après extraction/purification de l'ADN à l'aide d'un kit commercial :

		Référence PCR	
		Positif	Négatif
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positif	69	0
	Négatif	1	76

Sensibilité : 98,57% (IC à 95 % : 92,30 % à 99,96 %) **Spécificité : 100 %** (IC à 95 % : 95,26 % à 100 %)

Le tableau de contingence ci-dessous montre la performance de BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella sur les échantillons traités avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis :

		Référence PCR	
		Positif	Négatif
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positif	66	0
	Négatif	4	76

Sensibilité : 94,29 % (IC à 95 % : 86,01 % à 98,42 %) **Spécificité : 100 %** (IC à 95 % : 95,26 % à 100 %)

Pour cette étude, nous n'avons pas eu accès à des échantillons cliniques de patients positifs pour *B. bronchiseptica* et *B. holmessi* (échantillons rares). Les performances du kit pour ces deux espèces ont été validées en utilisant des souches fournies par le Centre National de Référence français de la coqueluche et autres Bordetelloses.

- **Précision**

Les données de précision dans le contexte du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella ont été déterminées sur la base de 4 conditions :

- Variabilité intra-test (intra-jour, au cours d'une même expérience)
- Variabilité intra-jours
- Variabilité intra-opérateurs
- Variabilité intra-lots

Les données de variabilité sont exprimées en termes de valeur moyenne, d'écart-type et de coefficient de variation, sur la base des valeurs seuils du cycle de quantification (Cq) de l'ADN de Bordetella.

Données relatives à la variabilité intra-test :

Deux dilutions d'échantillon ont été testées pour chaque espèce de Bordetella détectée par le kit : 1 haute (+++) correspondant à 1000 copies/µL et 1 basse (+) correspondant à 10 copies/µL. Deux dilutions basses différentes ont été utilisées pour *B. pertussis* et *B. parapertussis*, car leurs deux cibles positives ont des sensibilités différentes et les gènes IS481 et IS1001 sont multicopies et les gènes ptxA-Pr et FLA sont monocopies.
Chaque échantillon a été testé 30 fois.

ADN extrait

	Dilution de l'échantillon	Cible	Mélange 1 Moyenne Cq	SD	CV %
B pertussis	+++	IS481	13,3	0,1	0,9
	+ (ptxA-Pr)		27,4	1,1	4,0
	- (IS481)		34,7	0,3	1,0
	+++	ptxA-Pr	19,6	0,2	0,8
	+ (ptxA-Pr)		34,3	0,7	2,2
B holmesii	+++	IS481	21,2	0,1	0,7
	+		36,2	0,5	1,3

	Dilution de l'échantillon	Cible	Mélange 2 Moyenne Cq	SD	CV %
B parapertussis	+++	IS1001	15,8	0,3	1,7
	+ (FLA1&2)		29,1	0,1	0,5
	+ (IS1001)		35,1	0,7	1,9
	+++	FLA1	21,5	0,2	0,8
	+ (FLA1&2)		35,2	0,4	1,2
	+++	FLA2	21,9	0,2	0,8
	(FLA1&2)		34,7	0,3	0,9
B bronchiseptica	+++	FLA 2	21,8	0,1	0,6
	+		36,6	0,6	1,7

Prétraitement avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis

	Dilution de l'échantillon	Cible	Mélange 1 Moyenne Cq	SD	CV %
B pertussis	+++	IS481	14,7	0,2	1,0
	+ (ptxA-Pr)		28,8	1,0	3,4
	+ (IS481)		34,4	1,2	3,4
	+++	ptxA-Pr	22,4	0,1	0,6
	+ (ptxA-Pr)		35,5	1,1	3,0
B holmesii	+++	IS481	21,5	0,0	0,2
	+		35,4	1,4	4,0

	Dilution de l'échantillon	Cible	Mélange 2 Moyenne Cq	SD	CV %
B parapertussis	+++	IS1001	13,7	0,2	1,2
	+ (FLA1&2)		31,3	0,2	0,8
	+ (IS1001)		34,5	0,8	2,4
	+++	FLA1	19,2	0,2	1,1
	+ (FLA1&2)		37,1	0,6	1,7
	+++	FLA2	18,9	0,2	1,1
	(FLA1&2)		34,9	0,5	1,4
B bronchiseptica	+++	FLA 2	18,6	0,2	0,8
	+		34,8	0,3	0,8

<u>Données relatives à la variabilité inter-tests :</u>
Deux dilutions d'échantillon ont été testées pour chaque espèce de Bordetella détectée par le kit : 1 haute (+++) correspondant à 1000 copies/µL et 1 basse (+) correspondant à 10 copies/µL.
Chaque échantillon est testé en double deux fois par jour, pendant 5 jours.
Les échantillons négatifs donnent des résultats négatifs.

Gène	+++ Valeur Cq moyenne échantillon +++	Écart-type	Coefficient de variation %	+ Valeur Cq moyenne échantillon +	Écart-type	Coefficient de variation %
IS481	27,7	0,1	0,4	33,9	0,2	0,6
ptxA-Pr	27,3	0,1	0,3	33,4	0,2	0,5
IS1001	27,6	0,1	0,4	33,6	0,3	0,8
FLA1	29,5	0,2	0,6	35,7	0,1	0,4
FLA2	28,6	0,2	0,8	34,7	0,3	0,7

Données relatives à la variabilité inter-opérateurs :
Deux dilutions d'échantillon ont été testées pour chaque espèce de Bordetella détectée par le kit : 1 haute (+++) correspondant à 1000 copies/µL et 1 basse (+) correspondant à 10 copies/µL, deux fois par jour par deux opérateurs différents, pendant 5 jours.
Les échantillons négatifs donnent des résultats négatifs.

	+++			+		
Gène	Valeur Cq moyenne échantillon +++	Écart-type	Coefficient de variation %	Valeur Cq moyenne échantillon +	Écart-type	Coefficient de variation %
IS481	27,6	0,1	0,4	33,9	0,0	0,1
ptxA-Pr	27,2	0,1	0,4	33,4	0,0	0,1
IS1001	27,5	0,1	0,2	33,6	0,0	0,1
FLA1	29,4	0,1	0,4	35,6	0,0	0,1
FLA2	28,6	0,0	0,0	34,8	0,0	0,1

Données relatives à la variabilité inter-lots :
Deux dilutions d'échantillon ont été testées pour chaque espèce de Bordetella détectée par le kit : 1 haute (+++) correspondant à 1000 copies/µL et 1 basse (+) correspondant à 10 copies/µL.
Chaque échantillon a été testé en triple ou en double sur deux lots différents.
Les échantillons négatifs donnent des résultats négatifs.

	+++			+		
Gène	Valeur Cq moyenne échantillon +++	Écart-type	Coefficient de variation %	Valeur Cq moyenne échantillon +	Écart-type	Coefficient de variation %
IS481	26,9	0,2	0,6	33,4	0,4	1,1
ptxA-Pr	27,4	0,1	0,5	33,7	0,7	2,0
IS1001	26,9	0,0	0,0	33,0	0,3	0,9
FLA1	29,1	0,1	0,5	35,1	0,0	0,0
FLA2	28,5	0,0	0,1	34,6	0,1	0,3

12 I LIMITES

1. Le non-respect de l'une des instructions de cette notice d'utilisation peut nuire à la performance du test et/ou invalider le résultat du test.
2. Comme pour tout test diagnostique, les résultats doivent être interprétés avec les autres informations cliniques dont dispose le médecin. Un résultat négatif ne peut jamais exclure la présence de Bordetella dans l'échantillon (par exemple, les gènes peuvent être présents à une concentration inférieure à la limite minimale de détection du test, interférence) et un résultat positif ne peut jamais garantir la présence de Bordetella dans l'échantillon (par exemple, contamination). Le médecin ne peut poser un diagnostic définitif qu'après avoir évalué toutes les données cliniques et de laboratoire.
3. Les échantillons contenant plus de 1 % de sang peuvent interférer avec le résultat du test. En cas de présence de sang dans l'échantillon, il convient de considérer le résultat avec prudence.

13 I BIBLIOGRAPHIE

- Pittet LF, Emonet S, Schrenzel J, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Bordetella holmesii: an under-recognized Bordetella species. The Lancet Infectious Diseases. 2014; 14(6):510-9.
- Pittet LF, Emonet S, François P, Bonetti EJ, Schrenzel J, Hug M, Altwegg M, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Diagnosis of whooping cough in Switzerland: Differentiating Bordetella pertussis from Bordetella holmesii by polymerase chain reaction. PLoS One. 2014; 9(2): e88936
-Sanz JC, Abad R, Sanz C, Miguel A. Diagnóstico diferencial de Bordetella bronchiseptica por RT-PCR en un niño con tos paroxística sin antecedentes patológicos previos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.09.016

14 I SYMBOLES INTERNATIONAUX

	Consulter la notice d'utilisation ou la notice d'utilisation électronique		Suffisant pour <n> tests	REF	№ de catalogue
IVD	Dispositif médical pour diagnostic *in vitro*		Limite de température		Ne pas réutiliser
	Fabricant	LOT	Numéro de lot		Date limite d'utilisation
	À conserver à l'abri de la lumière du soleil	Mmix	Master mix		Microplaque
CONTROL -	Contrôle négatif	CONTROL +	Contrôle positif	UDI	Identifiant unique du dispositif
	Sachet de barrettes de bouchons		Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter la notice d'utilisation	CH REP	Représentant autorisé en Suisse
	Importateur	+/-	Détection qualitative par PCR		

15 I INFORMATIONS FABRICANT

BIOSYNEX S.A.
22 boulevard Sébastien Brant
67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN – France
Standard:
Phone: +33 3 88 78 78 87
www.biosynex.com
Contacts France:
Phone: +33 3 88 77 57 00
service.clients@biosynex.com
Contacts other countries:
Phone: +33 3 88 77 57 52
sales@biosynex.com
Customer service:
Phone : +33 3 88 77 57 25
tech.support@biosynex.com

CH REP

BIOSYNEX SWISS S.A.
Route de Rossemaison 100
2800 DELEMONT - Switzerland

Dernières modifications : Mise à jour du tableau des symboles et coordonnées de contact du fabricant.
§7 : correction sur les prélèvements par aspiration.

BIOSYNEX

EN

CE 0123

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella

PCR FOR THE QUALITATIVE DETECTION AND DIFFERENTIATION OF BORDETELLA PERTUSSIS, BORDETELLA PARAPERTUSSIS, BORDETELLA BRONCHISEPTICA AND BORDETELLA HOLMESII IN NASOPHARYNGEAL SWABS OR NASAL ASPIRATES.

In vitro diagnostic medical device for professional use.

REF 3150068_SEC01 / 3150068_SEC02

1 I INTENDED PURPOSE

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella is a molecular *in vitro* diagnostic test for the qualitative detection by qPCR and differentiation of 4 bacterial species of the genus *Bordetella* encountered in human medicine: *B. pertussis, B. parapertussis, B. bronchiseptica* and *B. holmesii*. The test is an aid for the diagnosis of whooping cough performed using a DNA extract obtained from nasopharyngeal swabs or nasal aspirates. This non-automated test is intended for *in vitro* diagnostic use in laboratory by professionals only.

2 I CLINICAL SUMMARY

The genus Bordetella is composed of 9 different species. The main species responsible for respiratory diseases in humans are:

- *B. pertussis* which is the agent responsible for whooping cough and whose reservoir is exclusively human,
- *B. parapertussis*, a species close to *B. pertussis* but which does not secrete *pertussis* toxin, and which may be responsible for a whooping cough syndrome that is usually less severe,
- *B. bronchiseptica*, affecting a large number of mammals and responsible in humans for respiratory infections mainly in the immunocompromised,
- and *B. holmesii* which can also be responsible for respiratory symptoms similar to whooping cough and even septicemia.

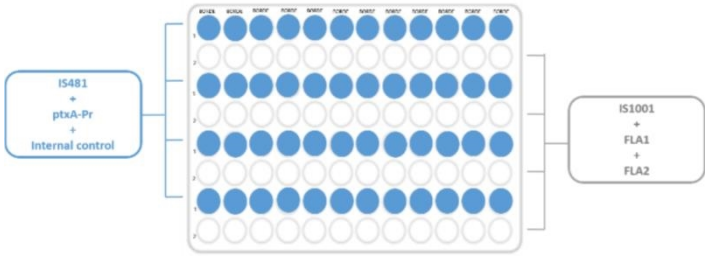
In unvaccinated patients or those whose whooping cough vaccination status is unknown, presenting with a persistent cough, Bordetella testing should be performed as soon as possible to initiate antibiotic treatment and isolate the patient in order to break the chain of infection.

Diagnosis of whooping cough by PCR should be performed within the first three weeks after the onset of symptoms.

3 I TEST PRINCIPLE

The BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella kit is an *in vitro* diagnostic test based on real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technology by fluorescent probe hydrolysis. It is composed of 96-wells microplates pre-filled with two ready-to-use Master mixes containing dNTPs, MgCl2, primers and fluorescent probes, Taq polymerase enzyme, and reaction buffer.

The assay consists of a multiplex PCR step carried out in a real-time thermocycler, allowing the specific amplification and simultaneous detection of molecular targets carrying the sequences of interest: the TOX operon (sequence IS481), the pertussis toxin promoter region (ptxA-Pr), the insertion sequence h-IS1001 specific to *B. holmesii*, and the flagellin gene specific to *B. parapertussis* and which allows to differentiate it from *B. bronchiseptica* in two steps (FLA1 and FLA2 sequences), as well as the internal procedural control – (human RNAse P gene) which allows to evaluate the quality of the biological sample collection, and to validate the DNA extraction and purification steps.
For this purpose, two Master mixes containing probes labelled with FAM, HEX and Cy5 fluorophores are used.



In the blue colored Master mix contained in the wells marked "1" on the pre-filled plate, the fluorophore FAM is used for the sequence-specific amplification of IS481, HEX for the sequence ptxA-Pr and Cy5 for the RNAse P gene. In the clear Master mix contained in the wells marked "2" on the plate, the fluorophore FAM is used for the sequence-specific amplification of IS1001, HEX for the sequence FLA1 and Cy5 for the sequence FLA2.
Determination of the Bordetella species depends on the combination of detection of these genes as described in §10.

The increase in fluorescence signal is only detected if the target sequence complementary to the amplified probe is present in the sample. The fluorescent signal is therefore directly proportional to the amplification of the target during the amplification phase. The Cq (cycle quantification) value corresponds to the number of cycles at which the fluorescence starts to increase exponentially in contrast to the background. The kit can be used on two types of samples:
- nasopharyngeal swabs
- nasopharyngeal/endonasal aspirates

Prior to their use with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella amplification kit (§9),
samples must be first collected and treated according to the procedures detailed in §7 and §8 using BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection kit (ref 3150060 and related references) and BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kit (ref 3150059 and related references), or processed to obtain purified DNA extracts using a suitable kit.

4 I KIT CONTENT

Material included

- 2 divisible 96-wells microplates prefilled with the Master mixes
- 1 tube of positive control (CONTROL +, red cap)
- 1 tube of negative control (CONTROL -, green cap)
- 2 bags of optical cap strips, for microplate sealing

Material required but not provided

- DNA extraction kit
- Powder-free disposable gloves
- Pipettes and filtered tips
- Real-time PCR Thermal Cycler
- PCR microplate or microtubes centrifuge

The PCR thermal cycler used for the test must have the following main characteristics:
- Open system
- Real-time quantitative PCR assays.
- Programmable Thermal Cycler block

Reference	Thermal cycling block
3150068_SEC01	0.1mL low profile
3150068_SEC02	0.2mL high profile

- Excitation source: Leds, lamp or laser
- Filter sets (excitation/emission wavelengths) suitable for the detection of "reporter" fluorophores of the FAM, HEX and Cy5 probes.
- Connection with a computer using specific analysis software that allow the recovery of fluorescence data, absolute quantification assays, and the interpretation of results.

The kit has been developed and validated with the following real-time PCR thermal cyclers:

Reference	Thermal cycler
3150068_SEC01	CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) CFX96™ Opus Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) QuantStudio 5 System (Applied Biosystems) LightCycler 480 (Roche) Amplix-DT lite 48 (DNA Technology)

3150068_SEC02	CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) CFX96™ Opus Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) QuantStudio 5 System (Applied Biosystems) Amplix-DT lite 48 (DNA Technology)

If another thermal cycler is used, please perform your own validation of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella kit using the provided controls and/or qualified respiratory samples before using the test.

5 I PRECAUTIONS

- Carefully follow these instructions for use. Failure to follow any instruction of this IFU may adversely affect the test performance and have harmful consequences.
- Follow Good Laboratory Practice and wear powder-free laboratory disposable gloves throughout the test procedure.
- The daily management of a large number of samples and the high sensitivity of the PCR technique can, in the absence of precaution, generate false positive results by contamination. Pre-handling PCR, post-PCR and DNA extraction should therefore be performed in separate rooms. Wear disposable gloves in each zone, and change them before moving from one zone to another.
- The test and cap are for single use only. Do not reuse. Do not open the PCR tubes at the end of the test.
- Do not use the test if aluminum foil is opened or damaged. Once the aluminum foil is removed, use the test immediately.
- Do not use the kit if it arrived unfrozen.
- Do not use the kit in case of breakage of leakage. In the event of damage to the packaging only (no breakage or leakage), the kit remains usable.
- Protect the kit from light.
- Centrifuge the tubes before opening, opening them one after the other by closing them well between each one to avoid any contamination.
- The CTRL+ contains significant amounts of DNA sequences. It can therefore potentially contaminate the other components of the kit if good molecular biology practices are not followed. To limit this risk of contamination, it is recommended to store this component outside the kit at the first opening of the kit.
- The negative and positive controls included in the kit mimic results obtained with negative or positive samples respectively. They must be used with each new run.
- To ensure that there is no contamination during handling, it is left to the user to include as part of their internal quality approach, at the frequency chosen, an experiment negative control well in which 8µL of molecular biology grade water are added to the Master mix.
- When using negative and positive controls with a series of patients, it is recommended to first deposit the negative control, then deposit the patient samples, and to finish with the deposit of the positive control.
- Dispose of soiled parts or empty kit components in a trash bin suitable for biological waste.
- The device contains material of bacterial or animal origin and may transmit infectious agents and should be handled with extreme caution.
- If, in relation to the use of BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella, a death or a serious deterioration of health has occurred, this should be reported to the manufacturer and the competent authority of your country. If in doubt, report it.
- Safety data sheet available on request. Summary of safety and performance will be available online on Eudamed.

6 I REAGENT STORAGE AND STABILITY

The kit is shipped frozen. Kit components must arrive frozen. Store the kit at a temperature of -20°C. Under these conditions, the reagents are stable until the expiry date indicated on the kit label. Do not use the kit and any of its components after the expiry date. Protect the kit and the reagents from direct light.
The positive and negative controls may undergo up to 15 freeze/thaw cycles.
Remove and thaw only the required number of well strips. As the strips are ready to use, there is no reason to subject them to repeated freeze-thaw cycles.

7 I SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella allows the amplification of DNA of all 4 Bordetella species. The test can be performed using purified DNA extract from nasopharyngeal samples (swabs) or nasopharyngeal/endonasal

aspirates; or the same samples collected in the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (ref 3150060 and related references) and treated with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kit (ref 3150059 and related references).

- Collect nasopharyngeal specimens using sterile swabs discharged into sterile tubes containing transport medium, or those available in the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection kit (ref 3150060 and related references).
- Collect nasopharyngeal/endonasal aspirates with a mucus aspirator according to the manufacturer's recommendations and discharge into sterile tubes containing transport medium, or those available in the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection kit (ref 3150060 and related references). When using the BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kit (ref. 3150059), aspirated samples must be used directly without being unloaded into a transport environment.

Samples discharged into the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection transport medium can either be extracted immediately or within 4 hours if stored at room temperature or stored between 2°C and 8°C for 24 hours.

Transportation of clinical specimens must comply with local regulations for the transport of infectious agents.

8 I EXTRACTION OF NUCLEIC ACIDS

The nucleic acids extraction must be performed before the amplification protocol using a suitable extraction system for bacterial DNA. Please follow the manufacturer's instructions.
The BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella kit has been validated with the following extraction kits:

- BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (ref. 3150059 and related references). **BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis can only be used with nasopharyngeal sample collected in BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection**. **Asiprated samples can be used without unloading into a transport environment.**
- QIAamp DNA Mini kit (Qiagen – Ref 51306)
- NuceloMag Dx Pathogen (Macherey Nagel – 744215.4)
- Amplix Bacterial DNA Extraction kit on Amplix Automated System (DNA Technology - Ref OP05006)

If another DNA extraction method or kit is used, please perform your own method validation of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella kit using qualified respiratory samples before using the test (do not use the controls provided).

It is not necessary to extract the positive and negative controls with the Nucleic Acid Extraction Kit. If use of purified DNA is delayed, before addition to the Master Mix, store at 4°C or on ice on the day of testing.

9 I AMPLIFICATION PROTOCOL

For the plate design, please refer to §3.
It is recommended that the Master mix strips be placed on a refrigerated rack or on ice while samples are being added.

1. Take one breakable plate in strips of 8 wells, and take the number of strips required. If less than a whole strip of 8 wells is needed, the strip can be cut horizontally using a pair of scissors.
2. Centrifuge the strips for a few seconds to collect any droplets on the well edges or on the seal.
3. Carefully remove and discard the aluminum foil. Once the aluminum foil is removed, use the strip immediately.
4. Add 8 µL of sample or control according to the plate design.
5. Close the wells with the transparent caps provided.
6. Centrifuge the strips for a few seconds.
7. Place them in the thermal cycler and run the following amplification program:

PCR Program :

Step	Repetitions	Temperature	Duration	Acquisition
Taq Activation	1x	95°C	3 min	-
Denaturation	50x	95°C	10 sec	-
Hybridation / Elongation		58°C	45 sec	yes

Enter **20 µL** of reaction volume into the Thermal Cycler program.
Please refer to the operating instructions of the Thermal Cycler used for programming information.

Detection channels setting:

Blue Master mix	
Target	Fluorochrome
IS481	FAM
ptxA-Pr	HEX
RNAse P (procedural pontrol)	Cy5
Clear Master mix	
Target	Fluorochrome
IS1001	FAM
FLA1	HEX
FLA2	Cy5

10 I DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS

A. Trial Validation Criteria

Negative control:

The fluorescence emitted must be below the threshold with the exception of the Cy5 channel of the blue Master mix. This is an indicator of non-specific amplification. If the fluorescence is above the threshold, check for an atypical curve. In the case of an amplification curve, a contamination or a distribution error in the microtubes is to be considered. Only the internal control RNAse P should be amplified.

Positive control:

The value of the positive control should preferably be detected before 30 cycles (Cq ≤ 30). In the absence of amplification of the positive control, the existence of an amplification or fluorescence detection problem (defective thermal cycler or instrument non-adapted to the method) should be considered.

Internal amplification control:

The exogenous internal control RNAse P ensures that the enzymes in the Master mix are functional and validates the nucleic acid collection and extraction steps. Indeed, the amplification curve of the RNAse P procedural control should be observed in the Cy5 channel of the wells containing the blue colored Master mix.
Nevertheless, two situations of lack of amplification of the internal control can be observed:

- If the target genes are initially present in the sample with a high number of copies, the internal control may not be amplified. This result is consistent and does not invalidate the test. It should be interpreted as a positive result despite the lack of signal from the internal control. This phenomenon is the result of amplification competition between the Internal Control and targets present at high copy numbers.
- If the target genes in the FAM and HEX channels are not amplified, as well as the internal control in the Cy5 channel in the blue Master mix, then no result can be rendered. This situation highlights the presence of PCR inhibitors. PCR should be repeated starting from the primary sample and preferably on DNA extract.

B. Qualitative interpretation (positive or negative)

Signals above the threshold, **and visually consistent with a classical PCR amplification curve**, are considered positive results.
Some samples may show atypical curves that are not characteristic of amplification curves. In this case, the result should not be considered as interpretable and the analysis of the sample repeated with the controls.

Detection channels						Interpretation
Blue Master mix 1			Clear Master mix 2			
FAM (IS481)	HEX (ptxA-Pr)	Cy5 (RNAseP)	FAM (IS1001)	HEX (FLA1)	Cy5 (FLA2)	
-	-	+	-	-	-	Negative control
+	+	+	+	+	+	Positive control
+	+	+	-	-	-	Patient with *B. pertussis* specific DNA
+	+	-	-	-	-	
+	-	+	-	-	-	Patient with *B. holmesii* specific DNA
+	-	-	-	-	-	
+ If Cq >30	-	+/-	-	-	-	Patient with *Bordetella spp* DNA
-	-	+	+	+	+	Patient with *B. parapertussis* specific DNA
-	-	-	+	+	+	
-	-	+/-	+ If Cq >30	-	-	Patient with *B. parapertussis or B. bronchiseptica* DNA
+/-*	-	+	+/-*	-	+	Patient with *B. bronchiseptica* specific DNA
+/-*	-	-	+/-*	-	+	
-	-	-	-	-	-	Invalid result, retest

*The result is strain dependent. Indeed, depending on the strain, some species may or may not carry the gene. Thus, the *B. bronchiseptica* strain FR3523 is positive for IS1001 while the reference strain RB50 is negative for this gene.

The Master mix 1 (blue) allows the detection of *B. pertussis* or *B. holmesii* and Master mix 2 (colorless) the detection of *B. parapertussis*. The combination of the expression of the different genes detected in the two wells allows the identification of the other specie *B. bronchiseptica.*

11 I PERFORMANCES

- **Analytical sensitivity**

The detection limit (LoD) of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella kit is defined as the concentration that can be detected at 95% at least on a specific *Bordetella* DNA sample.

Detection limits on extracted DNA samples per specie:

The LoD_{95} on extracted DNA is expressed in number of copies of DNA/µl. Quantified DNA extracts were purchased from Vircell (Amplirun®). LoDs were assessed for *Bordetella holmesii* on the master mix 1 as it is positive for the gene IS481, *Bordetella pertussis* on the master mix 1 as it is positive for both targets IS481 and ptxA-Pr and for *Bordetella parapertussis* on the master mix 2 as it is positive for IS1001 and both FLA genes. Quantified DNA of B bronchiseptica is not available on the market, therefore the LoD_{95} could not be assessed for this specie.
The LoD_{95} of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella on extracted DNA have been statistically determined for each strain and gene sequence. Results are given in the table below.

Bordetella strain	LoD_{95} (copies/µL)
Bordetella pertussis	IS481: 0.043 ptxA-Pr: 4.017
Bordetella parapertussis	IS1001: 0.265 FLA 1: 18.418 FLA 2: 16.033
Bordetella holmesii	IS481: 0.253

Detection limits for samples collected with AMPLIQUICK Sample Collection transport medium and treated with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kit:
The LoDs were determined by performing a series of dilutions of a reference sample with a known concentration CFU/mL in qualified Bordetella negative nasopharyngeal swabs discharged into the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection transport medium or negative nasal aspirate samples and treated with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kit.

The LoD_{95} of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella on DNA treated with BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis has been statistically determined for each strain and gene sequence. Results are given in the tables below.

Bordetella strain	LoD_{95} for nasopharyngeal swabs				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA 4
Bordetella pertussis	22.837 CFU/mL	451.291 CFU/mL	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	38.264 CFU/mL	528.032 CFU/mL	429.806 CFU/mL
Bordetella holmesii	113.354 CFU/mL	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1791.123 CFU/mL

Bordetella strain	LoD_{95} for nasal aspirates				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA 4
Bordetella pertussis	36.679 CFU/mL	2758.238 CFU/mL	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	52.0 CFU/mL	1535.5 CFU/mL	445.297 CFU/mL
Bordetella holmesii	87.674 CFU/mL	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1101.8 CFU/mL

- **Analytical specificity**

The design of oligonucleotides (primers and probes) was validated *in silico* by BLAST alignment. The comparison of the sequences obtained shows a specific detection of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella targets.
No primers or probes detect bacterial DNA other than that of the 4 species of Bordetella targeted.

18 DNA extracts from qualified and referenced strains were tested.
11 DNA extracts from the French National Reference Center positive for whooping cough and other Bordetellosis, 3 control DNA sequences from a biobank (Amplirun®, Vircell) and 4 cultures of standard bacterial strain (Zeptometrix®).

	Control DNA		IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA1	FLA2
Biobank	*Bordetella pertussis DNA*		+	+	-	-	-
	Bordetella parapertussis DNA		-	-	+	+	+
	Bordetella holmesii DNA		+	-	-	-	-
	Species	**Strain**	**IS481**	**ptxA-Pr**	**IS1001**	**FLA1**	**FLA2**
Standard culture	*Bordetella pertussis*	A639	+	+	-	-	-
	Bordetella parapertussis	A747	-	-	+	+	+
	Bordetella holmesii	F061	+	-	-	-	-
	Bordetella bronchiseptica	Z341	-	-	-	+	-
NRC	*Bordetella bronchiseptica*	RB50	+	-	-	-	+
		LAR	+	-	-	+	+
		FR3523	-	-	+	-	+
	Bordetella Petrii	KMBW	-	-	-	-	-
		FR5141	-	-	-	-	-

	Bordetella avium	CIP103348T	-	-	-	-	-
		FR6062	-	-	-	-	-
	Bordetella hinzii	CIP104527T	-	-	-	-	-
		FR5948	-	-	-	-	-
	Bordetella trematum	CIP105351T	-	-	-	-	-
		FR5853	-	-	-	-	-

Cross-reactivity

A panel of 76 DNA samples and 38 RNA samples from a biobank listed in the following tables were tested with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella kit. For all these samples, no amplification of the targets of interest was observed.

DNA		
Acanthamoeba castellanii	*Escherichia coli (ETEC)*	*Neisseria meningitidis Sg A*
Adenovirus	*Escherichia coli (VTEC)*	*Neisseria meningitidis Sg B*
Adenovirus 41	*Francisella tularensis*	*Neisseria meningitidis Sg C*
Aspergillus fumigatus	*Gardnerella vaginalis*	*Papillomavirus type 16*
Bacillus cereus	*Giardia intestinalis*	*Papillomavirus type 18*
Bartonella henselae	*Haemophilus ducreyi*	*Parvovirus B19 (Plasmid)*
Bartonella Quintana	*Haemophilus influenzae*	*Rickettsia conorii*
Bk Virus	*Helicobacter pylori*	*Salmonella enteritidis*
Borrelia afzelii	*Herpes simplex 1*	*Salmonella typhi*
Borrelia burgdorferi	*Herpes simplex 2*	*Staphylococcus aureus (MecA-)*
Brucella abortus	*Hhv-6*	*Staphylococcus aureus (MecA+)*
Campylobacter jejuni	*Hhv-8*	*Streptococcus agalactiae*
Candida albicans	*Klebsiella pneumoniae (NDM-1)*	*Toxoplasma gondii*
Candida auris	*Legionella pneumophila*	*Treponema pallidum*
Chlamydia trachomatis	*Leishmania chagasi*	*Trichomonas vaginalis*
Chlamydophila pneumoniae	*Leishmania infantum*	*Trypanosoma cruzi*
Chlamydophila psittaci	*Listeria monocytogenes*	*Ureaplasma parvum*
Clostridium difficile	*Moraxella catarrhalis*	*Ureaplasma urealyticum*
Coccidioides immitis	*Mycobacterium avium*	*Varicella-Zoster Virus*
Coxiella burnetii	*Mycobacterium intracellulare*	*Vibrio cholerae*
Cryptosporidium parvum	*Mycobacterium kansasii*	*Yersinia enterocolitica*
Enterococcus faecalis (VanB)	*Mycobacterium tuberculosis*	*Borrelia garinii*
Enterococcus faecium (VanA)	*Mycobacterium ulcerans*	*Cytomegalovirus*
Epstein-Barr Virus	*Mycoplasma genitalium*	*Streptococcus pneumoniae*
Escherichia coli (EAEC)	*Mycoplasma hominis*	
Escherichia coli (EIEC)	*Neisseria gonorrhoeae*	

RNA		
Coronavirus Oc43	*Human Parainfluenza 1*	*Parainfluenza 4 A*
Chikungunya Virus	*Influenza A H1*	*Respiratory Syncytial Virus (Subtype A)*
Coronavirus	*Influenza A H3*	*Respiratory Syncytial Virus (Subtype B)*
Coronavirus SARS (2003)	*Influenza A H5*	*Rhinovirus*
Coxsackie A6	*Influenza B*	*Rotavirus*
Coxsackie B1	*Measles*	*Rubella*
Coxsackie B5	*MERS Coronavirus*	*SARS-CoV-2*
Dengue 1 Virus	*Mumps*	*Tick-Borne Encephalitis Virus*
Dengue 2 Virus	*Norovirus*	*West Nile Virus*
Dengue 3 Virus	*Novel Influenza A H1n1*	*Yellow Fever Virus*
Dengue 4 Virus	*Parainfluenza 1*	*Zika Virus*
Echovirus 5	*Parainfluenza 2*	*Zika Virus (Asian Lineage)*
Enterovirus 68	*Parainfluenza 3*	

- **Interference study**

The presence of PCR inhibitors in the sample may induce a positive or negative interference on test results. The presence of various inhibitors in samples was tested.

Nasal sprays

No positive or negative interference was found by loading up to 10% in the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection transport medium from a matrix of nasopharyngeal secretions treated with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kit, with the following substances:

Product	Active Substance
Nasacort	Triamcinolone acetonide
Aturgyl	Oxymetazoline
Béconase	Beclometasone dipropionate
Budésonide	Budesonide
Mométasone	Mometasone
Avamys	Fluticasone furoate
Fixorinox	Fluticasone propionate

Blood

The presence of blood in nasopharyngeal swabs can induce a positive or negative interference on the PCR test result. Our study shows that blood concentrations up to 1% do not interfere with the PCR reaction when the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella kit is used with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection and BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kits. For blood concentrations from 2% and above, there is a decrease in sensitivity. Therefore, blood concentration in the sample should not exceed 1%.

- **Clinical performances**

The clinical performances were determined on 146 samples from 4 different laboratories that were qualified positive or negative for *B. pertussis* or *B. parapertussis* using CE marked PCR tests referenced by the French Health Ministry.

These tests allow the identification of these two strains through the amplification of the IS481 and IS1001 genes, which are also present in the *B. holmesii* and *B. bronchiseptica* strains.

The samples were qualified with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella kit on purified DNA extracts or after treatment with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kit.

	Number of samples	*B. pertussis*		*B. parapertussis*		*Co-infections*	*Negative for Bordetella*
		+	-	+	-		
Laboratory 1	63	58	1	8	51	8*	5
Laboratory 2	12	12	0	2	10	2	0
Laboratory 3	31	0	0	0	0	0	31
Laboratory 4	40	0	0	0	0	0	40

*Among the 8 samples qualified as positive for *B. pertussis* and *B. parapertussis* from laboratory 1, no co-infection was confirmed using the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella kit as well as another CE marked kit on the market.

The contingency table below shows the performance of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella kit on samples after DNA extraction/purification with a commercial kit:

		Reference PCR	
		Positive	Negative
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positive	69	0
	Negative	1	76

Sensitivity: 98.57% (95%CI: 92.30% to 99.96%) **Specificity: 100%** (95%CI: 95.26% to 100%)

The contingency table below shows the performance of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella on samples treated with BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kit:

		Reference PCR	
		Positive	Negative
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positive	66	0
	Negative	4	76

Sensitivity : 94.29% (95%CI: 86.01% to 98.42%) **Specificity : 100%** (95%CI: 95.26% to 100%)

For this study, we did not have access to clinical samples from patients positive for *B. bronchiseptica* and *B. holmessi* (rare samples). The performances of the kit for these two species were validated using strains provided by the French National Reference Center for whooping cough and other Bordetellosis.

- **Precision**

The precision data in the context of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella kit was determined based on 4 conditions:

- Intra-assay variability (intra-day, within a same experiment)
- Inter-days variability
- Inter-operators variability
- Inter-lots variability

The variability data are expressed in terms of mean value, standard deviation and coefficient of variation, based on the threshold cycle of quantification (Cq) values of the Bordetella DNA.

Intra-assay variability data:

Two sample dilutions were tested for each Bordetella specie detected by the kit: 1 high (+++) corresponding to 1000 copies/µL and 1 low (+) corresponding to 10 copies/µL. Two different low dilutions were used for *B. pertussis* and *B. parapertussis*, as their two positive targets have different sensitivities and the IS481 and IS1001 genes are multicopy and the ptxA-Pr and FLA genes are monocopy.

Each sample was tested 30 times.

Extracted DNA

			Mix 1						Mix 2		
	Sample dilution	Target	Mean Cq	SD	CV %		Sample dilution	Target	Mean Cq	SD	CV %
B pertussis	+++	IS481	13.3	0.1	0.9	*B parapertussis*	+++	IS1001	15.8	0.3	1.7
	+ (ptxA-Pr)		27.4	1.1	4.0		+ (FLA1&2)		29.1	0.1	0.5
	- (IS481)		34.7	0.3	1.0		+ (IS1001)		35.1	0.7	1.9
	+++	ptxA-Pr	19.6	0.2	0.8		+++	FLA1	21.5	0.2	0.8
	+ (ptxA-Pr)		34.3	0.7	2.2		+ (FLA1&2)		35.2	0.4	1.2
							+++	FLA2	21.9	0.2	0.8
							(FLA1&2)		34.7	0.3	0.9
B holmesii	+++	IS481	21.2	0.1	0.7	*B bronchiseptica*	+++	FLA 2	21.8	0.1	0.6
	+		36.2	0.5	1.3		+		36.6	0.6	1.7

Pre-treatment with BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kit

			Mix 1						Mix 2		
	Sample dilution	Target	Mean Cq	SD	CV %		Sample dilution	Target	Mean Cq	SD	CV %
B pertussis	+++	IS481	14.7	0.2	1.0	*B parapertussis*	+++	IS1001	13.7	0.2	1.2
	+ (ptxA-Pr)		28.8	1.0	3.4		+ (FLA1&2)		31.3	0.2	0.8
	+ (IS481)		34.4	1.2	3.4		+ (IS1001)		34.5	0.8	2.4
	+++	ptxA-Pr	22.4	0.1	0.6		+++	FLA1	19.2	0.2	1.1

	+ (ptxA-Pr)		35.5	1.1	3.0		+ (FLA1&2)		37.1	0.6	1.7
							+++ (FLA1&2)	FLA2	18.9	0.2	1.1
									34.9	0.5	1.4
B holmesii	+++	IS481	21.5	0.0	0.2	*B bronchiseptica*	+++	FLA 2	18.6	0.2	0.8
	+		35.4	1.4	4.0		+		34.8	0.3	0.8

Inter-assays variability data:
Two sample dilutions were tested for each Bordetella specie detected by the kit: 1 high (+++) corresponding to 1000 copies/µL and 1 low (+) corresponding to 10 copies/µL.
Each sample is tested in duplicate twice each day, during 5 days.
Negative sample give negative results.

	+++			+		
Gene	Average Cq value sample +++	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value sample +	Standard deviation	Coefficient of variation %
IS481	27.7	0.1	0.4	33.9	0.2	0.6
ptxA-Pr	27.3	0.1	0.3	33.4	0.2	0.5
IS1001	27.6	0.1	0.4	33.6	0.3	0.8
FLA1	29.5	0.2	0.6	35.7	0.1	0.4
FLA2	28.6	0.2	0.8	34.7	0.3	0.7

Inter-operators variability data:
Two sample dilutions were tested for each Bordetella specie detected by the kit: 1 high (+++) corresponding to 1000 copies/µL and 1 low (+) corresponding to 10 copies/µL.
twice each day by two different operators, during 5 days.
Negative sample give negative results.

	+++			+		
Gene	Average Cq value sample +++	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value sample +	Standard deviation	Coefficient of variation %
IS481	27.6	0.1	0.4	33.9	0.0	0.1
ptxA-Pr	27.2	0.1	0.4	33.4	0.0	0.1
IS1001	27.5	0.1	0.2	33.6	0.0	0.1
FLA1	29.4	0.1	0.4	35.6	0.0	0.1
FLA2	28.6	0.0	0.0	34.8	0.0	0.1

Inter-lots variability data:
Two sample dilutions were tested for each Bordetella specie detected by the kit: 1 high (+++) corresponding to 1000 copies/µL and 1 low (+) corresponding to 10 copies/µL.
Each sample was tested in triplicate or duplicate on two different lots.
Negative sample give negative results.

	+++			+		
Gene	Average Cq value sample +++	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value sample +	Standard deviation	Coefficient of variation %
IS481	26.9	0.2	0.6	33.4	0.4	1.1
ptxA-Pr	27.4	0.1	0.5	33.7	0.7	2.0
IS1001	26.9	0.0	0.0	33.0	0.3	0.9
FLA1	29.1	0.1	0.5	35.1	0.0	0.0
FLA2	28.5	0.0	0.1	34.6	0.1	0.3

12 I LIMITS

1. Failure to follow any instruction of the IFU may adversely affect the test performance and/or invalidate the test result.
2. As for any diagnostic test, results must be considered with other clinical information available to the physician. A negative result can never rule out the presence of Bordetella in the sample (e.g. genes may be present at a concentration below the minimum detection limit of the test, interference) and a positive result can never ensure the presence of Bordetella in the sample (e.g. contamination). A definitive diagnosis can only be made by the physician after evaluation of all clinical and laboratory data.
3. Samples with more than 1% blood may interfere with the test result. In case of blood in the sample, consider the result with caution.

13 I BIBLIOGRAPHY

- Pittet LF, Emonet S, Schrenzel J, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Bordetella holmesii : an under-recognized Bordetella species. The Lancet Infectious Diseases. 2014; 14(6):510-9.
- Pittet LF, Emonet S, François P, Bonetti EJ, Schrenzel J, Hug M, Altwegg M, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Diagnosis of whooping cough in Switzerland: Differentiating Bordetella pertussis from Bordetella holmesii by polymerase chain reaction. PLoS One. 2014; 9(2): e88936
- Sanz JC, Abad R, Sanz C, Miguel A. Diagnóstico diferencial de Bordetella bronchiseptica por RT-PCR en un ní no con tos paroxística sin antecedentes patológicos previos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.09.016

14 I INTERNATIONAL SYMBOLS

	Consult instructions for use or consult electronic instructions for use		Contains sufficient for <n> tests	REF	Catalog number
IVD	*In vitro* diagnostic medical device		Temperature limit		Do not reuse
	Manufacturer	LOT	Batch code		Use-by date
	Keep away from sunlight	Mmix	Master Mix		Microplate
CONTROL -	Negative control	CONTROL +	Positive control	UDI	Unique Device Identifier
	Bag of cap strips		Do not use if package is damaged and consult instructions for use	CH REP	Authorized Representative in Switzerland
	Importer	+/-	Qualitative detction by PCR		

15 I MANUFACTURER INFORMATION

BIOSYNEX S.A.
22 boulevard Sébastien Brant
67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN – France
Standard:
Phone: +33 3 88 78 78 87
www.biosynex.com
Contacts France:
Phone: +33 3 88 77 57 00
service.clients@biosynex.com
Contacts other countries:
Phone: +33 3 88 77 57 52
sales@biosynex.com
Customer service:
Phone : +33 3 88 77 57 25
tech.support@biosynex.com

CH REP
BIOSYNEX S.A.
Route de Rossemaison 100
2800 DELEMONT - Switzerland

Latest changes :
Update of the table of symbols and manufacturer's contact details.
§7: correction on suction sampling

DE

CE 0123

BIOSYNEX AMPLIQUICK *BORDETELLA*

PCR-TEST FÜR DEN QUALITATIVEN NACHWEIS UND DIE DIFFERENZIERUNG VON BORDETELLA PERTUSSIS, BORDETELLA PARAPERTUSSIS, BORDETELLA BRONCHISEPTICA UND BORDETELLA HOLMESII IN NASOPHARYNGEALABSTRICHEN ODER NASENASPIRATEN

Nur zur Nutzung in der professionellen In-vitro-Diagnostik vorgesehen

REF 3150068_SEC01 / 3150068_SEC02

1 I VERWENDUNGSZWECK

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella ist ein molekulardiagnostischer *In-vitro*-Test für den qualitativen qPCR-Nachweis und die Differenzierung von 4 in der Humanmedizin vorkommenden Bakterienspezies der Gattung *Bordetella*: *B. pertussis, B. parapertussis, B. bronchiseptica* und *B. holmesii*. Der Test unterstützt die Diagnose von Keuchhusten und wird an einem DNA-Extrakt aus Nasopharyngealabstrichen oder Nasenaspiraten durchgeführt. Dieser nicht automatisierte Test ist ausschließlich für die Laboranwendung durch Fachpersonal im Rahmen der *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.

2 I KLINISCHE ZUSAMMENFASSUNG

Die Gattung Bordetella umfasst 9 verschiedene Spezies. Die hauptsächlichen Spezies, die Atemwegserkrankungen beim Menschen Spezies auslösen, sind:

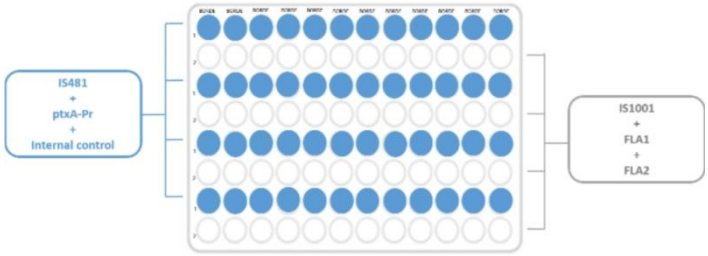
- *B. pertussis*, der Erreger des Keuchhustens, dessen einziges Reservoir der Mensch ist
- *B. parapertussis*, das eng mit *B. pertussis* verwandt ist, jedoch kein *Pertussis*-Toxin absondert, und für ein Keuchhusten-Syndrom verantwortlich sein kann, das in der Regel weniger schwerwiegend ist
- *B. bronchiseptica*, das eine Vielzahl von Säugetieren befällt und beim Menschen, vor allem bei immunkompromittierten Menschen, Atemwegsinfektionen auslöst
- *B. holmesii*, das auch für keuchhustenähnliche Atemwegssymptome und sogar Septikämie verantwortlich sein kann

Bei ungeimpften Patienten oder Patienten mit unbekanntem Keuchhusten-Impfstatus, die sich mit persistierendem Husten vorstellen, sollte so schnell wie möglich ein Bordetella-Test durchgeführt werden, damit ggf. eine Antibiotikabehandlung eingeleitet und der Patient zur Unterbrechung der Infektionskette isoliert werden kann.
Die Diagnose von Keuchhusten mittels PCR sollte innerhalb der ersten drei Wochen nach Auftreten der Symptome gestellt werden.

3 I TESTPRINZIP

Das BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Kit ist ein *In-vitro*-Diagnosetest auf der Grundlage der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mittels Fluoreszenzsonde (Hydrolyse-Sonde). Das Kit besteht aus 96-Well-Mikrotiterplatten, die mit zwei gebrauchsfertigen Master-Mixes vorgefüllt sind, die dNTPs, MgCl2, Primer und Fluoreszenzsonden, Taq-Polymerase-Enzyme und Reaktionspuffer enthalten.

Der Test umfasst einen Multiplex-PCR-Schritt, der in einem Echtzeit-Thermocycler durchgeführt wird und die spezifische Amplifikation und den gleichzeitigen Nachweis von molekularen Zielen, die die Sequenzen von Interesse tragen, ermöglicht: das TOX-Operon (Sequenz IS481), die Pertussis-Toxin-Promotorregion (ptxA-Pr), die für *B. holmesii* spezifische h-IS1001-Einfügesequenz und das für *B. parapertussis* spezifische Flagellin-Gen, das eine Differenzierung von *B. bronchiseptica* in zwei Schritten (FLA1- und FLA2-Sequenz) ermöglicht, sowie die interne Verfahrenskontrolle (humanes RNAse P-Gen), die eine Bewertung der Qualität der Entnahme der biologischen Probe und eine Validierung der DNA-Extraktions- und Aufreinigungsschritte ermöglicht.
Zu diesem Zweck werden zwei Master-Mixes verwendet, die mit FAM-, HEX- und Cy5-Fluorophoren markierte Sonden enthalten.



Im blau gefärbten Master-Mix, der in den mit „1“ gekennzeichneten Vertiefungen in der vorgefüllten Platte enthalten ist, wird der Fluorophor FAM für die sequenzspezifische Amplifikation von IS481, der Fluorophor HEX für die ptxA-Pr-Sequenz und Cy5 für das RNAse P-Gen verwendet. Im farblosen Master-Mix, der in den mit „2“ gekennzeichneten Vertiefungen der vorgefüllten Platte enthalten ist, werden der Fluorophor FAM für die sequenzspezifische Amplifikation von IS1001, der Fluorophor HEX für die FLA1-Sequenz und Cy5 für FLA2 verwendet.
Die Bestimmung der Bordetella-Spezies hängt von der Kombination des Nachweises dieser Gene ab (siehe § 10).

Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals wird nur nachgewiesen, wenn die zur amplifizierten Sonde komplementäre Zielsequenz in der Probe vorhanden ist. Das Fluoreszenzsignal ist daher direkt proportional zur Amplifikation des Ziels während der Amplifikationsphase. Der Cq-Wert (Cq = Quantifizierungszyklus) entspricht der Anzahl der Zyklen, bei denen die Fluoreszenz im Gegensatz zum Hintergrund exponentiell ansteigt. Das Kit kann für zwei Arten von Proben verwendet werden:
- Nasopharyngealabstriche
- Nasopharyngeal-/Endonasalaspirate

Vor der Verwendung mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Amplifikationskit (§ 9)
müssen die Proben zunächst mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Probenentnahmekit (Ref. 3150060 und zugehörige Referenzen) und dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysekit (Ref. 3150059 und zugehörige Referenzen) entnommen und gemäß den in § 7 und § 8 beschriebenen Verfahren behandelt oder alternativ mit einem geeigneten Kit aufbereitet werden, um gereinigte DNA-Extrakte zu erhalten.

4 I INHALT DES TESTKITS

Enthaltenes Material
- 2 mit den Master-Mixes vorgefüllte teilbare 96-Well-Mikrotiterplatten
- 1 Röhrchen mit Positivkontrolle (CONTROL+, rote Kappe)
- 1 Röhrchen mit Negativkontrolle (CONTROL-, grüne Kappe)
- 2 Beutel mit Streifen mit 8 optischen Flachkappen zum Verschließen der Mikroplatten

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien
- DNA-Extraktionskit
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- Pipetten und Filterspitzen
- Echtzeit-PCR-Thermocycler
- PCR-Mikrotiterplatten- oder -Mikroröhrchen-Zentrifuge

Der für den Test verwendete PCR-Thermocycler muss die folgenden Hauptmerkmale aufweisen:
- Offenes System
- Quantitative Echtzeit-PCR-Assays
- Programmierbarer Thermocycler-Block

Artikelnummer	Thermocycler-Block
3150068_SEC01	0,1 ml, niedriges Profil
3150068_SEC02	0,2 ml, hohes Profil

- Anregungsquelle: LEDs, Lampe oder Laser
- Filtersätze (Anregungs-/Emissionswellenlängen), die zum Nachweis von „Berichts“-Fluorophoren der FAM-, HEX- und Cy5-Sonden geeignet sind.

- Verbindung mit einem Computer, der unter Verwendung einer speziellen Analysesoftware die Wiederherstellung von Fluoreszenzdaten, absolute Quantifizierungsassays und die Interpretation von Ergebnissen ermöglicht.

Das Kit wurde mit den folgenden Echtzeit-PCR Thermocyclern entwickelt und validiert:

Artikelnummer	Thermocycler
3150068_SEC01	CFX96™ Touch Echtzeit-PCR-Nachweissystem (Bio-Rad) CFX96™ Opus Echtzeit-PCR-Nachweissystem (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) QuantStudio 5 System (Applied Biosystems) LightCycler 480 (Roche) Amplix-DT lite 48 (DNA Technology)
3150068_SEC02	CFX96™ Touch Echtzeit-PCR-Nachweissystem (Bio-Rad) CFX96™ Opus Echtzeit-PCR-Nachweissystem (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) QuantStudio 5 System (Applied Biosystems) Amplix-DT lite 48 (DNA Technology)

Wenn ein anderer Thermocycler verwendet wird, vor Verwendung des Tests bitte eine eigene Validierung des BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Kits unter Verwendung der mitgelieferten Kontrollen und/oder qualifizierter Atemwegsproben durchführen.

5 I VORSICHTSMASSNAHMEN

- Diese Gebrauchsanleitung genau beachten. Die Nichtbeachtung einer Anweisung in dieser Gebrauchsanleitung kann die Testleistung beeinträchtigen und schädliche Folgen haben.
- Die gute Laborpraxis beachten und während des Testverfahrens puderfreie Laborhandschuhe zum Einmalgebrauch tragen.
- Wenn keine Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden, können die tägliche Handhabung einer großen Anzahl von Proben und die hohe Sensitivität der PCR-Technik zu falsch positiven Ergebnissen durch Kontamination führen. Daher sollten die Behandlung vor und nach der PCR und die DNA-Extraktion in getrennten Räumen durchgeführt werden. In jeder Zone Einmalhandschuhe tragen und diese vor dem Verlassen einer und dem Betreten einer anderen Zone wechseln.
- Der Test und die Kappe sind zur einmaligen Verwendung bestimmt. Nicht wiederverwenden. Die PCR-Röhrchen am Ende des Tests nicht öffnen.
- Den Test nicht verwenden, wenn die Aluminiumfolie offen oder beschädigt ist. Den Test unmittelbar nach dem Entfernen der Aluminiumfolie verwenden.
- Das Kit nicht verwenden, wenn es bei Empfang aufgetaut war.
- Das Kit nicht verwenden, wenn es beschädigt oder undicht ist. Bei beschädigter Verpackung (kein Bruch oder Auslaufen) ist das Kit nach wie vor verwendbar.
- Schützen Sie das Kit vor Licht.
- Zentrifugieren Sie die Röhrchen vor dem Öffnen und öffnen Sie sie nacheinander, indem Sie gerade nicht benutzte Röhrchen fest verschließen, um Kontaminationen zu vermeiden.
- Die CTRL+ enthält signifikante Mengen an DNA-Sequenzen. Bei Nichteinhaltung guter molekularbiologischer Praktiken kann sie daher möglicherweise die anderen Komponenten des Kits kontaminieren. Um dieses Kontaminationsrisiko zu begrenzen, wird empfohlen, diese Komponente beim ersten Öffnen des Kits aus dem Kit zu nehmen und getrennt aufzubewahren.
- Die im Kit enthaltene Negativ- und Positivkontrolle imitieren Ergebnisse, die mit negativen bzw. positiven Proben erhalten werden. Sie müssen bei jedem neuen Durchlauf verwendet werden.

Um sicherzustellen, dass während der Handhabung keine Kontamination auftritt, bleibt es dem Benutzer überlassen, in der gewählten Häufigkeit als Teil seines internen Qualitätsansatzes eine experimentelle Negativkontrollvertiefung hinzuzufügen, in der 8 µl Wasser in Molekularbiologie-Qualität zum Master-Mix hinzugefügt werden.

- Bei Verwendung der Negativ- und Positivkontrolle bei einer Reihe von Patienten wird empfohlen, zuerst die Negativkontrolle einzufüllen, dann die Patientenproben und schließlich die Positivkontrolle.
- Verschmutzte Teile oder leere Kit-Komponenten in einem für biologischen Abfall geeigneten Mülleimer entsorgen.
- Die Testkassette enthält Materialien bakteriellen oder tierischen Ursprungs, die Infektionserreger übertragen

können, und sollte mit äußerster Vorsicht gehandhabt werden.

- Falls im Zusammenhang mit der Verwendung von BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella ein Todesfall oder eine schwerwiegende gesundheitliche Verschlechterung eingetreten ist, sollte dies dem Hersteller und der zuständigen Behörde in Ihrem Land berichtet werden. Im Zweifelsfall den Vorfall immer melden.
- Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Eine Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung wird online auf Eudamed zur Verfügung gestellt.

6 I LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Das Kit wird gefroren geliefert. Die Komponenten des Kits müssen gefroren ankommen. Das Kit bei einer Temperatur von -20 °C lagern. Bei dieser Temperatur sind die Reagenzien bis zu dem auf dem Kit angegebenen Verfallsdatum stabil. Das Kit und seine Komponenten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Das Kit und die Reagenzien vor direkter Lichteinstrahlung schützen.
Die Positiv- und die Negativkontrolle können bis zu 15 Einfrier-/Auftauzyklen durchlaufen.
Nur die benötigte Anzahl von Well-Streifen entnehmen und auftauen. Da die Streifen gebrauchsfertig sind, gibt es keinen Grund, sie wiederholten Einfrier-/Auftauzyklen auszusetzen.

7 I PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella ermöglicht die Amplifikation der DNA aller 4 Bordetella-Spezies. Der Test kann an aufgereinigtem DNA-Extrakt aus Nasopharyngealproben (Abstrichen) oder Nasopharyngeal-/Endonasalaspiraten oder an denselben mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Probenentnahmekit (Ref. 3150060 und zugehörige Referenzen) entnommen und mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Lyse-Kit (Ref. 3150059 und zugehörige Referenzen) aufbereiteten Proben durchgeführt werden.

- Die Nasopharyngeal-/Endonasalaspirate mit sterilen Abstrichtupfern, deren Probenmaterial in sterile Röhrchen mit Transportmedium abgegeben wird, oder mit den im Lieferumfang des BIOSYNEX AMPLIQUICK Probenentnahmekits (Ref. 3150060 und zugehörige Referenzen) enthaltenen Abstrichtupfern entnehmen.
- Die Nasopharyngeal-/Endonasalaspirate mit einem Schleimaspirator entsprechend den Empfehlungen des Herstellers entnehmen und in das sterile Röhrchen mit Transportmedium oder in die im Lieferumfang des BIOSYNEX AMPLIQUICK Probenentnahmekits enthaltenen Röhrchen (Ref. 3150060 und verbundene Referenzen) abgeben. Bei Verwendung des BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis Kits (Art.-Nr. 3150059) sollten die Saugproben direkt verwendet werden, ohne den Zustand des Entladens in ein Transportmedium zu durchlaufen.

Proben, die in das Transportmedium des BIOSYNEX AMPLIQUICK Probenentnahmekits gegeben werden, müssen bei Aufbewahrung bei Raumtemperatur sofort oder innerhalb von 4 Stunden und bei Aufbewahrung bei 2 °C bis 8 °C innerhalb von 24 Stunden extrahiert werden.
Der Transport klinischer Proben muss den örtlichen Vorschriften für den Transport von Infektionserregern entsprechen.

8 I EXTRAKTION VON NUKLEINSÄUREN

Die Nukleinsäureextraktion muss vor dem Amplifikationsprotokoll unter Verwendung eines geeigneten Extraktionssystems für bakterielle DNA durchgeführt werden. Bitte die Anweisungen des Herstellers beachten.
Das BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Kit wurde mit den folgenden Extraktionskits validiert:

- BIOSYNEX AMPLIQUICK Lyse (Ref. 3150059 und zugehörige Referenzen). **BIOSYNEX AMPLIQUICK Lyse kann nur mit mittels des BIOSYNEX AMPLIQUICK Probenentnahmekits entnommenen Nasopharyngeal Proben verwendet werden. Saugproben können ohne Entladung in einem Transportmedium verwendet werden.**
- QIAamp DNA Mini-Kit (Qiagen – Ref. 51306)
- NuceloMag Dx Pathogen (Macherey Nagel – 744215.4)
- Amplix bakterielles DNA-Extraktionskit auf dem Amplix Automatisierten System (DNA Technology - Ref. OP05006)

Wenn eine andere DNA-Extraktionsmethode oder ein anderes Kit verwendet wird, vor Verwendung des Tests bitte eine eigene Methodenvalidierung des BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Kits mit qualifizierten Atemwegsproben durchführen (nicht die mitgelieferten Kontrollen verwenden).

Es ist nicht erforderlich, die Positiv- und die Negativkontrolle mit dem Nucleic Acid Extraction Kit zu extrahieren. Wenn sich die Verwendung der aufgereinigten DNA am Testtag verzögert, die Probe bei 4 °C aufbewahren, bevor Sie sie in den Master-Mix gegeben wird.

9 I AMPLIFIKATIONSPROTOKOLL

Hinweise zum Design der Platte sind § 3 zu entnehmen.
Es wird empfohlen, die Master-Mix-Streifen während des Hinzufügens von Proben in ein Kühlgestell oder auf Eis zu legen.

1. Von einer in Streifen mit 8 Vertiefungen teilbaren Platte die erforderliche Anzahl von Streifen entnehmen. Wenn weniger als ein ganzer Streifen mit 8 Vertiefungen benötigt wird, kann der Streifen mit einer Schere waagerecht durchgeschnitten werden.
2. Die Streifen einige Sekunden zentrifugieren, um eventuell vorhandene Tröpfchen von den Rändern oder aus der Versiegelung der Vertiefung zu entfernen.
3. Entfernen und entsorgen Sie die Aluminiumfolie vorsichtig. Den Streifen unmittelbar nach dem Entfernen der Aluminiumfolie verwenden.
4. 8 µl der Probe oder Kontrolle entsprechend dem Design der Platte hinzufügen.
5. Die Vertiefungen mit den im Lieferumfang enthaltenen transparenten Kappen verschließen.
6. Die Streifen einige Sekunden zentrifugieren.
7. Die Streifen in den Thermocycler einsetzen und das folgende Amplifikations-Programm ausführen:

PCR-Programm:

Schritt	Wiederholungen	Temperatur	Dauer	Erwerb
Taq-Aktivierung	1x	95°C	3 Min	-
Denaturierung	50x	95°C	10 Sek	-
Hybridierung/ Verlängerung		58°C	45 Sek	ja

Geben Sie **20 µl** Reaktionsvolumen in das Thermoyclerprogramm ein.
Informationen zur Programmierung finden Sie in der Gebrauchsanweisung des verwendeten Thermocyclers.

Einstellung der Nachweiskanäle:

Blauer Master-Mix	
Ziel	Fluorochrom
IS481	FAM
ptxA-Pr	HEX
RNAse P (Verfahrenskontrolle)	Cy5
Farbloser Master-Mix	
Ziel	Fluorochrom
IS1001	FAM
FLA1	HEX
FLA2	Cy5

10 I DATENANALYSE UND ERGEBNISINTERPRETATION

A. Studienvalidierungskriterien

Negativkontrolle:

Die emittierte Fluoreszenz muss unterhalb des Schwellenwerts liegen, mit Ausnahme des Cy5-Kanals des blauen Master-Mixes. Dies ist ein Indikator für eine unspezifische Amplifikation. Wenn die Fluoreszenz oberhalb des Schwellenwerts liegt, prüfen, ob eine atypische Kurve vorliegt. Bei einer Amplifikationskurve ist ein Kontaminations- oder Verteilungsfehler in den Mikroröhrchen in Betracht zu ziehen. Nur die interne RNAse P-Kontrolle sollte amplifiziert werden.

Positivkontrolle:

Der Wert der Positivkontrolle sollte vorzugsweise vor Ablauf von 30 Zyklen erfasst werden (Cq ≤ 30). In Abwesenheit einer Amplifikation der Positivkontrolle sollte das Vorliegen eines Amplifikations- oder Fluoreszenznachweisproblems (defekter Thermocycler oder nicht an die Methode angepasstes Instrument) in Erwägung gezogen werden.

Interne Amplifikationskontrolle:

Mittels der exogenen internen RNAse P-Kontrolle wird sichergestellt, dass die Enzyme im Master-Mix funktionsfähig sind und die Schritte der Nukleinsäuregewinnung und -extraktion werden validiert. Tatsächlich sollte die Amplifikationskurve der RNAse P-Verfahrenskontrolle im Cy5-Kanal der Vertiefungen, die den blauen Farbe Master-Mix enthalten, beobachtet werden.

Es gibt jedoch zwei Situationen, in denen keine Amplifikation der internen Kontrolle stattfindet:

- Wenn die Zielgene anfänglich mit einer hohen Anzahl von Kopien in der Probe vorhanden ist, findet möglicherweise keine Amplifikation der internen Kontrolle statt. Dieses Ergebnis ist keine Abweichung und macht den Test nicht ungültig. Es sollte trotz des fehlenden Signals der internen Kontrolle als positives Ergebnis interpretiert werden. Dieses Phänomen ist das Ergebnis eines Amplifikationswettbewerbs zwischen der internen Kontrolle und Zielen, die bei hohen Kopienanzahlen vorhanden sind.
- Wenn die Zielgene im FAM- und HEX-Kanal sowie die interne Kontrolle im Cy5-Kanal im blauen Master-Mix nicht amplifiziert werden, kann kein Ergebnis ausgegeben werden. Diese Situation unterstreicht das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren. Die PCR sollte ausgehend von der Primärprobe und vorzugsweise auf DNA-Extrakt wiederholt werden.

B. Qualitative Interpretation (positiv oder negativ)

Signale oberhalb des Schwellenwerts, **die visuell einer klassischen PCR-Amplifikationskurve entsprechen**, werden als positive Ergebnisse angesehen.

Manche Proben können atypische Kurven zeigen, die für Amplifikationskurven nicht charakteristisch sind. In diesem Fall sollte das Ergebnis als nicht auswertbar angesehen und die Analyse der Probe mit den Kontrollen wiederholt werden.

Nachweiskanäle						Auswertung
Blauer Master-Mix 1			Farbloser Master-Mix 2			
FAM (IS481)	HEX (ptxA-Pr)	Cy5 (RNAseP)	FAM (IS1001)	HEX (FLA1)	Cy5 (FLA2)	
-	-	+	-	-	-	Negativkontrolle
+	+	+	+	+	+	Positivkontrolle
+	+	+	-	-	-	Patient mit *B. pertussis*-spezifischer DNA
+	+	-	-	-	-	
+	-	+	-	-	-	Patient mit *B. holmesii*-spezifischer DNA
+	-	-	-	-	-	
+ Bei Cq > 30	-	+/-	-	-	-	Patient mit*Bordetella spp*-spezifischer DNA
-	-	+	+	+	+	Patient mit *B. parapertussis*-spezifischer DNA
-	-	-	+	+	+	
-	-	+/-	+ Bei Cq > 30	-	-	Patient mit *B. parapertussis- oder B. bronchiseptica*-spezifischer DNA
+/-*	-	+	+/-*	-	+	Patient mit *B. bronchiseptica*-spezifischer DNA
+/-*	-	-	+/-*	-	+	
-	-	-	-	-	-	Ungültiges Ergebnis, erneut testen.

*Das Ergebnis ist abhängig vom jeweiligen Stamm. Je nach Stamm können einige Spezies das Gen tragen oder auch nicht. So ist der *B. bronchiseptica*-Stamm FR3523 positiv für IS1001, während der Referenzstamm RB50 negativ für dieses Gen ist.

Der Master-Mix 1 (blau) ermöglicht den Nachweis von *B. pertussis* oder *B. holmesii*, und Master-Mix 2 (farblos) den Nachweis von *B. parapertussis*. Die Kombination der Expression der in den beiden Vertiefungen nachgewiesenen verschiedenen Gene ermöglicht die Identifizierung der anderen Spezies *B. bronchiseptica*.

11 I LEISTUNG

- **Analytische Sensitivität:**

Die Nachweisgrenze (LoD) des BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Kits ist definiert als eine in einer spezifischen *Bordetella*-DNA-Probe nachweisbare Konzentration von mindestens 95 %.

Nachweisgrenzen für extrahierte DNA-Proben nach Spezies:

Der LoD_{95}-Wert der extrahierten DNA wird in der Anzahl der DNA-Kopien/µl ausgedrückt. Die quantifizierten DNA-Extrakte wurden bei Vircell (Amplirun®) gekauft. Die LoD für *Bordetella holmesii* wurden im Master-Mix 1 bewertet, da er positiv für das Gen IS481 ist, für *Bordetella pertussis* im Master-Mix 1, da er positiv für beide Ziele IS481 und ptxA-Pr ist, und für *Bordetella parapertussis* im Master-Mix 2, da er positiv für IS1001 und beide FLA-Gene ist. Die quantifizierte DNA von B. bronchiseptica ist nicht auf dem Markt erhältlich, daher konnte der LoD_{95}-Wert für diese Spezies nicht ermittelt werden.

Der LoD_{95}-Wert des BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella in extrahierter DNA wurde für jeden Stamm und jede Gensequenz statistisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Bordetella-Stamm	LoD_{95} (Kopien/µl)
Bordetella pertussis	IS481: 0,043 ptxA-Pr: 4,017
Bordetella parapertussis	IS1001: 0,265 FLA 1: 18,418 FLA 2: 16,033
Bordetella holmesii	IS481: 0,253

Nachweisgrenzen für Proben, die mit dem Transportmedium des AMPLIQUICK Probenentnahmekits entnommen und mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysekit aufbereitet wurden:

Die LoD wurden bestimmt, indem eine Reihe von Verdünnungen einer Referenzprobe mit einer bekannten KBE/ml-Konzentration in qualifizierten Bordetella-negativen, in das Transportmedium des BIOSYNEX AMPLIQUICK Probenentnahmekits abgegebenen und mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysekit aufbereiteten Nasopharyngealabstrichen (oder negativen Nasenaspiraten) durchgeführt wurden.

Der LoD_{95}-Wert des BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella in mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysekit behandelter DNA wurde für jeden Stamm und jede Gensequenz statistisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Bordetella-Stamm	LoD_{95} für Nasopharyngealabstriche				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA 4
Bordetella pertussis	22.837 KBE/ml	451.291 KBE/ml	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	38.264 KBE/ml	528.032 KBE/ml	429.806 KBE/ml
Bordetella holmesii	113.354 KBE/ml	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1791.123 KBE/ml

Bordetella-Stamm	LoD$_{95}$ für Nasenaspirate				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA 4
Bordetella pertussis	36.679 KBE/ml	2758.238 KBE/ml	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	52.0 KBE/ml	1535,5 KBE/ml	445.297 KBE/ml
Bordetella holmesii	87.674 KBE/ml	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1101.8 KBE/ml

- **Analytische Spezifität**

Das Design von Oligonukleotiden (Primer und Sonden) wurde *in silico* durch BLAST-Alignment validiert. Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen zeigt einen spezifischen Nachweis der BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Ziele.
Keine Primer oder Sonden weisen andere bakterielle DNA nach als die der 4 anvisierten Bordetella-Spezies.

Es wurden 18 DNA-Extrakte von qualifizierten und Referenzstämmen getestet.
11 für Keuchhusten und andere Bordetellosen positive DNA-Extrakte aus dem französischen Nationalen Referenzzentrum, 3 Kontroll-DNA-Sequenzen aus einer Biobank (Amplirun®,, Vircell) und 4 Kulturen eines Standard-Bakterienstamms (Zeptometrix®).

	Kontroll-DNA		IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA1	FLA2
Biobank	*Bordetella pertussis-DNA*		+	+	-	-	-
	Bordetella parapertussis-DNA		-	-	+	+	+
	Bordetella holmesii-DNA		+	-	-	-	-
	Spezies	**Stamm**	**IS481**	**ptxA-Pr**	**IS1001**	**FLA1**	**FLA2**
Standardkultur	*Bordetella pertussis*	A639	+	+	-	-	-
	Bordetella parapertussis	A747	-	-	+	+	+
	Bordetella holmesii	F061	+	-	-	-	-
	Bordetella bronchiseptica	Z341	-	-	-	+	-
NRC	*Bordetella bronchiseptica*	RB50	+	-	-	-	+
		LAR	+	-	-	+	+
		FR3523	-	-	+	-	+
	Bordetella Petrii	KMBW	-	-	-	-	-
		FR5141	-	-	-	-	-
	Bordetella avium	CIP103348T	-	-	-	-	-
		FR6062	-	-	-	-	-
	Bordetella hinzii	CIP104527T	-	-	-	-	-
		FR5948	-	-	-	-	-
	Bordetella trematum	CIP105351T	-	-	-	-	-
		FR5853	-	-	-	-	-

Kreuzreaktivität

Ein Panel von 76 DNA-Proben und 38 RNA-Proben aus einer in den folgenden Tabellen aufgeführten Biobank wurde mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Kit getestet. Bei keiner dieser Proben wurde eine Amplifikation der Ziele von Interesse beobachtet.

DNA		
Acanthamoeba castellanii	*Escherichia coli (ETEC)*	*Neisseria meningitidis Sg A*
Adenovirus	*Escherichia coli (VTEC)*	*Neisseria meningitidis Sg B*
Adenovirus 41	*Francisella tularensis*	*Neisseria meningitidis Sg C*
Aspergillus fumigatus	*Gardnerella vaginalis*	*Papillomavirus Typ 16*
Bacillus cereus	*Giardia intestinalis*	*Papillomavirus Typ 18*
Bartonella henselae	*Haemophilus ducreyi*	*Parvovirus B19 (Plasmid)*
Bartonella Quintana	*Haemophilus influenzae*	*Rickettsia conorii*
Bk-Virus	*Helicobacter pylori*	*Salmonella enteritidis*
Borrelia afzelii	*Herpes simplex 1*	*Salmonella typhi*
Borrelia burgdorferi	*Herpes simplex 2*	*Staphylococcus aureus (MecA-)*
Brucella abortus	*Hhv-6*	*Staphylococcus aureus (MecA+)*
Campylobacter jejuni	*Hhv-8*	*Streptococcus agalactiae*
Candida albicans	*Klebsiella pneumoniae (NDM-1)*	*Toxoplasma gondii*
Candida auris	*Legionella pneumophila*	*Treponema pallidum*
Chlamydia trachomatis	*Leishmania chagasi*	*Trichomonas vaginalis*
Chlamydophila pneumoniae	*Leishmania infantum*	*Trypanosoma cruzi*
Chlamydophila psittaci	*Listeria monocytogenes*	*Ureaplasma parvum*
Clostridium difficile	*Moraxella catarrhalis*	*Ureaplasma urealyticum*
Coccidioides immitis	*Mycobacterium avium*	*Varicella-Zoster-Virus*
Coxiella burnetii	*Mycobacterium intracellulare*	*Vibrio cholerae*
Cryptosporidium parvum	*Mycobacterium kansasii*	*Yersinia enterocolitica*
Enterococcus faecalis (VanB)	*Mycobacterium tuberculosis*	*Borrelia garinii*
Enterococcus faecium (VanA)	*Mycobacterium ulcerans*	*Cytomegalovirus*
Epstein-Barr-Virus	*Mycoplasma genitalium*	*Streptococcus pneumoniae*
Escherichia coli (EAEC)	*Mycoplasma hominis*	
Escherichia coli (EIEC)	*Neisseria gonorrhoeae*	

RNA		
Coronavirus Oc43	*Humane Parainfluenza 1*	*Parainfluenza 4 A*
Chikungunya-Virus	*Influenza A H1*	*Respiratorisches Synzytialvirus (Subtyp A)*
Coronavirus	*Influenza A H3*	*Respiratorisches Synzytialvirus (Subtyp B)*
Coronavirus SARS (2003)	*Influenza A H5*	*Rhinovirus*
Coxsackie A6	*Influenza B*	*Rotavirus*
Coxsackie B1	*Masern*	*Röteln*
Coxsackie B5	*MERS-Coronavirus*	*SARS-CoV-2*
Dengue-Virus 1	*Mumps*	*Virus der durch Zecken übertragenen Enzephalitis*
Dengue-Virus 2	*Norovirus*	*West-Nil-Virus*
Dengue-Virus 3	*Novel Influenza A H1n1*	*Gelbfieber-Virus*
Dengue-Virus 4	*Parainfluenza 1*	*Zikavirus*
Echovirus 5	*Parainfluenza 2*	*Zikavirus (asiatischer Genotyp)*
Enterovirus 68	*Parainfluenza 3*	

- **Störende Substanzen**

Das Vorliegen von PCR-Inhibitoren in der Probe kann die Testergebnisse positiv oder negativ beeinflussen. Das Vorliegen verschiedener Inhibitoren in den Proben wurde getestet.

Nasensprays

Beim Versetzen des Transportmediums des BIOSYNEX AMPLIQUICK Probenentnahmekits mit bis zu 10 % einer mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysekit behandelten Nasopharynxsekret-Matrix wurde keine positive oder negative Interferenz mit den folgenden Substanzen festgestellt:

Produkt	Wirkstoff
Nasacort	Triamcinolonacetonid
Aturgyl	Oxymetazolin
Beconase	Beclometasondipropionat
Budesonid	Budesonid
Mometason	Mometason
Avamys	Fluticasonfuroat
Fixorinox	Fluticasonpropionat

Blut

Das Vorliegen von Blut in Nasopharyngealabstrichen kann die PCR-Testergebnisse positiv oder negativ beeinflussen. Unsere Untersuchung zeigt, dass Blutkonzentrationen von bis zu 1 % die PCR-Reaktion nicht stören, wenn das BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Kit zusammen mit den BIOSYNEX AMPLIQUICK Probenentnahmekit und dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysekit verwendet wird. Bei Blutkonzentrationen von ≥ 2 % nimmt die Sensitivität ab. Daher sollte die Blutkonzentration in der Probe 1 % nicht überschreiten.

- **Klinische Eigenschaften**

Die klinische Leistung wurde an 146 Proben aus vier verschiedenen Labors bestimmt, die mit Hilfe von durch das französische Gesundheitsministerium empfohlenen CE-gekennzeichneten PCR-Tests als positiv oder negativ für *B. pertussis* oder *B. parapertussis* eingestuft wurden.

Diese Tests ermöglichen die Identifizierung dieser beiden Stämme durch die Amplifikation der Gene IS481 und IS1001, die auch in den *B. holmesii*- und *B. bronchiseptica*-Stämmen vorhanden sind.

Die Proben wurden mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Kit an aufgereinigten DNA-Extrakten oder nach Behandlung mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysekit qualifiziert.

	Anzahl der Proben	*B. pertussis*		*B. parapertussis*		*Koninfektionen*	*Negativ für Bordetella*
		+	-	+	-		
Labor 1	63	58	1	8	51	8*	5
Labor 2	12	12	0	2	10	2	0
Labor 3	31	0	0	0	0	0	31
Labor 4	40	0	0	0	0	0	40

*Unter den 8 als positiv für *B. pertussis* und *B. parapertussis* klassifizierten Proben aus Labor 1 wurde mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Kit und einem anderen auf dem Markt erhältlichen CE-gekennzeichneten Kit keine Koinfektion bestätigt.

Die nachfolgende Kontingenztabelle zeigt die Leistung des BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Kits bei Proben nach der DNA-Extraktion/Aufreinigung mit einem kommerziellen Kit:

		PCR-Referenztest	
		Positiv	Negativ
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positiv	69	0
	Negativ	1	76

Sensitivität: 98,57 % (95-%-KI : 92,30 % bis 99,96 %)

Spezifizität: 100 % (95-%-KI: 95,26 % bis 100 %)

Die nachfolgende Kontingenztabelle zeigt die Leistung von BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella bei Proben, die mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysekit behandelt wurden:

		PCR-Referenztest	
		Positiv	Negativ
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positiv	66	0
	Negativ	4	76

Sensitivität: 94,29 % (95-%-KI: 86,01 % bis 98,42 %)

Spezifizität: 100% (95-%-KI: 95,26 % bis 100 %)

Für diese Untersuchung hatten wir keinen Zugang zu klinischen Proben von Patienten, die positiv für *B. bronchiseptica* und *B. holmessi* waren (seltene Proben). Die Leistung des Kits für diese beiden Spezies wurde anhand von durch das französische nationale Referenzzentrum bereitgestellten Keuchhusten- und andere Bordetellose-Stämmen validiert.

- **Testgenauigkeit**

Die Genauigkeitsdaten im Kontext des BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-Kits wurden anhand von vier Bedingungen ermittelt:

- Intra-Assay-Variabilität (innerhalb eines Tages und eines Experiments)
- Variabilität zwischen Tagen
- Variabilität zwischen Anwendern
- Variabilität zwischen Chargen

Die Variabilitätsdaten werden als Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient ausgedrückt, basierend auf den Schwellenwerten des Quantifizierungszyklus (Cq) der Bordetella-DNA.

Daten zur Intra-Assay-Variabilität:

Für jede mit dem Kit nachgewiesene Bordetella-Spezies wurden zwei Probenverdünnungen getestet: 1 starke (+++) entsprechend 1000 Kopien/µl und 1 geringe (+) entsprechend 10 Kopien/µl. Für *B. pertussis* und *B. parapertussis* wurden zwei verschiedene geringe Verdünnungen verwendet, da ihre beiden positiven Ziele eine unterschiedliche Sensitivität aufweisen und das IS481- und das IS1001-Gen Multikopie-Gene und das ptxA-Pr- und FLA-Gen Monokopie-Gene sind.

Jede Probe wurde 30 Mal getestet.

Extrahierte DNA

			Mix 1						Mix 2		
	Probenverdünnung	**Ziel**	**Mittelwert Cq**	**SD**	**VK %**		**Probenverdünnung**	**Ziel**	**Mittelwert Cq**	**SD**	**VK %**
B pertussis	+++	IS481	13,3	0,1	0,9	***B parapertussis***	+++	IS1001	15,8	0,3	1,7
	+ (ptxA-Pr)		27,4	1,1	4,0		+ (FLA1 und 2)		29,1	0,1	0,5
	- (IS481)		34,7	0,3	1,0		+ (IS1001)		35,1	0,7	1,9
	+++	ptxA-Pr	19,6	0,2	0,8		+++	FLA1	21,5	0,2	0,8
	+ (ptxA-Pr)		34,3	0,7	2,2		+ (FLA1 und 2)		35,2	0,4	1,2
							+++	FLA2	21,9	0,2	0,8
							(FLA1 und 2)		34,7	0,3	0,9
B holmesii	+++	IS481	21,2	0,1	0,7	***B bronchiseptica***	+++	FLA 2	21,8	0,1	0,6
	+		36,2	0,5	1,3		+		36,6	0,6	1,7

Vorbehandlung mit dem BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysekit

	Probenverdünnung	Ziel	Mix 1 Mittelwert Cq	SD	VK %
B pertussis	+++	IS481	14,7	0,2	1,0
	+ (ptxA-Pr)		28,8	1,0	3,4
	+ (IS481)		34,4	1,2	3,4
	+++	ptxA-Pr	22,4	0,1	0,6
	+ (ptxA-Pr)		35,5	1,1	3,0
B holmesii	+++	IS481	21,5	0,0	0,2
	+		35,4	1,4	4,0

	Probenverdünnung	Ziel	Mix 2 Mittelwert Cq	SD	VK %
B parapertussis	+++	IS1001	13,7	0,2	1,2
	+ (FLA1 und 2)		31,3	0,2	0,8
	+ (IS1001)		34,5	0,8	2,4
	+++	FLA1	19,2	0,2	1,1
	+ (FLA1 und 2)		37,1	0,6	1,7
	+++	FLA2	18,9	0,2	1,1
	(FLA1 und 2)		34,9	0,5	1,4
B bronchiseptica	+++	FLA 2	18,6	0,2	0,8
	+		34,8	0,3	0,8

Daten zur Inter-Assay-Variabilität:
Für jede mit dem Kit nachgewiesene Bordetella-Spezies wurden zwei Probenverdünnungen getestet: 1 starke (+++) entsprechend 1000 Kopien/µl und 1 geringe (+) entsprechend 10 Kopien/µl.
Jede Probe wird 5 Tage lang zweimal täglich in Doppelbestimmung untersucht.
Negative Proben liefern negative Ergebnisse.

	+++			+		
Gen	Durchschnittlicher Cq-Wert Probe +++	Standardabweichung	Variationskoeffizient %	Durchschnittlicher Cq-Wert Probe +	Standardabweichung	Variationskoeffizient %
IS481	27,7	0,1	0,4	33,9	0,2	0,6
ptxA-Pr	27,3	0,1	0,3	33,4	0,2	0,5
IS1001	27,6	0,1	0,4	33,6	0,3	0,8
FLA1	29,5	0,2	0,6	35,7	0,1	0,4
FLA2	28,6	0,2	0,8	34,7	0,3	0,7

Variabilität zwischen Anwendern:
Für jede mit dem Kit nachgewiesene Bordetella-Spezies wurden zwei Probenverdünnungen getestet: 1 starke (+++) entsprechend 1000 Kopien/µl und 1 geringe (+) entsprechend 10 Kopien/µl.
Zweimal täglich von zwei verschiedenen Anwendern über einen Zeitraum von 5 Tagen
Negative Proben liefern negative Ergebnisse.

	+++			+		
Gen	Durchschnittlicher Cq-Wert Probe +++	Standardabweichung	Variationskoeffizient %	Durchschnittlicher Cq-Wert Probe +	Standardabweichung	Variationskoeffizient %
IS481	27,6	0,1	0,4	33,9	0,0	0,1
ptxA-Pr	27,2	0,1	0,4	33,4	0,0	0,1
IS1001	27,5	0,1	0,2	33,6	0,0	0,1
FLA1	29,4	0,1	0,4	35,6	0,0	0,1
FLA2	28,6	0,0	0,0	34,8	0,0	0,1

Variabilität zwischen Chargen:
Für jede mit dem Kit nachgewiesene Bordetella-Spezies wurden zwei Probenverdünnungen getestet: 1 starke (+++) entsprechend 1000 Kopien/µl und 1 geringe (+) entsprechend 10 Kopien/µl.
Jede Probe wurde an zwei verschiedenen Chargen in Doppel- oder Dreifachbestimmung getestet.
Negative Proben liefern negative Ergebnisse.

	+++			+		
Gen	Durchschnittlicher Cq-Wert Probe +++	Standardabweichung	Variationskoeffizient %	Durchschnittlicher Cq-Wert Probe +	Standardabweichung	Variationskoeffizient %
IS481	26,9	0,2	0,6	33,4	0,4	1,1
ptxA-Pr	27,4	0,1	0,5	33,7	0,7	2,0
IS1001	26,9	0,0	0,0	33,0	0,3	0,9
FLA1	29,1	0,1	0,5	35,1	0,0	0,0
FLA2	28,5	0,0	0,1	34,6	0,1	0,3

12 I EINSCHRÄNKUNGEN

1. Die Nichtbeachtung einer Anweisung in dieser Gebrauchsanweisung kann die Testleistung beeinträchtigen und schädliche Folgen haben.
2. Wie bei allen diagnostischen Tests müssen die Ergebnisse zusammen mit anderen dem Arzt zur Verfügung stehenden klinischen Informationen bewertet werden. Bei einem negativen Ergebnis kann das Vorliegen von Bordetella in der Probe nicht ausgeschlossen werden (d. h., dass Gene in einer Konzentration vorliegen können, die unterhalb der Mindestnachweisgrenze des Tests liegt, Interferenz), und ein positives Ergebnis kann niemals das Vorliegen von Bordetella in der Probe garantieren (z. B. Kontamination). Eine endgültige Diagnose kann nur vom Arzt nach Auswertung aller klinischen und labortechnischen Daten gestellt werden.
3. Proben mit mehr als 1 % Blut können das Testergebnis verfälschen. Wenn die Probe Blut enthält, ist das Ergebnis mit Vorsicht zu betrachten.

13 I LITERATUR

- Pittet LF, Emonet S, Schrenzel J, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Bordetella holmesii : an under-recognized Bordetella species. The Lancet Infectious Diseases. 2014; 14(6):510-9.
- Pittet LF, Emonet S, François P, Bonetti EJ, Schrenzel J, Hug M, Altwegg M, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Diagnosis of whooping cough in Switzerland: Differentiating Bordetella pertussis from Bordetella holmesii by polymerase chain reaction. PLoS One. 2014; 9(2): e88936
-Sanz JC, Abad R, Sanz C, Miguel A. Diagnóstico diferencial de Bordetella bronchiseptica por RT-PCR en un ní̃no con tos paroxística sin antecedentes patológicos previos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.09.016

14 I INTERNATIONALE SYMBOLE

	Gebrauchsanweisung oder elektronische Gebrauchsanweisung beachten		Inhalt ausreichend für <n> Tests	REF	Katalognummer
IVD	Medizingerät zur *In-vitro*-Diagnostik		Temperaturgrenzwert		Nicht wiederverwenden
	Hersteller	LOT	Chargencode		Verfallsdatum
	Von Sonnenlicht fernhalten	Mmix	Master-Mix		Mikrotiterplatte
CONTROL -	Negativkontrolle	CONTROL +	Positivkontrolle	UDI	Unique Device Identifier
	Beutel mit Kappenstreifen		Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist, und die Gebrauchsanweisung konsultieren	CH REP	Bevollmächtigter Vertreter in der Schweiz
	Importeur	+/-	Qualitativer Nachweis durch PCR		

15 I HERSTELLERINFORMATIONEN

BIOSYNEX S.A.
22 boulevard Sébastien Brant
67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN – France
Standard :
Telefon : +33 3 88 78 78 87
www.biosynex.com
Kontakte Frankreich :
Telefon : +33 3 88 77 57 00
service.clients@biosynex.com
Kontakte andere Länder :
Telefon: +33 3 88 77 57 52
sales@biosynex.com
Kundendienst :
Telefon : +33 3 88 77 57 25
Tech.support@biosynex.com

CH REP
BIOSYNEX SWISS S.A.
Route de Rossemaison 100
2800 DELEMONT - Switzerland

Letzte Änderungen:
Aktualisierung der Tabelle mit den Symbolen und Kontaktdaten des Herstellers.
§7: Korrektur zu Saugproben.

ES

CE 0123

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella

BORDETELLA PARAPERTUSSIS, *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* Y *BORDETELLA HOLMESII* EN HISOPOS NASOFARÍNGEOS O ASPIRADOS NASALES.

Solo para diagnóstico profesional in vitro.

REF 3150068_SEC01 / 3150068_SEC02

1 I FINALIDAD PREVISTA

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella es una prueba diagnóstica *in vitro* para la detección cualitativa mediante PCR cualitativa y diferenciación de 4 especies bacterianas del género *Bordetella* detectadas en la medicina humana: *B. pertussis, B. parapertussis, B. bronchiseptica* y *B. holmesii*. La prueba es una ayuda para el diagnóstico de la tosferina que se realiza con extracto de ADN obtenido de hisopos nasofaríngeos o aspirados nasales. Esta prueba no automatizada esta destinada solo al uso diagnóstico *in vitro* en laboratorios por profesionales.

2 I SUMARIO CLÍNICO

El género *Bordetella* está compuesto por 9 especies diferentes. Las principales especies responsables de enfermedades respiratorias en seres humanos son:

- *B. pertussis* que es el agente responsable de la tosferina y cuyo reservorio es exclusivamente humano,
- *B. parapertussis*, una especie cercana a B. pertussis, pero que no secreta la toxina pertussis, y que puede ser responsable de un síndrome de la tosferina que suele ser menos grave.
- *B. bronchiseptica*, que afecta a una gran cantidad de mamíferos y responsable de infecciones respiratorias en el ser humano, principalmente en los pacientes inmunocomprometidos,
- y *B. holmesii*, que también puede ser responsable de síntomas respiratorios similares a la tosferina e incluso la septicemia.

En pacientes no vacunados o aquellos cuyo estado de vacunación para la tosferina se desconozca y que presenten tos persistente, debe realizarse la prueba de *Bordetella* tan pronto como sea posible para iniciar el tratamiento antibiótico y aislar al paciente para romper la cadena de infección.

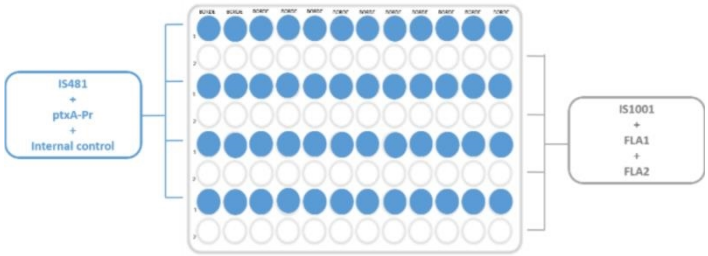
El diagnóstico de tosferina mediante PCR debe hacer en las tres primera semanas desde el inicio de los síntomas.

3 I PRINCIPIO DEL TEST

El kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella es una prueba para el diagnóstico *in vitro* basada en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real mediante hidrólisis con sondas fluorescentes. Consta de placas de 96 micropocillos precargados con dos Master Mixes listas para usar con dNTP, MgCl2, cebadores y sondas fluorescentes, la enzima polimerasa Taq y un tampón de reacción.

El ensayo consta de un paso de PCR múltiple que se lleva a cabo en un termociclador en tiempo real, lo que permite la amplificación específica y la detección simultánea de objetivos moleculares que llevan las secuencias de interés: el operón TOX (secuencia IS481), la región promotora de la toxina *pertussis* (ptxA-Pr), la secuencia de inserción h-IS1001 específica de *B. holmesii,* y el gen de la flagelina específico de *B. parapertussis* y que permite diferenciarlos de *B. bronchiseptica* en dos pasos (secuencias FLA1 y FLA2), así como el control del procedimiento interno (gen de la ribonucleasa humana), lo que permite evaluar la calidad de la recogida de muestras biológicas, así como validar los pasos de extracción y purificación del ADN.

Para este fin, se utilizan dos Master Mixescon sondas marcadas con los fluoróforos FAM, HEX y Cy5.



En la Master Mixes de color azul contenida en los pocillos con la marca «1» en la placa precargada, se utiliza el fluoróforo FAM para la amplificación específica de la secuencia de IS481, HEX para la secuencia ptxA-PR y Cy5 para el gen ribonucleasa P. En la Master Mixes transparente contenida en los pocillos con la marca «2» en la placa precargada, se utiliza el fluoróforo FAM para la amplificación específica de la secuencia de IS1001, HEX para la secuencia FLA1 y Cy5 para la secuencia FLA2.
La determinación de la especie *Bordetella* depende de la combinación de detección de estos genes como se describe en el párrafo 10.

El aumento de la señal de fluorescencia solo se detecta si la secuencia objetivo complementaria a la sonda amplificada está presente en la muestra. La señal fluorescente es, por tanto, directamente proporcional a la amplificación del objetivo durante la fase de amplificación. El valor Cq (cuantificación del ciclo) corresponde al número de ciclos en el que la fluorescencia comienza a aumentar exponencialmente en contraste con el fondo. El kit puede utilizarse en dos tipos de muestras:
- hisopos nasofaríngeos
- aspirados nasofaríngeos o endonasales

Antes de su uso con el kit de amplificación BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella (párrafo 9),
Las muestras deben recogerse y tratarse primero conforme a los procedimientos detallados en los párrafos 7 y 8 con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (ref. 3150060 y referencias relacionadas) y el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (ref. 3150059 y referencias relacionadas), o tratadas para obtener extractos de ADN purificados con un kit adecuado.

4 I CONTENIDO DEL KIT

Material incluido

- 2 microplacas divisibles de 96 pocillos precargadas con mezclas maestras
- 1 tubo de control positivo (CONTROL+, tapón rojo)
- 1 tubo de control negativo (CONTROL-, tapón verde)
- 2 bolsas de tiras de tapones ópticos, para el sellado de las microplacas

Material necesario, pero no suministrado

- Kit de extracción de ADN
- Guantes desechables sin polvo
- Pipetas y puntas con filtro
- Termociclador para PCR en tiempo real
- Centrífuga para microplacas o tubos de PCR

El termociclador para PCR utilizado para la prueba debe tener las siguientes características principales:
- Sistema abierto
- Pruebas PCR cuantitativas en tiempo real
- Bloque termociclador programable

Referencia	Bloque termociclador
3150068_SEC01	0,1 ml perfil bajo
3150068_SEC02	0,2 ml perfil alto

- Fuente de excitación: leds, lámparas o láseres
- Conjuntos de filtros (longitudes de onda de excitación/emisión) adecuados para la detección de fluoróforos «marcadores» de la sondas FAM, HEX y Cy5.
- Conexión con un ordenador que utilice un software de análisis específico que permita la recuperación de los datos de fluorescencia, ensayos de cuantificación absoluta y la interpretación de resultados.

El kit se ha desarrollado y validad con los siguientes termocicladores para PCR en tiempo real:

Referencia	Termociclador
3150068_SEC01	CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) CFX96™ Opus Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) Sistema QuantStudio 5 (Applied Biosystems) LightCycler 480 (Roche) Amplix-DT lite 48 (DNA Technology)
3150068_SEC02	CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) CFX96™ Opus Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) Sistema QuantStudio 5 (Applied Biosystems) Amplix-DT lite 48 (DNA Technology)

Si se utiliza otro termociclador, realice su propia validación del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella con los controles o muestras respiratorias cualificadas facilitadas antes de utilizar la prueba.

5 I PRECAUCIONES

- Siga atentamente las instrucciones de uso. Los fallos al seguir cualquier paso de estas instrucciones de uso pueden alterar negativamente el rendimiento de la prueba y tener consecuencias perjudiciales.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio y utilice guantes de laboratorio desechables sin polvo durante todo el procedimiento de la prueba.
- La gestión diaria de un gran número de muestras y la gran sensibilidad de la técnica de la PCR pueden producir, si no se tiene precaución, resultados positivos falsos por contaminación. Por tanto, la manipulación previa y posterior a la PCR y la extracción del ADN deben hacerse en salas separadas. Lleve guantes desechables en cada una de las zonas y cámbieselos antes de pasar de una a otra.
- La prueba y el tapón son de un solo uso. No los reutilice. No abra los tubos para PCR al final de la prueba.
- No utilice una prueba si el envase de aluminio está abierto o dañado. Una vez retire el papel de aluminio, utilice la prueba de inmediato.
- No utilice el kit si ha llegado descongelado.
- No utilice el kit en caso de rotura o fuga. Si el kit solo presenta daños solo en el envase (sin roturas ni fugas), se sigue pudiendo utilizar.
- Proteja el kit de la luz.
- Centrifugue los tubos antes de abrirlos y abra uno después de haber cerrado bien el anterior para evitar cualquier contaminación.
- El CTRL+ contiene cantidades significativas de secuencias de ADN. Por tanto, puede contaminar el resto de componentes del kit si no se siguen las correctas prácticas de biología molecular. Para limitar este riesgo de contaminación, se recomienda almacenar este componente fuera del kit la primera vez que se abre.
- Los controles positivo y negativo incluidos en el kit imitan los resultados obtenidos con muestras positivas y negativas, respectivamente. Deben utilizarse con cada nueva ejecución.
- Para garantizar que no se produce ninguna contaminación durante la manipulación, se deja a criterio del usuario la inclusión, como parte de su enfoque de calidad interno, y a la frecuencia elegida, un pocillo con control negativo experimental en el que se añaden 8 µl de agua de calidad de biología molecular a la Master Mix.
- Si se utilizan controles positivos y negativos con una serie de pacientes, se recomienda depositar primero el control negativo. A continuación, depositar las muestras de los pacientes y acabar con el depósito del control positivo.
- Deseche las partes manchadas o los componentes del kit vacíos en una papelera adecuada para desechos biológicos.
- El dispositivo contiene material de origen bacteriano y animal y puede transmitir agentes infecciosos, por lo que debe manipularse con extrema precaución.
- Si se produce una muerte o un deterioro grave de la salud relacionados con el uso del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella, debe notificarse al fabricante y a la autoridad competente de su país. En caso de duda, notifíquelo.

- La ficha técnica de seguridad está disponible previa solicitud. El resumen de seguridad y rendimiento estará disponible en línea en Eudamed.

6 I ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

El kit se envía congelado. Los componentes del kit deben llegar congelados. Almacene el kit a una temperatura de -20 °C. En estas condiciones, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. No utilice el kit ni ninguno de sus componentes después de la fecha de caducidad. Proteja el kit y los reactivos de la luz directa del sol.
Los controles positivos y negativos puede someterse a un máximo de 15 ciclos de congelación y descongelación. Saque y descongeles solo el número necesario de tiras de pocillos. Puesto que las tiras están listas para su uso, no hay motivo de someterlas a ciclos de congelación-descongelación repetidos.

7 I OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella permite la amplificación de ADN de las 4 especies de Bordetella. La prueba puede realizarse con extracto de ADN purificado de muestras nasofaríngeas (hisopos) o aspirados nasofaríngeos/endonasales; o las mismas muestras obtenidas en el BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (ref. 3150060 y referencias relacionadas) y tratadas con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (ref. 3150059 y referencias relacionadas).

- Recoja muestras nasofaríngeas con hisopos estériles vertidos en tubos estériles con medio de transporte, o los disponibles en el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (ref. 3150060 y referencias relacionadas).
- Recoja aspirados nasofaríngeos o endonasales con un aspirador de moco conforme a las recomendaciones del fabricante y viértalos en tubos estériles con medio de transporte, o los disponibles en el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (ref. 3150060 y referencias relacionadas). Cuando se utiliza el kit de lisis BIOSYNEX AMPLIQUICK (ref. 3150059), las muestras aspiradas deben utilizarse directamente sin descargarlas en un medio de transporte.

Las muestras vertidas en el medio de transporte BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection pueden extraerse inmediatamente o en el plazo de 4 horas si se conserva a temperatura ambiente, o de 24 horas si se almacena a entre 2 °C y 8 °C.
El transporte de las muestras clínicas debe cumplir las normativas locales para el transporte de microrganismos infecciosos.

8 I EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La extracción de ácidos nucleicos deben hacerse antes del protocolo de amplificación con un sistema de extracción adecuado para ADN bacteriano. Siga las instrucciones del fabricante.
El kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella se ha validado con los siguientes kits de extracción:

- BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (ref. 3150059 y referencias relacionadas). **BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis solo puede utilizarse con las muestras nasofaríngeas recogidas con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection. Las muestras de aspiración pueden utilizarse sin descargarlas en un medio de transporte.**
- QIAamp DNA Mini kit (Qiagen – Ref. 51306)
- NuceloMag Dx Pathogen (Macherey Nagel – 744215.4)
- Kit Amplix Bacterial DNA Extraction en el sistema Amplix Automated (Tecnología ADN - Ref. OP05006)

Si se utiliza otro método o kit de extracción, lleve a cabo su propio método de validación del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella con muestras respiratorias cualificadas antes de utilizar la prueba (no utilice los controles suministradas).

No es necesario extraer los controles negativo y positivo con el kit de extracción de ácido nucleico. Si se retrasa el uso del ADN purificado, antes de añadir la Master Mix, consérvelo a 4 °C o en hielo el día de la prueba.

9 I PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN

Para el diseño de la placa, consulte el párrafo 3.
Se recomienda colocar las tiras de Master Mix en una gradilla refrigerada o en hielo mientras se añaden las muestras.

1. Tome una placa separable en tiras de 8 pocillos y coja el número de tiras necesario. Si se necesita menos de una tira completa de 8 pocillos, se puede cortar horizontalmente con un par de tijeras.
2. Centrifugue las tiras durante unos segundos para recoger cualquier gotícula presente en los bordes del pocillo

o en el cierre.

3. Retire con cuidado y deseche el papel de aluminio. Una vez retire el papel de aluminio, utilice la tira de inmediato.
4. Añada 8 µl de muestra o de control conforme al diseño de la placa.
5. Cierre los pocillos con las tapas transparentes suministradas.
6. Centrifugue las tiras durante unos segundos.
7. Colóquelas en el termociclador y ejecute el siguiente programa de amplificación:

Programa PCR:

Paso	Repeticiones	Temperatura	Duración	Adquisición
Activación de Taq	1x	95°C	3 min.	-
Desnaturalización	50x	95°C	10 s	-
Hibridación/ Elongación		58°C	45 s	sí

Introduzca **20 µl** de volumen de reacción en el programa del termociclador.
Consulte las instrucciones de uso del termociclador utilizado para la información de programación.

Configuración de los canales de detección:

Master Mix azul	
Objetivo	Fluorocromo
IS481	FAM
ptxA-Pr	HEX
Ribonucleasa P (control del procedimiento)	Cy5
Master Mix transparente	
Objetivo	Fluorocromo
IS1001	FAM
FLA1	HEX
FLA2	Cy5

10 I ANÁLISIS DE DATOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

A. Criterios de valoración del ensayo

Control negativo:

La fluorescencia emitida debe estar por debajo del umbral, con la excepción del canal Cy5 de la Master Mix azul. Es un indicador de amplificación no específico. Si la fluorescencia está por encima del umbral, compruebe la existencia de una curva atípica. En el caso de una curva de amplificación, se debe valorar la posibilidad de una contaminación o un error de distribución en los microtubos. Solo debe amplificarse la ribonucleasa P de control interno.

Control positivo:

El valor del control positivo debe detectarse preferentemente antes de 30 ciclos (Cq ≤ 30). En ausencia de amplificación del control positivo, debe considerarse la existencia de un problema de amplificación o de detección de la fluorescencia (termociclador defectuosos o instrumento no adaptado al método).

Control de amplificación interno:

La ribonucleasa P de control interno exógena garantiza que las enzimas de la Master Mix sean funcionales y valida los pasos de recogida y extracción del ácido nucleico. De hecho, la curva de amplificación del control del procedimiento con ribonucleasa P debe observarse en el canal Cy5 de los pocillos que contienen la Master Mix de color azul.
No obstante, pueden observarse dos situaciones de falta de amplificación del control interno:

- Si los genes objetivo están inicialmente presentes en la muestra con un número mayor de copias, el control interno puede no estar amplificado. Este resultado es coherente y no invalida la prueba. Debe interpretarse con un resultado positivo a pesar de la ausencia de señal del control interno. Este fenómeno es el resultado de la competencia en la amplificación entre el control interno y los objetivos presentes en un alto número de copias.
- Si los genes objetivo en los canales FAM y HEX no se amplifican, al igual que el control interno en el canal Cy5 en la Master Mix azul, no se puede entregar ningún resultado. Esta situación saca a relucir la presencia de inhibidores de la PCR. La PCR debe repetirse desde la muestra principal y preferentemente en extracto de ADN.

B. Interpretación cualitativa (positiva o negativa)

Las señales por encima del umbral, **y visualmente coherentes con una curva de amplificación de una PCR clásica**, se consideran resultados positivos.
Algunas muestras pueden presentar curvas atípicas que no son características de las curvas de amplificación. En este caso, el resultado no debe considerarse interpretable y el análisis de la muestra debe repetirse con los controles.

Canales de detección						Interpretación
Master Mix azul 1			Master Mix transparente 2			
FAM (IS481)	HEX (ptxA-Pr)	Cy5 (Ribonucleasa P)	FAM (IS1001)	HEX (FLA1)	Cy5 (FLA2)	
-	-	+	-	-	-	Control negativo
+	+	+	+	+	+	Control positivo
+	+	+	-	-	-	Paciente con ADN específico de *B. pertussis*
+	+	-	-	-	-	
+	-	+	-	-	-	Paciente con ADN específico de *B. homesii*
+	-	-	-	-	-	
+ Si Cq >30	-	+/-	-	-	-	Paciente con ADN de *Bordetella spp*
-	-	+	+	+	+	Paciente con ADN específico de *B. parapertussis*
-	-	-	+	+	+	
-	-	+/-	+ Si Cq >30	-	-	Paciente con ADN de *B. parapertussis o B. bronchiseptica*
+/-*	-	+	+/-*	-	+	Paciente con ADN específico de *B. bronchiseptica*
+/-*	-	-	+/-*	-	+	
-	-	-	-	-	-	Resultado no válido, repetir prueba

*El resultado es dependiente de la cepa. En efecto, en función de la cepa, algunas especies puede llevar o no el gen. Así, la cepa *B. bronchiseptica* FR3523 es positiva para IS1001 mientras que la cepa de referencia RB50 es negativa para este gen.

La Master Mix 1 (azul) permite la detección de *B. pertussis* o *B holmesii* y la Master Mix 2 (incolora), la detección de *B. parapertussis*. La combinación de la expresión de los diferentes genes detectados en los dos pocillos permite la identificación de la otra especie, *B. bronchiseptica*.

11 I RESULTADOS

- **Sensibilidad analítica**

El límite de detección (LD) del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella se define como la concentración que puede detectarse en el 95 % como mínimo de una muestra de ADN de *Bordetella* concreta.

Límites de detección en muestras de ADN extraídas por especie:
El LD_{95} en ADN extraído se expresa en número de copias de ADN/µl. Los extractos de ADN se compraron en Vircell (Amplirun®). Se analizaron los LD para *Bordetella holmesii* en la Master Mix 1, ya que es positiva para el gen IS481, *Bordetella pertussis* en la Master Mix 1, ya que es positiva para ambos objetivos IS481 y ptxA-Pr y para *Bordetella parapertussis* en la Master Mix 2, ya que es positiva para IS1001 y ambos genes FLA. El ADN cuantificado de *B. bronchiseptica* no está disponible en el mercado, por lo tanto, el LD_{95} no se pudo determinar para esta especie.
El LD_{95} de BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella en ADN extraído se ha determinado estadísticamente para cada cepa y secuencia de genes. Los resultados se indican en la tabla siguiente.

Cepa de Bordetella	LD_{95} (copias/µl)
Bordetella pertussis	IS481: 0,043 ptxA-Pr: 4,017
Bordetella parapertussis	IS1001: 0,265 FLA 1: 18,418 FLA 2: 16,033
Bordetella holmesii	IS481: 0,253

Límites de detección para las muestras obtenidas con el medio de transporte AMPLIQUICK Sample Collection y tratadas con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis:
Los LD se determinaron mediante una serie de diluciones de una muestra de referencia con una concentración conocida de UFC/ml en hisopos nasofaríngeos negativos para *Bordetella* cualificados vertidos en medio de transporte BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection o muestras negativas de aspirado nasal y tratadas con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis.

El LD_{95} de BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella en ADN tratado con BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis se ha determinado estadísticamente para cada cepa y secuencia de genes. Los resultados se indican en las tablas siguientes.

Cepa de *Bordetella*	LD_{95} para hisopos nasofaríngeos				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA 4
Bordetella pertussis	22 837 UFC/ml	451 291 UFC/ml	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	38 264 UFC/ml	528 032 UFC/ml	429 806 UFC/ml
Bordetella holmesii	113 354 UFC/ml	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1791,123 UFC/ml

Cepa de *Bordetella*	LD_{95} para aspirados nasales				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA 4
Bordetella pertussis	36,679 UFC/ml	2758,238 UFC/ml	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	52,0 UFC/ml	1535,5 UFC/ml	445,297 UFC/ml
Bordetella holmesii	87,674 UFC/ml	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1101,8 UFC/ml

- **Especificidad analítica**

El diseño de oligonucleótidos (cebadores y sondas) se validó por ordenador mediante alineación BLAST. La comparación de las secuencias obtenidas muestra una detección específica de los objetivos del BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella.
Ningún cebador ni sonda detectó ADN bacteriano diferente del de las 4 especies de *Bortedella* objetivo.

Se analizaron 18 extractos de ADN de cepas cualificadas y referenciadas.
11 extractos de ADN del Centro de Referencia Nacional de Francia positivos para tosferina y otras bordetelosis, ,3 secuencias de ADN de control de un biobanco (Amplirun®, Vircell) y 4 cultivos de cepa bacteriana estándar (Zeptometrix®).

	ADN de control		IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA1	FLA2
Biobanco	*ADN de Bordetella pertussis*		+	+	-	-	-
	ADN de Bordetella parapertussis		-	-	+	+	+
	ADN de Bordetella holmesii		+	-	-	-	-
	Especies	**Cepa**	**IS481**	**ptxA-Pr**	**IS1001**	**FLA1**	**FLA2**
Cultivo estándar	*Bordetella pertussis*	A639	+	+	-	-	-
	Bordetella parapertussis	A747	-	-	+	+	+
	Bordetella holmesii	F061	+	-	-	-	-
	Bordetella bronchiseptica	Z341	-	-	-	+	-
CNR	*Bordetella bronchiseptica*	RB50	+	-	-	-	+
		LAR	+	-	-	+	+
		FR3523	-	-	+	-	+
	Bordetella Petrii	KMBW	-	-	-	-	-
		FR5141	-	-	-	-	-
	Bordetella avium	CIP103348T	-	-	-	-	-
		FR6062	-	-	-	-	-
	Bordetella hinzii	CIP104527T	-	-	-	-	-
		FR5948	-	-	-	-	-
	Bordetella trematum	CIP105351T	-	-	-	-	-
		FR5853	-	-	-	-	-

Reactividad cruzada

Se analizó una serie de 76 muestras de ADN y 38 muestras de ARN procedentes de un biobanco que aparecen recogidas en las tablas siguientes con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella. Para todas estas muestras, no se observó amplificación de los objetivos de interés.

ADN		
Acanthamoeba castellanii	*Escherichia coli (ETEC)*	*Neisseria meningitidis Sg A*
Adenovirus	*Escherichia coli (VTEC)*	*Neisseria meningitidis Sg B*
Adenovirus 41	*Francisella tularensis*	*Neisseria meningitidis Sg C*
Aspergillus fumigatus	*Gardnerella vaginalis*	*Papillomavirus tipo 16*
Bacillus cereus	*Giardia intestinalis*	*Papillomavirus tipo 18*
Bartonella henselae	*Haemophilus ducreyi*	*Parvovirus B19 (Plásmido)*
Bartonella Quintana	*Hemophilus influenzae*	*Rickettsia conorii*
Bk Virus	*Helicobacter pylori*	*Salmonella enteritidis*
Borrelia afzelii	*Herpes simplex 1*	*Salmonella typhi*
Borrelia burgdorferi	*Herpes simplex 2*	*Staphylococcus aureus (MecA-)*
Brucella abortus	*Hhv-6*	*Staphylococcus aureus (MecA+)*
Campylobacter jejuni	*Hhv-8*	*Streptococcus agalactiae*
Candida albicans	*Klebsiella pneumoniae (NDM-1)*	*Toxoplasma gondii*
Candida auris	*Legionella pneumophila*	*Treponema pallidum*
Chlamydia trachomatis	*Leishmania chagasi*	*Trichomonas vaginalis*
Chlamydophila pneumoniae	*Leishmania infantum*	*Trypanosoma cruzi*
Chlamydophila psittaci	*Listeria monocytogenes*	*Ureaplasma parvum*
Clostridium difficile	*Moraxella catarrhalis*	*Ureaplasma urealyticum*
Coccidioides immitis	*Mycobacterium avium*	*Virus Varicela-Zóster*
Coxiella burnetii	*Mycobacterium intracellulare*	*Vibrio cholerae*
Cryptosporidium parvum	*Mycobacterium kansasii*	*Yersinia enterocolitica*
Enterococcus faecalis (VanB)	*Mycobacterium tuberculosis*	*Borrelia garinii*
Enterococcus faecium (VanA)	*Mycobacterium ulcerans*	*Citomegalovirus*
Virus de Epstein-Barr	*Mycoplasma genitalium*	*Streptococcus pneumoniae*
Escherichia coli (EAEC)	*Mycoplasma hominis*	
Escherichia coli (EIEC)	*Neisseria gonorrhoeae*	

ARN		
Coronavirus Oc43	*Virus paragripal 1 humano*	*Paragripal 4 A*
Virus del Chikungunya	*Gripe A H1*	*Virus respiratorio sincicial (subtipo A)*
Coronavirus	*Gripe A H3*	*Virus respiratorio sincicial (subtipo B)*
Coronavirus SARS (2003)	*Gripe A H5*	*Rinovirus*
Coxsackie A6	*Gripe B*	*Rotavirus*
Coxsackie B1	*Sarampión*	*Rubeola*
Coxsackie B5	*MERS-Coronavirus*	*SARS-CoV-2*
Virus del dengue 1	*Paroditis*	*Virus de la encefalitis transmitido por garrapatas*
Virus del dengue 2	*Norovirus*	*Virus del Nilo Occidental*
Virus del dengue 3	*Nuevo virus de la gripe A H1n1*	*Virus de la fiebre amarilla*
Virus del dengue 4	*Virus paragripal 1*	*Virus de Zika*
Ecovirus 5	*Virus paragripal*	*Virus de Zika (linaje asiático)*
Enterovirus 68	*Virus paragripal 3*	

- **Estudio de interferencia**

La presencia de inhibidores de la PCR en la muestra puede ocasionar una interferencia positiva o negativa en los resultados de la prueba. Se analizó la presencia de diversos inhibidores en las muestras.

Pulverizadores nasales

No se detectó ninguna interferencia ni positiva ni negativa tras cargar hasta un 10 % en el medio de transporte BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection de una matriz de secreciones nasofaríngeas tratadas con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis, con las siguientes sustancias:

Producto	Sustancia activa
Nasacort	Triamcinolona acetónido
Oximetazolina nasal	Oximetazolina
Beconase	Beclometasona dipropionato
Budesonida	Budesonida
Mometasona	Mometasona
Avamys	Fluticasona furoato
Fluticasona nasal	Fluticasona propionato

Sangre

La presencia de sangre en los hisopos nasofaríngeos puede causar una interferencia positiva o negativa en el resultado de la prueba PCR. En nuestro estudio se demuestra que una concentración de sangre de hasta un 1 % no interfieren en la reacción de la PCR cuando se utiliza el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella con los kits BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection y BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis. En el caso de las concentraciones del 2 % y superiores, existe una disminución de la sensibilidad. Por tanto, la concentración de sangre en la muestra no debe superar el 1 %.

- **Calidad de los resultados clínicos**

Se determinó la calidad de los resultados clínicos en 146 muestras de 4 laboratorios diferentes que se calificaron como positivas o negativas para *B. pertussis* o *B. parapertussis* con pruebas PCR con marcado CE con referencia del Ministerio de Sanidad francés.

Estas pruebas permiten la identificación de estas dos cepas mediante la amplificación de los genes IS481 e IS1001, que también están presentes en las cepas *B. holmesii* y *B. bronchiseptica*.

Las muestras se cualificaron con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella en extractos de ADN purificado o tras el tratamiento con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis.

	Número de muestras	*B. pertussis*		*B. parapertussis*		*Coinfecciones*	*Negativo para Bordetella*
		+	-	+	-		
Laboratorio 1	63	58	1	8	51	8*	5
Laboratorio 2	12	12	0	2	10	2	0
Laboratorio 3	31	0	0	0	0	0	31
Laboratorio 4	40	0	0	0	0	0	40

*De entre las 8 muestras calificadas como positivas para *B. pertussis* y *B. parapertussis* del laboratorio 1, no se confirmó ninguna coinfección con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella, así como con otro kit con marcado CE presente en el mercado.

En la tabla de contingencia siguiente se muestran la calidad de los resultados del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella en muestras tras la extracción/purificación del ADN con un kit comercial:

		PCR de referencia	
		Positivo	Negativo
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positivo	69	0
	Negativo	1	76

Sensibilidad: 98,57 % (IC del 95 % : del 92,30 % al 99,96 %) **Especificidad: 100%** (IC del 95 %: del 95,26 % al 100 %)

En la tabla de contingencia siguiente se muestra la calidad de los resultados de BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella en muestras tratadas con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis:

		PCR de referencia	
		Positivo	Negativo
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positivo	66	0
	Negativo	4	76

Sensibilidad: 94,29 % (IC del 95 % : del 86,01 % al 98,42 %) **Especificidad: 100%** (IC del 95 %: del 95,26 % al 100 %)

En este estudio no teníamos acceso a las muestras clínicas de pacientes con un resultado positivo para *B. bronchiseptica* y *B. holmesii* (muestras poco frecuentes). Las calidad de los resultados de este kit para estas dos especies se validaron con cepas proporcionadas por el Centro de Referencia Nacional francés para tosferina y otras bordetelosis.

- **Precisión**

Los datos sobre precisión en el contexto del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella se determinaron basándose en 4 condiciones:

- Variabilidad intraensayo (intradía, en un mismo experimento)
- Variabilidad entre días
- Variabilidad entre analistas
- Variabilidad entre lotes

Los datos de variabilidad se expresan en términos de valor medio, desviación estándar y cociente de variación, en función de los valores umbral del ciclo de cuantificación (Cq) del ADN de Bordetella.

Datos de variabilidad intranalítica:

Se analizaron dos diluciones de la muestra para cada una de las especies de Bordetella detectadas por el kit: 1 alta (+++) correspondiente a 1000 copias/µl y 1 baja (+) correspondiente a 10 copias/µl. Para *B. pertussis* y *B. parapertussis* se utilizaron dos diluciones diferentes, ya que sus dos objetivos positivos tienen sensibilidades diferentes y los genes IS481 e IS1001 son multicopia y los genes ptxA-Pr y FLA son monocopia.
Cada muestra se analizó 30 veces.

ADN extraído

			Mezcla 1		
	Dilución de la muestra	Objetivo	Cq medio	DE	CV %
B. pertussis	+++	IS481	13,3	0,1	0,9
	+ (ptxA-Pr)		27,4	1,1	4,0
	- (IS481)		34,7	0,3	1,0
	+++	ptxA-Pr	19,6	0,2	0,8
	+ (ptxA-Pr)		34,3	0,7	2,2
B holmesii	+++	IS481	21,2	0,1	0,7
	+		36,2	0,5	1,3

			Mezcla 2		
	Dilución de la muestra	Objetivo	Cq medio	DE	CV %
B. parapertussis	+++	IS1001	15,8	0,3	1,7
	+ (FLA 1 Y 2)		29,1	0,1	0,5
	+(IS1001)		35,1	0,7	1,9
	+++	FLA1	21,5	0,2	0,8
	+ (FLA 1 Y 2)		35,2	0,4	1,2
	+++	FLA2	21,9	0,2	0,8
	(FLA 1 Y 2)		34,7	0,3	0,9
B bronchiseptica	+++	FLA 2	21,8	0,1	0,6
	+		36,6	0,6	1,7

Pretratamiento con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis

	Dilución de la muestra	Objetivo	Mezcla 1 Cq medio	DE	CV %
B. pertussis	+++	IS481	14,7	0,2	1,0
	+ (ptxA-Pr)		28,8	1,0	3,4
	+ (IS481)		34,4	1,2	3,4
	+++	ptxA-Pr	22,4	0,1	0,6
	+ (ptxA-Pr)		35,5	1,1	3,0
B holmesii	+++	IS481	21,5	0,0	0,2
	+		35,4	1,4	4,0

	Dilución de la muestra	Objetivo	Mezcla 2 Cq medio	DE	CV %
B. parapertussis	+++	IS1001	13,7	0,2	1,2
	+ (FLA 1 Y 2)		31,3	0,2	0,8
	+(IS1001)		34,5	0,8	2,4
	+++	FLA1	19,2	0,2	1,1
	+ (FLA 1 Y 2)		37,1	0,6	1,7
	+++ (FLA 1 Y 2)	FLA2	18,9	0,2	1,1
			34,9	0,5	1,4
B bronchiseptica	+++	FLA 2	18,6	0,2	0,8
	+		34,8	0,3	0,8

Datos de variabilidad interensayo:
Se analizaron dos diluciones de la muestra para cada una de las especies de Bordetella detectadas por el kit: 1 alta (+++) correspondiente a 1000 copias/µl y 1 baja (+) correspondiente a 10 copias/µl.
Cada muestra se analizó por duplicado dos veces al día, durante 5 días.
Una muestra negativa da resultados negativos.

Gen	+++ Valor Cq promedio muestra +++	+++ Desviación estándar	+++ Coeficiente de variación %	+ Valor Cq promedio muestra +	+ Desviación estándar	+ Coeficiente de variación %
IS481	27,7	0,1	0,4	33,9	0,2	0,6
ptxA-Pr	27,3	0,1	0,3	33,4	0,2	0,5
IS1001	27,6	0,1	0,4	33,6	0,3	0,8
FLA1	29,5	0,2	0,6	35,7	0,1	0,4
FLA2	28,6	0,2	0,8	34,7	0,3	0,7

Datos de variabilidad interanalistas:
Se analizaron dos diluciones de la muestra para cada una de las especies de Bordetella detectadas por el kit: 1 alta (+++) correspondiente a 1000 copias/µl y 1 baja (+) correspondiente a 10 copias/µl.
Dos veces cada día por dos analistas diferentes, durante 5 días.
Una muestra negativa da resultados negativos.

Gen	+++ Valor Cq promedio muestra +++	+++ Desviación estándar	+++ Coeficiente de variación %	+ Valor Cq promedio muestra +	+ Desviación estándar	+ Coeficiente de variación %
IS481	27,6	0,1	0,4	33,9	0,0	0,1
ptxA-Pr	27,2	0,1	0,4	33,4	0,0	0,1
IS1001	27,5	0,1	0,2	33,6	0,0	0,1
FLA1	29,4	0,1	0,4	35,6	0,0	0,1
FLA2	28,6	0,0	0,0	34,8	0,0	0,1

Datos de variabilidad interlotes:

Se analizaron dos diluciones de la muestra para cada una de las especies de Bordetella detectadas por el kit: 1 alta (+++) correspondiente a 1000 copias/µl y 1 baja (+) correspondiente a 10 copias/µl.
Cada muestra se analizó por triplicado o duplicado en dos lotes diferentes.
Una muestra negativa da resultados negativos.

	+++			+		
Gen	Valor Cq promedio muestra +++	Desviación estándar	Coeficiente de variación %	Valor Cq promedio muestra +	Desviación estándar	Coeficiente de variación %
IS481	26,9	0,2	0,6	33,4	0,4	1,1
ptxA-Pr	27,4	0,1	0,5	33,7	0,7	2,0
IS1001	26,9	0,0	0,0	33,0	0,3	0,9
FLA1	29,1	0,1	0,5	35,1	0,0	0,0
FLA2	28,5	0,0	0,1	34,6	0,1	0,3

12 I LÍMITES

1. El hecho de no seguir cualquier paso de estas instrucciones de uso pueden afectar negativamente a la calidad de los resultados de la prueba y tener consecuencias perjudiciales.
2. Al igual que con cualquier prueba diagnóstica, el médico debe analizar los resultados junto con el resto de información clínica disponible. Un resultado negativo no significa que se pueda descartar la presencia de *Bordetella* en la muestra (p. ej., puede haber presencia de genes en una concentración inferior al límite de detección mínimo de la prueba, interferencia) y un resultado positivo nunca garantiza la presencia de *Bordetella* en la muestra (p. ej., contaminación). El diagnóstico definitivo solo puede emitirlo un médico tras la evaluación de todos los datos clínicos y analíticos.
3. Las muestras con más de 1 % de sangre pueden interferir con el resultado de la prueba. En caso de que haya sangre en la muestra, analice el resultado con precaución.

13 I BIBLIOGRAFÍA

- Pittet LF, Emonet S, Schrenzel J, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Bordetella holmesii : an under-recognized Bordetella species. The Lancet Infectious Diseases. 2014; 14(6):510-9.
- Pittet LF, Emonet S, François P, Bonetti EJ, Schrenzel J, Hug M, Altwegg M, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Diagnosis of whooping cough in Switzerland: Differentiating Bordetella pertussis from Bordetella holmesii by polymerase chain reaction. PLoS One. 2014; 9(2): e88936
- Sanz JC, Abad R, Sanz C, Miguel A. Diagnóstico diferencial de Bordetella bronchiseptica por RT-PCR en un ní no con tos paroxística sin antecedentes patológicos previos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.09.016

14 I SÍMBOLOS

	Consultar las instrucciones de uso o consultar las instrucciones electrónicas de uso		Contiene cantidad suficiente para <n> pruebas	REF	Número de referencia
IVD	Producto sanitario de diagnóstico *in vitro*		Límite de temperatura		No reutilizar
	Fabricante	LOT	Código de lote		Fecha de caducidad
	Mantener alejado de la luz solar	Mmix	Master Mix		Microplaca
CONTROL -	Control negativo	CONTROL +	Control positivo	UDI	Identificación única del producto
	Bolsa de tiras de tapones		No utilizar si el envase está dañado y consultar las instrucciones de uso	CH REP	Representante autorizado en Suiza

	Importador		Detección cualitativa por PCR		

15 I INFORMACIÓN DEL FABRICANTE

BIOSYNEX S.A.
22 boulevard Sébastien Brant
67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN – France
Standard:
Phone: +33 3 88 78 76 78
www.biosynex.com
Contactos Francia:
Phone : +33 3 88 77 57 00
Service.clients@biosynex.comContactos con otros países:
Phone: +33 3 88 77 57 52
sales@biosynex.com
Servicio postventa:
Phone: +33 3 88 77 57 25
Tech.support@biosynex.com

CH REP
BIOSYNEX SWISS S.A.
Route de Rossemaison 100
2800 DELEMONT - Switzerland

Últimos cambios :
Actualización de la tabla de símbolos y datos de contacto del fabricante.
§7: corrección relativa al muestreo por aspiración.

IT

CE 0123

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella

PCR PER IL RILEVAMENTO QUALITATIVO E LA DIFFERENZIAZIONE DI *BORDETELLA PERTUSSIS*, *BORDETELLA PARAPERTUSSIS*, *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* E *BORDETELLA HOLMESII* IN TAMPONI RINOFARINGEI O ASPIRATI NASALI.

Esclusivamente per uso diagnostico professionale in vitro

REF 3150068_SEC01 / 3150068_SEC02

1 I USO PREVISTO

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella è un test diagnostico molecolare *in vitro* per il rilevamento qualitativo mediante qPCR e la differenziazione di 4 specie batteriche del genere *Bordetella* osservate nella medicina umana: *B. pertussis, B. parapertussis, B. bronchiseptica* e *B. holmesii*. Il test è un ausilio alla diagnosi di pertosse che viene effettuato mediante un estratto di DNA ottenuto da tamponi rinofaringei o aspirati nasali. Questo test non automatizzato è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro* in laboratorio a cura di professionisti.

2 I SINTESI CLINICA

Il genere Bordetella è composto da 9 specie differenti. Le principali specie responsabili delle malattie respiratorie umane sono:

- *B. pertussis*, che è l'agente responsabile della pertosse e il cui serbatoio è esclusivamente umano,
- *B. parapertussis*, una specie simile a *B. pertussis*, ma che non secerne la tossina della pertosse e che può essere responsabile di una sindrome della pertosse generalmente meno grave,
- *B. bronchiseptica*, che interessa un ampio numero di mammiferi ed è responsabile delle infezioni respiratorie umane, principalmente in caso di immunocompromissione,
- *B. holmesii* che può anche essere responsabile di sintomi respiratori simili alla pertosse e persino della setticemia.

Nei pazienti non vaccinati o il cui stato di vaccinazione contro la pertosse non è conosciuto e che presentano una tosse persistente, il test per la Bordetella deve essere effettuato quanto prima per iniziare un trattamento antibiotico e isolare il paziente in modo da interrompere la catena infettiva.

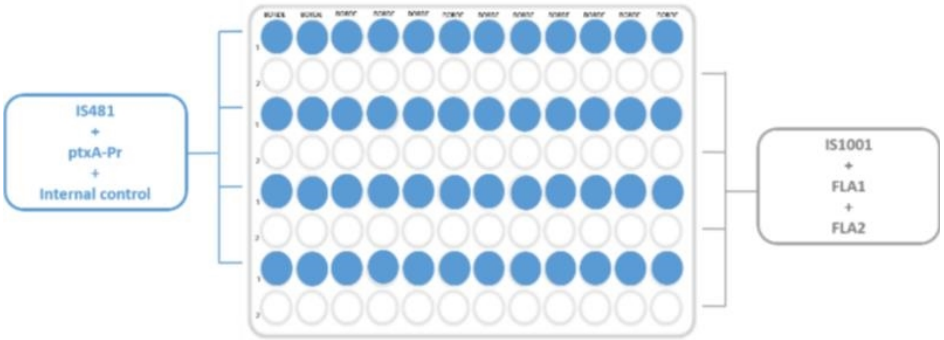
La diagnosi di pertosse mediante PCR deve essere effettuata nelle prime tre settimane successive all'insorgenza dei sintomi.

3 I PRINCIPIO DEL TEST

Il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella è un esame diagnostico in vitro basato sulla tecnologia della reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) in tempo reale mediante idrolisi di sonde fluorescenti. Il kit è composto di una micropiastra a 96 pozzetti pre-riempita con due Master Mixes pronte all'uso contenenti dNTP, MgCl2, primer e sonde fluorescenti, enzima Taq polimerasi e un tampone di reazione.

Il saggio consiste in una fase PCR multipla effettuata in un termociclatore in tempo reale, che consente l'amplificazione specifica e il rilevamento simultaneo di target molecolari che portano le sequenze di interesse: l'operone TOX (sequenza IS481), la regione del promotore della tossina della pertosse (ptxA-Pr), la sequenza di inserzione h-IS1001 specifica di *B. holmesii* e il gene della flagellina specifico di *B. parapertussis* e che permette la differenziazione tra *B. bronchiseptica* in due fasi (sequenze FLA1 e FLA2), così come il controllo procedurale interno (gene RNase P umano), che permette di valutare la qualità del prelievo del campione biologico e convalidare l'estrazione del DNA e le fasi di purificazione.

A tale scopo sono usate due Master Mixes contenenti sonde marcate con fluorocromi FAM, HEX e Cy5.



Nella Master Mix azzurra nei pozzetti contrassegnati “1” sulla piastra pre-riempita il fluorocromo FAM viene usato per l’amplificazione specifica della sequenza di IS481, HEX per la sequenza ptxA-Pr e Cy5 per il gene RNAse P. Nella Master Mix incolore nei pozzetti contrassegnati “2” sulla piastra il fluorocromo FAM viene usato per l’amplificazione specifica della sequenza di IS1001, HEX per la sequenza FLA1 e Cy5 per la sequenza FLA2.
La determinazione delle specie di Bordetella dipende dalla combinazione del rilevamento di questi geni come descritto nella sezione 10.

L’incremento del segnale di fluorescenza è rilevato soltanto se la sequenza target complementare alla sonda amplificata è presente nel campione. Il segnale fluorescente è, pertanto, direttamente proporzionale all’amplificazione del target durante la fase di amplificazione. Il valore Cq (ciclo di quantificazione) corrisponde al numero di cicli a cui la fluorescenza inizia ad aumentare in misura esponenziale in contrasto dal sottofondo. Il kit può essere utilizzato su due tipologie di campioni:
- tamponi rinofaringei
- aspirati rinofaringei/endonasali

Prima del loro utilizzo con il kit di amplificazione BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella (sezione 9),
i campioni devono essere innanzitutto prelevati e trattati conformemente alle procedure descritte nelle sezioni 7 e 8 usando il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (codice prodotto 3150060 e codici connessi) e il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (codice prodotto 3150059 e codici connessi), oppure elaborati per ottenere estratti di DNA purificati usando un kit adatto.

4 I CONTENUTO DEL KIT

Materiali inclusi

- 2 micropiastre divisibili con 96 pozzetti preriempite di miscela master
- 1 provetta di controllo positivo (CONTROL +, tappo rosso)
- 1 provetta di controllo negativo (CONTROL -, tappo verde)
- 2 bustine contenenti strisce di tappi ottici per la sigillatura delle micropiastre

Materiale necessario ma non fornito

- Kit di estrazione DNA
- Guanti monouso privi di polvere
- Pipette e puntali filtrati
- Termociclatore PCR in tempo reale
- Micropiastra PCR o centrifuga per micropiastre

Il termociclatore PCR usato per il test deve avere le seguenti caratteristiche principali:
- Sistema aperto
- Saggi PCR quantitativi in tempo reale.
- Blocco termociclatore programmabile .

Riferimento	Blocco termociclatore
3150068_SEC01	0,1 mL a basso profilo
3150068_SEC02	0,2 mL ad alto profilo

- Fonte di eccitazione: LED, lampada o laser
- Set di filtri (lunghezze d’onda di eccitazione/emissione) idonei per il rilevamento di “reporter” fluorocromo delle sonde FAM, HEX e Cy5.
- Collegamento a un computer che utilizza un software di analisi specifico che consente il recupero dei dati di fluorescenza, saggi di quantificazione assoluta e l’interpretazione dei risultati.

Il kit è stato sviluppato e convalidato con i seguenti termociclatori PCR in tempo reale:

Riferimento	Termociclatore
3150068_SEC01	Sistema di rilevamento PCR in tempo reale CFX96™ Touch (Bio-Rad) Sistema di rilevamento PCR in tempo reale CFX96™ Opus (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) Sistema QuantStudio 5 (Applied Biosystems) LightCycler 480 (Roche) Amplix-DT lite 48 (DNA Technology)
3150068_SEC02	Sistema di rilevamento PCR in tempo reale CFX96™ Touch (Bio-Rad) Sistema di rilevamento PCR in tempo reale CFX96™ Opus (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) Sistema QuantStudio 5 (Applied Biosystems) Amplix-DT lite 48 (DNA Technology)

Se viene utilizzato un altro termociclatore, effettuare la propria convalida del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella usando i controlli forniti e/o campioni respiratori qualificati prima di usare il test.

5 I *PRECAUZIONI*

- Attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso. Il mancato rispetto delle presenti istruzioni per l'uso può influire in modo avverso sulle prestazioni del test e avere conseguenze nocive.
- Seguire la buona prassi di laboratorio e indossare guanti da laboratorio monouso e senza polvere durante tutta la procedura del test.
- La gestione quotidiana di un gran numero di campioni e l'elevata sensibilità della tecnica PCR possono, in assenza di precauzioni, generare risultati falsamente positivi a causa della contaminazione. È necessario, pertanto, eseguire la manipolazione pre-PCR, post-PCR e l'estrazione del materiale genetico in ambienti separati. Indossare guanti monouso in ciascuna zona e sostituirli prima di spostarsi da una zona all'altra.
- Il test e il tappo sono esclusivamente monouso. Non riutilizzare. Non aprire le provette PCR al termine del test.
- Non utilizzare un test se la pellicola di alluminio risulta aperta o danneggiata. Una volta rimossa la pellicola di alluminio, utilizzare immediatamente il test.
- Non usare il kit se arriva scongelato.
- Non usare il kit in caso di rottura o perdita. Nell'eventualità di danni soltanto alla confezione (nessuna rottura o perdita), il kit rimane utilizzabile.
- Proteggere il kit dalla luce.
- Centrifugare le provette prima di aprirle, aprirle una dopo l'altra chiudendole bene tra di loro per evitare l'eventuale contaminazione.
- Il CTRL+ contiene quantità significative di sequenze di DNA. Pertanto, può potenzialmente contaminare gli altri componenti del kit se non si seguono buone prassi di biologia molecolare. Per limitare questo rischio di contaminazione, si consiglia di conservare questo componente al di fuori del kit in occasione della sua prima apertura.
- I controlli positivo e negativo inclusi nel kit imitano i risultati ottenuti rispettivamente con campioni negativi o positivi. Questi devono essere usati a ogni nuova analisi.
- Per garantire che non vi sia alcuna contaminazione durante la manipolazione, spetta all'utente includere, come parte integrante del proprio approccio interno di qualità, alla frequenza scelta, un pozzetto di controllo negativo dell'esperimento in cui sono aggiunti 8 µL di acqua di grado biologico molecolare alla miscela master.
- Quando si utilizzano i controlli positivo e negativo con una serie di pazienti, si consiglia di depositare prima il controllo negativo, quindi depositare i campioni dei pazienti e terminare con il deposito del controllo positivo.
- Smaltire le parti sporche o i componenti vuoti del kit in un contenitore idoneo per i rifiuti biologici.
- Il dispositivo contiene materiali di origine batterica o animale e possono trasmettere agenti infettivi; pertanto questo deve essere maneggiato con estrema cautela.
- Nell'eventualità di decesso o grave peggioramento della salute legato all'uso di BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella, segnalare l'accaduto al fabbricante e alla propria autorità nazionale competente. In caso di dubbi, procedere alla segnalazione.
- Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta. La sintesi relativa alla sicurezza e alla prestazione sarà

disponibile online su Eudamed.

6 I CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Il kit è spedito congelato. I componenti del kit devono arrivare congelati. Conservare il kit a una temperatura di -20 °C. In queste condizioni i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sul kit. Non usare il kit e nessuno dei suoi componenti dopo la data di scadenza. Proteggere il kit e i reagenti dalla luce diretta.
I controlli positivo e negativo possono essere sottoposti fino a 15 cicli di congelamento/scongelamento.
Rimuovere e scongelare soltanto il numero richiesto di strisce di pozzetti. Quando le strisce sono pronte per l'uso, non vi è motivo di sottoporle a cicli ripetuti di congelamento-scongelamento.

7 I RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella permette l'amplificazione del DNA di tutte le 4 specie di Bordetella. Il test può essere effettuato usando estratto di DNA purificato proveniente da campioni rinofaringei (tamponi) o aspirati rinofaringei/endonasali; oppure gli stessi campioni raccolti nel kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (codice prodotto 3150060 e codici connessi) e trattati nel kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (codice prodotto 3150059 e codici connessi).

- Raccogliere i campioni rinofaringei usando i tamponi sterili trasferiti in provette sterili contenenti il terreno di trasporto, oppure in quelle disponibili nel kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (codice prodotto 3150060 e codici connessi).
- Raccogliere gli aspirati rinofaringei/endonasali con un aspiratore di muco seguendo le raccomandazioni del fabbricante e trasferirli nelle provette sterili contenenti il terreno di trasporto, oppure in quelle disponibili nel kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (codice prodotto 3150060 e codici connessi). Quando si utilizza il kit di lisi BIOSYNEX AMPLIQUICK (rif. 3150059), i campioni aspirati devono essere utilizzati direttamente senza essere scaricati in un mezzo di trasporto.

I campioni trasferiti nel terreno di trasporto di BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection possono essere estratti immediatamente o entro 4 ore se conservati a temperatura ambiente, oppure conservati tra 2 °C e 8 °C per 24 ore.

Il trasporto dei campioni clinici deve soddisfare le disposizioni locali in materia di trasporto di agenti infettivi.

8 I ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

L'estrazione degli acidi nucleici deve essere eseguita prima del protocollo di amplificazione usando un sistema di estrazione adatto per il DNA batterico. Attenersi alle istruzioni del produttore.
Il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella è stato convalidato con i seguenti kit di estrazione:

- BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (codice prodotto 3150059_SEC01 e codici connessi) **BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis può essere usato esclusivamente con i campioni rinofaringei raccolti in BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection. Il campionamento per aspirazione può essere utilizzato senza scaricare in un mezzo di trasporto.**
- Kit QIAamp DNA Mini (Qiagen – Codice prodotto 51306)
- NucleoMag Dx Pathogen (Macherey Nagel – 744215.4)
- Kit Amplix Bacterial DNA Extraction su Amplix Automated System (DNA Technology - Codice prodotto OP05006)

Se si utilizza un altro metodo o kit di estrazione del DNA, eseguire la propria convalida del metodo del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella usando campioni respiratori qualificati prima di usare il test (non usare i controlli forniti).

Non è necessario estrarre i controlli positivo e negativo con il kit di estrazione dell'acido nucleico. Se si ritarda l'utilizzo di DNA purificato, prima di aggiungerlo alla miscela master, conservarlo a 4 °C oppure nel ghiaccio il giorno del test.

9 I PROTOCOLLO DI AMPLIFICAZIONE

Per la progettazione della piastra, fare riferimento alla sezione 3.
Si consiglia di collocare le strisce di Master Mix su uno scaffale refrigerato oppure nel ghiaccio mentre si aggiungono i campioni.

1. Prendere una piastra frantumabile in strisce di 8 pozzetti e prendere il numero di strisce richieste. Se è necessaria meno di una striscia intera di 8 pozzetti, la striscia può essere tagliata orizzontalmente usando un paio di forbici.
2. Centrifugare le strisce per alcuni secondi per raccogliere eventuali goccioline sui bordi dei pozzetti oppure sul sigillo.
3. Rimuovere con cautela la pellicola di alluminio e gettarla. Una volta rimossa la pellicola di alluminio, utilizzare immediatamente la striscia.
4. Aggiungere 8 µL di campione o di controllo in conformità con la progettazione della piastra.
5. Chiudere i pozzetti con i cappucci trasparenti in dotazione.

6. Centrifugare le strisce per alcuni secondi.
7. Posizionarle nel termociclatore ed eseguire il seguente programma di amplificazione:

Programma PCR:

Fase	Ripetizioni	Temperatura	Durata	Acquisizione
Attivazione Taq	1x	95°C	3 min	-
Denaturazione	50x	95°C	10 sec	-
Ibridazione / Elongazione		58°C	45 sec	sì

Inserire **20 µL** di volume di reazione nel programma del termociclatore.
Consultare le istruzioni operative del termociclatore utilizzato per programmare le informazioni.

Impostazione dei canali di rilevamento:

Master Mix azzurra	
Target	Fluorocromo
IS481	FAM
ptxA-Pr	HEX
RNAse P (controllo procedurale)	Cy5
Master Mix incolore	
Target	Fluorocromo
IS1001	FAM
FLA1	HEX
FLA2	Cy5

10 I ANALISI DEI DATI E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

A. Criteri di convalida della prova

Controllo negativo:

La fluorescenza emessa deve essere inferiore alla soglia, a eccezione del canale Cy5 della Master Mix azzurra. Questo è un indicatore di amplificazione non specifico. Se la fluorescenza è sopra la soglia, verificare la presenza di una curva atipica. Nel caso di una curva di amplificazione, è necessario considerare un errore di contaminazione o di distribuzione nelle microprovette. Soltanto il controllo interno RNAse P deve essere amplificato.

Controllo positivo:

Il valore del controllo positivo deve essere preferibilmente rilevato prima di 30 cicli (Cq ≤ 30). In assenza di amplificazione del controllo positivo, si deve considerare l'esistenza di un problema di rilevamento dell'amplificazione o della fluorescenza (termociclatore difettoso o strumento non adatto al metodo).

Controllo interno dell'amplificazione:

Il controllo interno endogeno RNAse P garantisce che gli enzimi nella Master Mix siano funzionali e convalida le fasi di raccolta di acido nucleico e di estrazione. Di fatto, la curva di amplificazione del controllo procedurale RNAse P deve essere osservata nel canale Cy5 dei pozzetti che contengono la Master Mix azzurra.
Tuttavia, è possibile osservare due situazioni di mancanza di amplificazione del controllo interno:

- Se i geni target sono inizialmente presenti nel campione con un numero elevato di copie, il controllo interno potrebbe non essere amplificato. Questo risultato è coerente e non annulla il test. Deve essere interpretato come un risultato positivo nonostante la mancanza di segnale dal controllo interno. Questo fenomeno è il risultato di una competizione di amplificazione tra il controllo interno e i target presenti a numeri elevati di copie.
- Se i geni target nei canali FAM e HEX non sono amplificati, così come il controllo interno nel canale Cy5 nella Master Mix azzurra, allora non sarà reso alcun risultato. Questa situazione evidenzia la presenza di inibitori del PCR. Il PCR deve essere ripetuto iniziando dal campione primario e preferibilmente sull'estratto di DNA.

B. Interpretazione qualitativa (positiva o negativa)

Segnali al di sopra della soglia, **e visualmente omogenei con una curva classica di amplificazione PCR**, sono considerati risultati positivi.

Alcuni campioni potrebbero mostrare curve atipiche che non sono caratteristiche delle curve di amplificazione. In questo caso, il risultato non deve essere considerato come interpretabile e si prega di ripetere l'analisi del campione con i controlli.

Canali di rilevamento						Interpretazione
Master Mix azzurra 1			Master Mix incolore 2			
FAM (IS481)	HEX (ptxA-Pr)	Cy5 (RNAseP)	FAM (IS1001)	HEX (FLA1)	Cy5 (FLA2)	
-	-	+	-	-	-	Controllo negativo
+	+	+	+	+	+	Controllo positivo
+	+	+	-	-	-	Paziente con DNA specifico di *B. pertussis*
+	+	-	-	-	-	
+	-	+	-	-	-	Paziente con DNA specifico di *B. holmesii*
+	-	-	-	-	-	
+ Se Cq >30	-	+/-	-	-	-	Paziente con DNA di *Bordetella spp*
-	-	+	+	+	+	Paziente con DNA specifico di *B. parapertussis*
-	-	-	+	+	+	
-	-	+/-	+ Se Cq >30	-	-	Paziente con DNA di *B. parapertussis* o *B. bronchiseptica*
+/-*	-	+	+/-*	-	+	Paziente con DNA specifico di *B. bronchiseptica*
+/-*	-	-	+/-*	-	+	
-	-	-	-	-	-	Risultato non valido, ripetere il test

*Il risultato è ceppo-dipendente. Infatti, a seconda del ceppo, alcune specie possono portare o meno il gene. Pertanto, il ceppo di *B. bronchiseptica* FR3523 è positivo per IS1001 mentre il ceppo di riferimento RB50 è negativo per questo gene.

La Master Mix 1 (azzurra) permette il rilevamento di *B. pertussis* o *B. holmesii* e la Master Mix 2 (incolore) il rilevamento di *B. parapertussis*. La combinazione dell'espressione dei differenti geni rilevati nei due pozzetti permette l'identificazione dell'altra specie *B. bronchiseptica.*

11 I PRESTAZIONI

- **Sensibilità analitica**

Il limite di rilevamento (LoD) del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella è definito come la concentrazione che può essere rilevata al 95% almeno su uno specifico campione di DNA di *Bordetella*.

Limiti di rilevamento su campioni di DNA estratto per specie:

Il LoD_{95} sul DNA estratto è espresso in numero di copie di DNA/µl. Gli estratti di DNA quantificati sono stati acquistati da Vircell (Amplirun®). I LoD sono stati valutati per *Bordetella holmesii* sulla Master Mix 1 perché positiva per il gene IS481, *Bordetella pertussis* sulla Master Mix 1 perché positiva per entrambi i target IS481 e ptxA-Pr e per *Bordetella parapertussis* sulla Master Mix 2 perché positiva per IS1001 ed entrambi i geni FLA. Il DNA quantificato di *B. bronchiseptica* non è disponibile sul mercato, quindi il LoD_{95} non può essere valutato per questa specie.
Il LoD_{95} di BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella sul DNA estratto è stato statisticamente determinato per ogni ceppo e sequenza genica. I risultati vengono forniti nella tabella di seguito.

Ceppo di Bordetella	LoD_{95} (copie/µL)
Bordetella pertussis	IS481: 0,043 ptxA-Pr: 4,017
Bordetella parapertussis	IS1001: 0,265 FLA 1: 18,418 FLA 2: 16,033
Bordetella holmesii	IS481: 0,253

I limiti di rilevamento per i campioni raccolti con il terreno di trasporto AMPLIQUICK Sample Collection e trattati con il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis:
I LoD sono determinati effettuando una serie di diluizioni di un campione di riferimento con una concentrazione nota CFU/mL in tamponi rinofaringei negativi di Bordetella qualificati e trasportati nel terreno di trasporto di BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection o campioni di aspirati nasali negativi e trattati con il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis.

Il LoD_{95} di BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella sul DNA trattato con BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis è stato statisticamente determinato per ogni ceppo e sequenza genica. I risultati vengono forniti nelle tabelle di seguito.

Ceppo di Bordetella	LoD_{95} per tamponi rinofaringei				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA 4
Bordetella pertussis	22,837 CFU/mL	451,291 CFU/mL	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	38,264 CFU/mL	528,032 CFU/mL	429,806 CFU/mL
Bordetella holmesii	113,354 CFU/mL	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1791,123 CFU/mL

Ceppo di Bordetella	LoD_{95} per aspirati nasali				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA 4
Bordetella pertussis	36,679 CFU/mL	2758,238 CFU/mL	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	52,0 CFU/mL	1535,5 CFU/mL	445,297 CFU/mL
Bordetella holmesii	87,674 CFU/mL	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1101,8 CFU/mL

- **Specificità analitica**

La progettazione degli oligonucleotidi (primer e sonde) è stata convalidata *in silico* dall'allineamento BLAST. Il confronto delle sequenze ottenute dimostra un rilevamento specifico dei target di BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella.
Nessun primer o sonda rileva DNA batterico diverso dalle 4 specie di Bordetella target.

Sono stati testati 18 estratti di DNA da ceppi qualificati e di riferimento.
11 estratti di DNA dal Centro di riferimento nazionale francese positivi per la pertosse e altre infezioni da Bordetella, 3 sequenze di DNA di controllo provenienti da una biobanca (Amplirun®,Vircell) e 4 colture di ceppo batterico standard (Zeptometrix®).

	DNA di controllo	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA1	FLA2
Biobanca	*DNA Bordetella pertussis*	+	+	-	-	-
	DNA Bordetella parapertussis	-	-	+	+	+
	DNA Bordetella holmesii	+	-	-	-	-

	Specie	Ceppo	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA1	FLA2
Coltura standard	*Bordetella pertussis*	A639	+	+	-	-	-
	Bordetella parapertussis	A747	-	-	+	+	+
	Bordetella holmesii	F061	+	-	-	-	-
	Bordetella bronchiseptica	Z341	-	-	-	+	-
CNR	*Bordetella bronchiseptica*	RB50	+	-	-	-	+
		LAR	+	-	-	+	+
		FR3523	-	-	+	-	+
	Bordetella Petrii	KMBW	-	-	-	-	-
		FR5141	-	-	-	-	-
	Bordetella avium	CIP103348T	-	-	-	-	-
		FR6062	-	-	-	-	-
	Bordetella hinzii	CIP104527T	-	-	-	-	-
		FR5948	-	-	-	-	-
	Bordetella trematum	CIP105351T	-	-	-	-	-
		FR5853	-	-	-	-	-

Reattività incrociata

Un panel di 76 campioni di DNA e 38 campioni di RNA da una biobanca elencati nelle seguenti tabelle sono stati analizzati con il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella. Per tutti questi campioni, non è stata osservata alcuna amplificazione del target di interesse.

DNA		
Acanthamoeba castellanii	*Escherichia coli (ETEC)*	*Neisseria meningitidis Sg A*
Adenovirus	*Escherichia coli (VTEC)*	*Neisseria meningitidis Sg B*
Adenovirus 41	*Francisella tularensis*	*Neisseria meningitidis Sg C*
Aspergillus fumigatus	*Gardnerella vaginalis*	*Papillomavirus tipo 16*
Bacillus cereus	*Giardia intestinalis*	*Papillomavirus tipo 18*
Bartonella henselae	*Haemophilus ducreyi*	*Parvovirus B19 (Plasmid)*
Bartonella Quintana	*Haemophilus influenzae*	*Rickettsia conorii*
Bk Virus	*Helicobacter pylori*	*Salmonella enteritidis*
Borrelia afzelii	*Herpes simplex 1*	*Salmonella typhi*
Borrelia burgdorferi	*Herpes simplex 2*	*Staphylococcus aureus (MecA-)*
Brucella abortus	*Hhv-6*	*Staphylococcus aureus (MecA+)*
Campylobacter jejuni	*Hhv-8*	*Streptococcus agalactiae*
Candida albicans	*Klebsiella pneumoniae (NDM-1)*	*Toxoplasma gondii*
Candida auris	*Legionella pneumophila*	*Treponema pallidum*
Chlamydia trachomatis	*Leishmania chagasi*	*Trichomonas vaginalis*
Chlamydophila pneumoniae	*Leishmania infantum*	*Trypanosoma cruzi*
Chlamydophila psittaci	*Listeria monocytogenes*	*Ureaplasma parvum*
Clostridium difficile	*Moraxella catarrhalis*	*Ureaplasma urealyticum*
Coccidioides immitis	*Mycobacterium avium*	*Varicella-Zoster Virus*
Coxiella burnetii	*Mycobacterium intracellulare*	*Vibrio cholerae*
Cryptosporidium parvum	*Mycobacterium kansasii*	*Yersinia enterocolitica*
Enterococcus faecalis (VanB)	*Mycobacterium tuberculosis*	*Borrelia garinii*
Enterococcus faecium (VanA)	*Mycobacterium ulcerans*	*Cytomegalovirus*
Epstein-Barr Virus	*Mycoplasma genitalium*	*Streptococcus pneumoniae*
Escherichia coli (EAEC)	*Mycoplasma hominis*	
Escherichia coli (EIEC)	*Neisseria gonorrhoeae*	

RNA		
Coronavirus Oc43	*Parainfluenza umana 1*	*Parainfluenza 4 A*
Chikungunya Virus	*Influenza A H1*	*Virus sinciziale respiratorio (sottotipo A)*
Coronavirus	*Influenza A H3*	*Virus sinciziale respiratorio (sottotipo B)*
Coronavirus SARS (2003)	*Influenza A H5*	*Rhinovirus*
Coxsackie A6	*Influenza B*	*Rotavirus*
Coxsackie B1	*Morbillo*	*Rosolia*
Coxsackie B5	*MERS Coronavirus*	*SARS-CoV-2*
Virus di Dengue 1	*Parotite*	*Virus dell'encefalite trasmessa da zecche*
Virus di Dengue 2	*Norovirus*	*Virus del Nilo occidentale*
Virus di Dengue 3	*Novel Influenza A H1n1*	*Virus della febbre gialla*
Virus di Dengue 4	*Parainfluenza 1*	*Virus zika*
Echovirus 5	*Parainfluenza 2*	*Virus zika (discendenza asiatica)*
Enterovirus 68	*Parainfluenza 3*	

- **Studio di interferenza**

La presenza di inibitori PCR nel campione può causare un'interferenza positiva o negativa sui risultati del test. È stata analizzata la presenza di vari inibitori nei campioni.

Spray nasale

Non è stata trovata alcuna interferenza positiva o negativa caricando fino al 10% nel terreno di trasporto BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection da una matrice di secrezioni rinofaringee trattate con il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis con le seguenti sostanze:

Prodotto	Sostanza attiva
Nasacort	Triamcinolone acetonide
Aturgyl	Ossimetazolina
Béconase	Beclometasone dipropionato
Budésonide	Budesonide
Mométasone	Mometasone
Avamys	Fluticasone furoato
Fixorinox	Fluticasone propionato

Sangue

La presenza di sangue nei tamponi rinofaringei può causare un'interferenza positiva o negativa sui risultati del test PCR. Il nostro studio mostra che le concentrazioni di sangue fino all'1% non interferiscono con la reazione PCR quando il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella è usato insieme ai kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection e BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis. Con concentrazioni di sangue pari o superiori al 2% si verifica una riduzione della sensibilità. Pertanto, la concentrazione di sangue nel campione non deve superare l'1%.

- **Prestazioni cliniche**

Le prestazioni cliniche sono state determinate su 146 campioni provenienti da 4 differenti laboratori che sono stati qualificati positivi o negativi per *B. pertussis* o *B. parapertussis* utilizzando test PCR a marchio CE come riferimento del Ministero della Salute francese.

Questi test hanno permesso l'identificazione di questi due ceppi mediante l'amplificazione dei geni IS481 e IS1001, presenti anche nei ceppi *B. holmesii* e *B. bronchiseptica.*

I campioni sono stati qualificati con il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella su estratti di DNA purificati o dopo il trattamento con il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis.

	Numero di campioni	*B. pertussis*		*B. parapertussis*		*Infezioni concomitanti*	*Negativo per Bordetella*
		+	-	+	-		
Laboratorio 1	63	58	1	8	51	8*	5
Laboratorio 2	12	12	0	2	10	2	0
Laboratorio 3	31	0	0	0	0	0	31
Laboratorio 4	40	0	0	0	0	0	40

*Tra gli 8 campioni qualificati come positivi per *B. pertussis* e *B. parapertussis* dal laboratorio 1, non è stata confermata alcuna infezione concomitante usando il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella, così come un altro kit marcato CE sul mercato.

La tabella di contingenza di seguito mostra le prestazioni del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella sui campioni dopo l'estrazione/purificazione del DNA con un kit commerciale:

		Riferimento PCR	
		Positivi	Negativi
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positivi	69	0
	Negativi	1	76

Sensibilità: 98,57% (95% CI : dal 92,30% al 99,96%)

Specificità: 100% (95%CI : dal 95,26% al 100%)

La tabella di contingenza di seguito mostra il rendimento del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella con campioni trattati con il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis:

		Riferimento PCR	
		Positivi	Negativi
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positivi	66	0
	Negativi	4	76

Sensibilità: 94,29% (95% CI : dall'86,01% al 98,42%)

Specificità: 100% (95%CI: dal 95,26% al 100%)

Per questo studio non abbiamo avuto accesso ai campioni clinici da pazienti positivi per *B. bronchiseptica* e *B. holmessi* (campioni rari). Le prestazioni del kit per queste due specie sono state convalidate usando ceppi forniti dal Centro di riferimento nazionale francese per la pertosse e altre infezioni da Bordetella.

- **Precisione**

I dati di precisione nel contesto del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella sono stati determinati sulla base di 4 condizioni:

- Variabilità intra-saggio (intra-giorno nello stesso esperimento)
- Variabilità inter-giorni
- Variabilità inter-operatori
- Variabilità inter-lotti

I dati sulla variabilità sono espressi in termini di valore medio, deviazione standard e coefficiente di variazione, basati sul ciclo di soglia dei valori di quantificazione (Cq) del DNA di Bordetella.

Dati di variabilità intra-saggio:

Sono state testate due diluizioni per ogni specie di Bordetella rilevata dal kit: 1 alta (+++) corrispondente a 1000 copie/µL e 1 bassa (+) corrispondente a 10 copie/µL. Sono state usate due differenti diluizioni basse per *B. pertussis* e *B. parapertussis*, in quanto i loro due target positivi hanno diverse sensibilità e i geni IS481 e IS1001 sono multicopia, e i geni ptxA-Pr e FLA sono monocopia.
Ogni campione è stato testato 30 volte.

DNA estratto

	Miscela 1						Miscela 2				
	Diluizione del campione	Target	Cq medio	SD	CV%		Diluizione del campione	Target	Cq medio	SD	CV%
B. pertussis	+++	IS481	13,3	0,1	0,9	*B. parapertussis*	+++	IS1001	15,8	0,3	1,7
	+ (ptxA-Pr)		27,4	1,1	4,0		+ (FLA1&2)		29,1	0,1	0,5
	- (IS481)		34,7	0,3	1,0		+ (IS1001)		35,1	0,7	1,9
	+++	ptxA-Pr	19,6	0,2	0,8		+++	FLA1	21,5	0,2	0,8
	+ (ptxA-Pr)		34,3	0,7	2,2		+ (FLA1&2)		35,2	0,4	1,2
							+++	FLA2	21,9	0,2	0,8
							(FLA1&2)		34,7	0,3	0,9
B. holmesii	+++	IS481	21,2	0,1	0,7	*B.*	+++	FLA 2	21,8	0,1	0,6
	+		36,2	0,5	1,3		+		36,6	0,6	1,7

Pre-trattamento con il kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis

	Miscela 1						Miscela 2				
	Diluizione del campione	Target	Cq medio	SD	CV%		Diluizione del campione	Target	Cq medio	SD	CV%
B. pertussis	+++	IS481	14,7	0,2	1,0	*B. parapertussis*	+++	IS1001	13,7	0,2	1,2
	+ (ptxA-Pr)		28,8	1,0	3,4		+ (FLA1&2)		31,3	0,2	0,8
	+ (IS481)		34,4	1,2	3,4		+ (IS1001)		34,5	0,8	2,4
	+++	ptxA-Pr	22,4	0,1	0,6		+++	FLA1	19,2	0,2	1,1
	+ (ptxA-Pr)		35,5	1,1	3,0		+ (FLA1&2)		37,1	0,6	1,7
							+++	FLA2	18,9	0,2	1,1
							(FLA1&2)		34,9	0,5	1,4
B. holmesii	+++	IS481	21,5	0,0	0,2	*B.*	+++	FLA 2	18,6	0,2	0,8
	+		35,4	1,4	4,0		+		34,8	0,3	0,8

<u>Dati di variabilità intra-saggio:</u>
Sono state testate due diluizioni per ogni specie di Bordetella rilevata dal kit: 1 alta (+++) corrispondente a 1000 copie/µL e 1 bassa (+) corrispondente a 10 copie/µL.
Ogni campione è testato in duplice due volte al giorno per 5 giorni.
Un campione negativo fornisce risultati negativi.

	+++			+		
Gene	Valore Cq medio campione +++	Deviazione standard	Coefficiente di variazione %	Valore Cq medio campione +	Deviazione standard	Coefficiente di variazione %
IS481	27,7	0,1	0,4	33,9	0,2	0,6
ptxA-Pr	27,3	0,1	0,3	33,4	0,2	0,5
IS1001	27,6	0,1	0,4	33,6	0,3	0,8
FLA1	29,5	0,2	0,6	35,7	0,1	0,4
FLA2	28,6	0,2	0,8	34,7	0,3	0,7

Dati di variabilità inter-operatori:
Sono state testate due diluizioni per ogni specie di Bordetella rilevata dal kit: 1 alta (+++) corrispondente a 1000 copie/µL e 1 bassa (+) corrispondente a 10 copie/µL.
due volte al giorno da due differenti operatori per 5 giorni.
Un campione negativo fornisce risultati negativi.

	+++			+		
Gene	Valore Cq medio campione +++	Deviazione standard	Coefficiente di variazione %	Valore Cq medio campione +	Deviazione standard	Coefficiente di variazione %
IS481	27,6	0,1	0,4	33,9	0,0	0,1
ptxA-Pr	27,2	0,1	0,4	33,4	0,0	0,1
IS1001	27,5	0,1	0,2	33,6	0,0	0,1
FLA1	29,4	0,1	0,4	35,6	0,0	0,1
FLA2	28,6	0,0	0,0	34,8	0,0	0,1

Dati di variabilità inter-lotto:
Sono state testate due diluizioni per ogni specie di Bordetella rilevata dal kit: 1 alta (+++) corrispondente a 1000 copie/µL e 1 bassa (+) corrispondente a 10 copie/µL.
Ogni campione è stato testato in triplice o in duplice su due differenti lotti.
Un campione negativo fornisce risultati negativi.

	+++			+		
Gene	Valore Cq medio campione +++	Deviazione standard	Coefficiente di variazione %	Valore Cq medio campione +	Deviazione standard	Coefficiente di variazione %
IS481	26,9	0,2	0,6	33,4	0,4	1,1
ptxA-Pr	27,4	0,1	0,5	33,7	0,7	2,0
IS1001	26,9	0,0	0,0	33,0	0,3	0,9
FLA1	29,1	0,1	0,5	35,1	0,0	0,0
FLA2	28,5	0,0	0,1	34,6	0,1	0,3

12 I LIMITI

1. Il mancato rispetto delle presenti istruzioni per l'uso può influire in modo avverso sulle prestazioni del test e/o rendere nullo il risultato del test.
2. Come per qualsiasi test diagnostico, i risultati devono essere considerati con altre informazioni cliniche disponibili al medico. Un risultato negativo del test non può mai escludere la presenza di Bordetella nel campione (per es. i geni possono essere presenti in concentrazioni inferiori al limite di rilevamento minimo, interferenza) e un risultato positivo non può mai garantire la presenza di Bordetella nel campione (per es. contaminazione). Una diagnosi definitiva può essere effettuata esclusivamente da un medico dopo aver valutato tutti i dati clinici e di laboratorio.
3. Può verificarsi un'interferenza sul risultato del test se i campioni presentano concentrazioni di sangue superiori all'1%. In caso di sangue nel campione, considerare il risultato con cautela.

13 I RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Pittet LF, Emonet S, Schrenzel J, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Bordetella holmesii : an under-recognized Bordetella species. The Lancet Infectious Diseases. 2014; 14(6):510-9.
- Pittet LF, Emonet S, François P, Bonetti EJ, Schrenzel J, Hug M, Altwegg M, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Diagnosis of whooping cough in Switzerland: Differentiating Bordetella pertussis from Bordetella holmesii by polymerase chain reaction. PLoS One. 2014; 9(2): e88936
-Sanz JC, Abad R, Sanz C, Miguel A. Diagnóstico diferencial de Bordetella bronchiseptica por RT-PCR en un niño con tos paroxística sin antecedentes patológicos previos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.09.016

14 I SIMBOLI

	Consultare le istruzioni per l'uso o consultare le istruzioni elettroniche per l'uso		Contenuto sufficiente per <n> test	REF	Codice n.
IVD	Dispositivo medico diagnostico *in vitro*		Limite di temperatura		Non riutilizzare
	Fabbricante	LOT	Codice lotto		Data di scadenza
	Tenere lontano dalla luce solare	Mmix	Miscela master		Micropiastra
CONTROL -	Controllo negativo	CONTROL +	Controllo positivo	UDI	Identificatore univoco del dispositivo
	Sacchetto contenente strisce di tappi		Non utilizzare se la confezione è danneggiata e consultare le istruzioni per l'uso	CH REP	Rappresentante autorizzato in Svizzera
	Importatore	+/-	Rilevazione qualitativa mediante PCR		

15 I INFORMAZIONI SUL PRODUTTORE

BIOSYNEX S.A.
22 boulevard Sébastien Brant
67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN France
Standard :
Tel : +33 3 88 78 78 87
www.biosynex.com
Contatti Francia :
Tel : +33 3 88 77 57 00
service.clients@biosynex.com
Contatti in altri paesi :
Tel : +33 3 88 77 57 52
sales@biosynex.com
Servizio post-vendita :
Tel : +33 3 88 77 57 25
Tech.support@biosynex.com

CH REP
BIOSYNEX SWISS S.A.
Route de Rossemaison 100
2800 DELEMONT - Switzerland

Ultime modifiche:
Aggiornamento della tabella dei simboli e dei dati di contatto del produttore.
§7: correzione relativa al campionamento in aspirazione.

PT

CE 0123

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella

PCR PARA A DETEÇÃO QUALITATIVA E DIFERENCIAÇÃO DE *BORDETELLA PERTUSSIS*, *BORDETELLA PARAPERTUSSIS*, *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* E *BORDETELLA HOLMESII* EM AMOSTRAS DE ZARAGATOA NASOFARÍNGEA OU DE ASPIRAÇÃO NASAL.

Exclusivamente para utilização em diagnóstico in vitro profissional.

REF 3150068_SEC01 / 3150068_SEC02

1 I FINALIDADE PREVISTA

O BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella é um teste de diagnóstico molecular *in vitro* para a deteção qualitativa por qPCR e diferenciação de 4 espécies bacterianas do género *Bordetella* detetado na medicina humana: *B. pertussis, B. parapertussis, B. bronchiseptica* e *B. holmesii*. O teste é um auxiliar para o diagnóstico de tosse convulsa realizado com um extrato de ADN obtido a partir de amostras de zaragatoa nasofaríngea ou de aspiração nasal. Este teste não automatizado destina-se apenas à utilização por profissionais em laboratório para diagnóstico *in vitro*.

2 I RESUMO CLÍNICO

O género Bordetella é composto por 9 espécies diferentes. As principais espécies responsáveis por doenças respiratórias em seres humanos são:

– *B. pertussis*, que é um agente responsável pela tosse convulsa e cujo reservatório é exclusivamente humano;

– *B. parapertussis*, uma espécie semelhante a *B. pertussis*, mas que não segrega a toxina *pertussis* e que pode ser responsável pela síndrome de tosse convulsa, que geralmente é menos grave;

– *B. bronchiseptica*, que afeta um grande número de mamíferos e é responsável por infeções respiratórias em seres humanos, nomeadamente em imunocomprometidos;

– e *B. holmesii*, que também pode ser responsável por sintomas respiratórios semelhantes a tosse convulsa e até mesmo septicemia.

Nos pacientes não vacinados ou cujo estado de vacinação contra a tosse convulsa é desconhecido e que apresentam uma tosse persistente, devem ser realizados testes para detetar a presença de Bordetella o mais rapidamente possível, para iniciar o tratamento com antibióticos e isolar o paciente, de modo quebrar a cadeia de infeção.

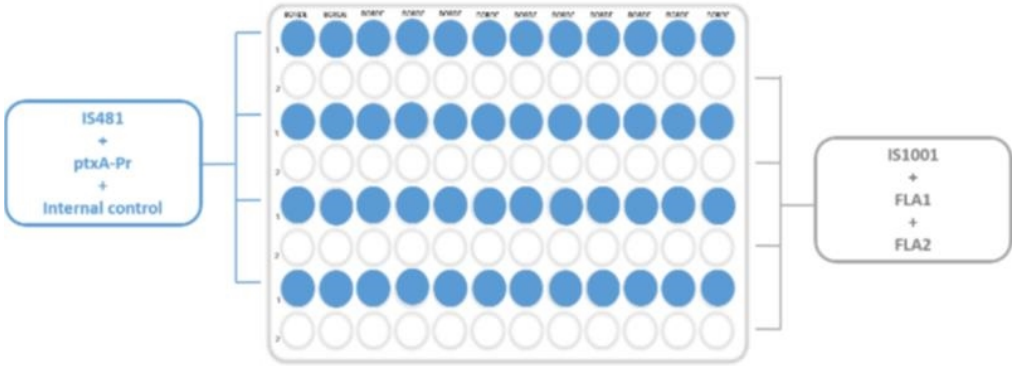
O diagnóstico de tosse convulsa por PCR deve ser realizado nas primeiras três semanas após o surgimento dos sintomas.

3 I PRINCÍPIO DO TESTE

O kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real por hidrólise de sonda fluorescente. É composto por 96 microplacas de poços pré-preenchidas com Master Mixes prontas a utilizar que contêm dNTPs, MgCl2, iniciadores e sondas fluorescentes, enzima polimerase Taq e tampão de reação.

O ensaio consiste num passo de PCR multiplex realizado num termociclador em tempo real, que permite a amplificação específica e deteção simultânea de alvos moleculares que contenham as sequências de interesse: o operão TOX (sequência IS481), a região promotora da toxina pertussis (ptxA-Pr), a sequência de inserção h-IS1001 específica para *B. holmesii* e o gene da flagelina específico para *B. parapertussis* e que permite diferenciá-lo de *B. bronchiseptica* em dois passos (sequências FLA1 e FLA2), bem como o controlo procedimental interno (gene RNAse P humano), que permite avaliar a qualidade da colheita de amostra biológica e validar os passos de extração e purificação de ADN.

Para tal, são utilizadas duas Master Mixes com sondas etiquetadas com fluoróforos FAM, HEX e Cy5.



Na Master Mix de cor azul contida nos poços marcados com "1" na placa pré-preenchida, o fluoróforo FAM é utilizado para a amplificação específica da sequência IS481, HEX para a sequência ptxA-Pr e Cy5 para o gene RNAse P. Na Master Mix transparente contida nos poços marcados com "2" na placa, o fluoróforo FAM é utilizado para a amplificação específica da sequência IS1001, HEX para a sequência FLA1 e Cy5 para a sequência FLA2. A determinação da espécie de Bordetella depende da combinação da deteção destes genes, conforme descrito na secção 10.

O aumento do sinal de fluorescência é detetado apenas se a sequência alvo que complementa a sonda amplificada estiver presente na amostra. O sinal de fluorescência é, assim, diretamente proporcional à amplificação do alvo durante a fase de amplificação. O valor Cq (ciclo de quantificação) corresponde ao número de ciclos ao qual a fluorescência começa a aumentar exponencialmente em contraste com o fundo. O kit pode ser utilizado em dois tipos de amostras:
– zaragatoas nasofaríngeas
– amostras de aspiração nasofaríngea/endonasal

Antes de as amostras serem utilizadas com o kit de amplificação BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella (secção 9), têm primeiro de ser colhidas e tratadas de acordo com os procedimentos descritos nas secções 7 e 8, utilizando o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (ref.ª 3150060 e referências relacionadas) e o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (ref.ª 3150059 e referências relacionadas) ou processadas para obter extratos de ADN purificado utilizando um kit adequado.

4 I CONTEÚDO DO KIT

Material incluído

- 2 microplacas divisíveis de 96 poços pré-preenchidas com Master Mixes
- – 1 tubo de controlo positivo (CONTROLO +, tampa vermelha)
- – 1 tubo de controlo negativo (CONTROLO -, tampa verde)
- 2 sacos de tiras de tampas óticas para selar a microplaca

Material necessário, mas não fornecido

- Kit de extração de ADN
- Luvas descartáveis sem pó
- Pipetas e pontas de filtro
- Termociclador PCR em tempo real
- Centrifugadora de microtubos ou microplaca PCR

O termociclador PCR utilizado para o teste tem de ter as seguintes características principais:
• Sistema aberto
• Ensaios PCR quantitativos em tempo real.
• Bloco termociclador programável

Referência	Bloco termociclador
3150068_SEC01	0,1 ml perfil reduzido
3150068_SEC02	0,2 ml perfil elevado

• Fonte de estimulação: LEDs, lâmpada ou laser

- Conjuntos de filtro (estimulação/emissão de comprimentos de onda) adequados para a deteção de fluoróforos "repórteres" das sondas FAM, HEX e Cy5.
- Ligação a um computador com o software de análise específico que permita a recuperação de dados de fluorescência, ensaios de quantificação absoluta e a interpretação de resultados.

O kit foi desenvolvido e validado com os seguintes termocicladores PCR em tempo real:

Referência	Termociclador
3150068_SEC01	CFX96™ Touch Sistema de Deteção PCR em Tempo Real (Bio-Rad) CFX96™ Opus Sistema de Deteção PCR em Tempo Real (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) Sistema QuantStudio 5 (Applied Biosystems) LightCycler 480 (Roche) Amplix-DT lite 48 (Tecnologia ADN)
3150068_SEC02	CFX96™ Touch Sistema de Deteção PCR em Tempo Real (Bio-Rad) CFX96™ Opus Sistema de Deteção PCR em Tempo Real (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) Sistema QuantStudio 5 (Applied Biosystems) Amplix-DT lite 48 (Tecnologia ADN)

Se for utilizado outro termociclador, efetue a sua própria validação do kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella com os controlos fornecidos e/ou amostras respiratórias classificadas antes de utilizar o teste.

5 I PRECAUÇÕES

- Seguir com atenção estas instruções de utilização. O incumprimento de qualquer instrução neste folheto pode afetar de forma adversa o desempenho do teste e ter consequências nefastas.
- Siga as boas práticas laboratoriais e use luvas de laboratório descartáveis sem pó durante o procedimento de teste.
- A gestão diária de um grande número de amostras e a técnica de PCR de elevada sensibilidade pode, na ausência de precauções, gerar resultados falsos positivos devido a contaminação. O pré-manuseamento do PCR, pós-PCR e a extração de ADN devem ser realizados em espaços separados. Use luvas descartáveis em cada zona e mude-as antes de passar de uma zona para outra.
- O teste e a tampa destinam-se a uma única utilização. Não reutilizar. Não abra os tubos PCR no fim do teste.
- Não utilize o teste se a embalagem de alumínio tiver sido aberta ou danificada. Depois de retirar a embalagem de alumínio, utilize imediatamente o teste.
- Não utilize o kit se este chegar descongelado.
- Não utilize o kit em caso de quebra ou fugas. Caso apenas a embalagem esteja danificada (sem quebra ou fugas), o kit ainda pode ser usado.
- Proteja o kit da luz.
- Centrifugue os tubos antes de abrir, abrindo-os um após o outro e fechando-os bem entre cada um para evitar qualquer contaminação.

O CTRL+ contém quantidades significativas de sequências de ADN. Por, isso é possível que contamine os outros componentes do kit se não forem seguidas boas práticas de biologia molecular. Para limitar este risco de contaminação, recomenda-se o armazenamento deste componente fora do kit quando se abrir o kit pela primeira vez.

•Os controlos negativo e positivo incluídos no kit imitam os resultados obtidos com amostras negativas ou positivas, respetivamente. Têm de ser utilizados com cada execução nova.

•Para garantir que não há contaminação durante o manuseamento, é deixado ao cuidado do utilizador incluir, como parte da sua abordagem de qualidade interna, na frequência escolhida, um poço de controlo negativo experimental no qual 8 µL de água de grau de biologia molecular são adicionados à Master Mix.

- Ao utilizar os controlos negativo e positivo com uma série de pacientes, é recomendado que primeiro deposite o controlo negativo, depois as amostras do paciente e, para terminar, o controlo positivo.
- Descarte peças sujas ou componentes do kit vazios num caixote do lixo adequado para resíduos biológicos.
- O dispositivo contém material de origem bacteriana ou animal, pode transmitir agentes infeciosos e deve ser

manuseado com extrema cautela.

- Se, no decorrer da utilização do BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella, tiver ocorrido uma morte ou degradação grave de saúde, o sucedido deve ser comunicado ao fabricante e às autoridades competentes do seu país. Em caso de dúvida, comunique o ocorrido.
- Ficha de dados de segurança disponibilizada mediante pedido. Um resumo da segurança e desempenho estará disponível online na Eudamed.

6 I ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DO REAGENTE

O kit é enviado congelado. Os componentes do kit devem chegar congelados. Armazene o kit a uma temperatura de –20 °C . Nestas condições, os reagentes ficam estáveis até à data de validade indicada no rótulo do kit. Não utilize o kit nem qualquer um dos seus componentes após a data de validade. Proteja o kit e os reagentes da luz direta.

Os controlos positivo e negativo podem ser submetidos a um máximo de 15 ciclos de congelação/descongelação. Retire e descongele apenas o número necessário de tiras de poços. Quando as tiras estiverem prontas a utilizar, não há motivo para as submeter a ciclos de congelação/descongelação repetidos.

7 I COLHEITA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella permite a amplificação do ADN de todas as 4 espécies de Bordetella. O teste pode ser realizado com um extrato de ADN purificado obtido a partir de amostras nasofaríngeas (zaragatoas) ou de aspiração nasofaríngea/endonasal; ou com as mesmas amostras colhidas com o BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (ref.ª 3150060 e referências relacionadas) e tratadas com o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (ref.ª 3150059 e referências relacionadas).

- Colha amostras nasofaríngeas utilizando zaragotas esterilizadas libertadas nos tubos esterilizados com meio de transporte ou nos fornecidos com o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (ref.ª 3150060 e referências relacionadas).
- Colha amostras de aspiração nasofaríngea/endonasal com um aspirador de muco de acordo com as recomendações do fabricante e liberte-as nos tubos esterilizados com meio de transporte ou nos fornecidos com o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection (ref.ª 3150060 e referências relacionadas). Quando se utiliza o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (ref. 3150059), as amostras aspiradas devem ser utilizadas diretamente sem serem descarregadas num meio de transporte.

As amostras libertadas no meio de transporte BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection podem ser extraídas imediatamente ou no prazo de 4 horas se armazenadas à temperatura ambiente ou armazenadas entre 2 °C e 8 °C durante 24 horas.

O transporte de amostras clínicas deve cumprir os regulamentos locais para o transporte de agentes infeciosos.

8 I EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A extração de ácidos nucleicos deve ser realizada antes do protocolo de amplificação utilizando um sistema de extração adequado para ADN bacteriano. Siga as instruções do fabricante.

O kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella foi validado com os seguintes kits de extração:

- BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (ref. ª 3150059 e referências relacionadas). **O BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis só pode ser utilizado com amostras** nasofaríngeas **colhidas com o BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection. As amostras de aspiração podem ser utilizadas sem descarregar para um meio de transporte.**
- Mini kit para ADN QIAamp (Qiagen – Ref.ª 51306)
- NucleoMag Dx Pathogen (Macherey Nagel – 744215.4)
- Kit de extração de ADN bacteriano Amplix em sistema automatizado Amplix (Tecnologia ADN – Ref.ª OP05006)

Se for utilizado outro kit ou método de extração de ADN, efetue a sua própria validação de método do kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella com amostras respiratórias classificadas antes de utilizar o teste (não utilize os controlos fornecidos).

Não é necessário extrair os controlos positivo e negativo com o Kit de Extração de Ácido Nucleico. Se a utilização de ADN purificado estiver atrasada, antes da adição à Master Mix, armazene a 4 °C ou em gelo no dia do teste.

9 I PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO

Para mais informações sobre o design da placa, consulte a secção 3.
Recomenda-se que as tiras da Master Mix sejam colocadas numa prateleira refrigerada ou em gelo enquanto as amostras estiverem a ser adicionadas.

1. Pegue numa placa que se possa quebrar em tiras de 8 poços e tire o número de tiras necessário. Se for necessário menos do que uma tira inteira de 8 poços, a tira pode ser cortada horizontalmente com uma tesoura.
2. Centrifugue as tiras durante alguns segundos para recolher quaisquer gotículas nas bordas ou na vedação do poço.
3. Retire cuidadosamente e elimine a embalagem de alumínio. Depois de retirar a embalagem de alumínio, utilize imediatamente a tira.
4. Adicione 8 µL de amostra ou controlo segundo o design da placa.
5. Vede os poços com as tampas transparentes fornecidas.
6. Centrifugue as tiras durante alguns segundos.
7. Coloque-as no termociclador e execute o seguinte programa de amplificação:

Programa PCR:

Passo	Repetições	Temperatura	Duração	Aquisição
Ativação de Taq	1x	95°C	3 min.	-
Desnaturação	50x	95°C	10 seg.	-
Hibridação/Alongamento		58°C	45 seg.	sim

Introduza **20 µL** do volume de reação no programa de termociclador.
Consulte as instruções de operação do termociclador utilizado para obter informação relativa à programação.

Configuração de canais de deteção:

Master Mix azul	
Alvo	Fluorocromo
IS481	FAM
ptxA-Pr	HEX
RNAse P (controlo procedimental)	Cy5
Master Mix transparente	
Alvo	Fluorocromo
IS1001	FAM
FLA1	HEX
FLA2	Cy5

10 I ANÁLISE DE DADOS E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

A. Critérios de Validação do Ensaio

Controlo negativo:

A fluorescência emitida deve estar abaixo do limite, com exceção do canal Cy5 da Master Mix azul. Este é um indicador de amplificação não específica. Se a fluorescência estiver acima do limite, verifique se há uma curva atípica. Caso haja uma curva de amplificação, deve ser considerado um erro de distribuição ou contaminação nos microtubos. Apenas o controlo interno RNAse P deve ser amplificado.

Controlo positivo:

O valor do controlo positivo deve, de preferência, ser detetado antes dos 30 ciclos (Cq ≤30). Caso não haja amplificação de um controlo positivo, deve ser considerada a existência de um problema de deteção de amplificação ou fluorescência (termociclador ou instrumento com problemas não adaptado ao método).

Controlo interno de amplificação:

O controlo interno exógeno RNAse P garante que as enzimas na Master Mix estão funcionais e valida os passos de colheita e extração de ácidos nucleicos. De facto, deve observar-se a curva de amplificação do controlo procedimental RNAse P no canal Cy5 dos poços que contenham a Master Mix de cor azul.

Mesmo assim, duas situações de falta de amplificação do controlo interno podem ser constatadas:

- Se os genes alvo estiverem inicialmente presentes na amostra com um número elevado de cópias, o controlo interno pode não ser amplificado. Este resultado é consistente e não invalida o teste. Deve ser interpretado como um resultado positivo apesar da falta de sinal do controlo interno. Este fenómeno é o resultado da competição de amplificação entre o controlo interno e os alvos presentes no elevado número de cópias.
- Se os genes alvo nos canais FAM e HEX não estiverem amplificados, assim como o controlo interno no canal Cy5 na Master Mix azul, nenhum resultado pode ser fornecido. Esta situação mostra a presença de inibidores de PCR. O PCR deve ser repetido, começando pela amostra primária e, de preferência, em ADN extraído.

B. Interpretação qualitativa (positiva ou negativa)

Sinais acima do limite **e visualmente consistentes com a curva de amplificação PCR clássica** são considerados resultados positivos.

Algumas amostras podem mostrar curvas atípicas que não são características de curvas de amplificação. Neste caso, o resultado não deve ser considerado como interpretável e a análise da amostra deve ser repetida com os controlos.

Canais de deteção						Interpretação
Master Mix azul 1			Master Mix transparente 2			
FAM (IS481)	HEX (ptxA-Pr)	Cy5 (RNAse P)	FAM (IS1001)	HEX (FLA1)	Cy5 (FLA2)	
-	-	+	-	-	-	Controlo negativo
+	+	+	+	+	+	Controlo positivo
+	+	+	-	-	-	Paciente com ADN específico de *B. pertussis*
+	+	-	-	-	-	
+	-	+	-	-	-	Paciente com ADN específico de *B. holmesii*
+	-	-	-	-	-	
+ Se Cq >30	-	+/-	-	-	-	Paciente com ADN de *Bordetella spp*
-	-	+	+	+	+	Paciente com ADN específico de *B. parapertussis*
-	-	-	+	+	+	
-	-	+/-	+ Se Cq >30	-	-	Paciente com ADN de *B. parapertussis ou B. bronchiseptica*
+/-*	-	+	+/-*	-	+	Paciente com ADN específico de *B. bronchiseptica*
+/-*	-	-	+/-*	-	+	
-	-	-	-	-	-	Resultado inválido, testar novamente

*O resultado depende da estirpe. De facto, dependendo da estirpe, algumas espécies podem ou não ser portadoras do gene. Por isso, a estirpe *B. bronchiseptica* FR3523 é positiva para IS1001, enquanto a estirpe de referência RB50 é negativa para este gene.

A Master Mix 1 (azul) permite a deteção de *B. pertussis* ou *B. holmesii* e a Master Mix 2 (incolor) permite a deteção de *B. parapertussis*. A combinação de expressão de diferentes genes detetados nos dois poços permite a identificação de outra espécie de *B. bronchiseptica.*

11 I DESEMPENHOS

- **Sensibilidade analítica**

O limite de deteção (LoD) do kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella é definido como a concentração que pode ser detetada a 95% numa amostra específica de ADN de *Bordetella*.

Limites de deteção em amostras de ADN extraído por espécie:

O LoD_{95} em ADN extraído é expresso em número de cópias de ADN/µL. Os extratos de ADN quantificado foram adquiridos à Vircell (AmpliRun®). Os LoD foram avaliados para *Bordetella holmesii* na Master Mix 1, uma vez que é positiva para o gene IS481, para *Bordetella pertussis* na Master Mix 1, uma vez que é positiva para ambos os alvos IS481 e ptxA-Pr e para *Bordetella parapertussis* na Master Mix 2, uma vez que é positiva para IS1001 e para ambos os genes FLA. O ADN quantificado de B bronchiseptica não está disponível no mercado, pelo que não foi possível avaliar o LoD_{95} para esta espécie.

O LoD_{95} do BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella em ADN extraído foi determinado estatisticamente para cada estirpe e sequência genómica. Os resultados são apresentados na tabela abaixo.

Estirpe de Bordetella	LoD_{95} (cópias/µL)
Bordetella pertussis	IS481: 0,043 ptxA-Pr: 4,017
Bordetella parapertussis	IS1001: 0,265 FLA1: 18,418 FLA2: 16,033
Bordetella holmesii	IS481: 0,253

Limites de deteção para amostras colhidas com o meio de transporte AMPLIQUICK Sample Collection e tratadas com o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis:

Os LoD foram determinados ao realizar uma série de diluições de uma amostra de referência com uma concentração conhecida de UFC/ml em zaragotas nasofaríngeas classificadas como negativas para Bordetella libertadas no meio de transporte BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection ou amostras de aspiração nasal negativas e tratadas com o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis.

O LoD_{95} do BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella em ADN tratado com o BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis foi determinado estatisticamente para cada estirpe e sequência genómica. Os resultados são apresentados nas tabelas abaixo.

Estirpe de Bordetella	LoD_{95} para zaragatoas nasofaríngeas				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA4
Bordetella pertussis	22,837 UFC/ml	451,291 UFC/ml	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	38,264 UFC/ml	528,032 UFC/ml	429,806 UFC/ml
Bordetella holmesii	113,354 UFC/ml	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1791,123 UFC/ml

Estirpe de Bordetella	LoD_{95} para amostras de aspiração nasal				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA4
Bordetella pertussis	36,679 UFC/ml	2758,238 UFC/ml	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	52,0 UFC/ml	1535,5 UFC/ml	445,297 UFC/ml
Bordetella holmesii	87,674 UFC/ml	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1101,8 UFC/ml

- **Especificidade analítica**

O desenho de oligonucleótidos (iniciadores e sondas) foi validado *in silico* por alinhamento BLAST. A comparação de sequências obtida mostra uma deteção específica dos alvos BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella.
Nenhum iniciador nem sonda detetou ADN bacteriano além das 4 espécies de Bordetella visadas.

Foram testados 18 extratos de ADN de estirpes classificadas e de referência.
11 extratos de ADN do Centro de Referência Nacional francês positivos para tosse convulsa e outra Bordetelose, 3 sequências de ADN de controlo de um biobanco (AmpliRun®,Vircell) e 4 culturas da estirpe bacteriana padrão (ZeptoMetrix®).

	ADN de controlo		IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA1	FLA2
Biobanco	*ADN de Bordetella pertussis*		+	+	-	-	-
	ADN de Bordetella parapertussis		-	-	+	+	+
	ADN de Bordetella holmesii		+	-	-	-	-
	Espécie	**Estirpe**	**IS481**	**ptxA-Pr**	**IS1001**	**FLA1**	**FLA2**
Cultura padrão	*Bordetella pertussis*	A639	+	+	-	-	-
	Bordetella parapertussis	A747	-	-	+	+	+
	Bordetella holmesii	F061	+	-	-	-	-
	Bordetella bronchiseptica	Z341	-	-	-	+	-
NRC	*Bordetella bronchiseptica*	RB50	+	-	-	-	+
		LAR	+	-	-	+	+
		FR3523	-	-	+	-	+
	Bordetella Petrii	KMBW	-	-	-	-	-
		FR5141	-	-	-	-	-
	Bordetella avium	CIP 103348 T	-	-	-	-	-
		FR6062	-	-	-	-	-
	Bordetella hinzii	CIP 104527 T	-	-	-	-	-
		FR5948	-	-	-	-	-
	Bordetella trematum	CIP 105351 T	-	-	-	-	-
		FR5853	-	-	-	-	-

Reatividade cruzada

Um painel de 76 amostras de ADN e 38 amostras de ARN de um biobanco listadas nas tabelas seguintes foi testado com o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella. Para todas estas amostras, não foi detetada amplificação dos alvos de interesse.

ADN		
Acanthamoeba castellanii	*Escherichia coli (ETEC)*	*Neisseria meningitidis Sg A*
Adenovírus	*Escherichia coli (VTEC)*	*Neisseria meningitidis Sg B*
Adenovirus 41	*Francisella tularensis*	*Neisseria meningitidis Sg C*
Aspergillus fumigatus	*Gardnerella vaginalis*	*Papillomavirus type 16*
Bacillus cereus	*Giardia intestinalis*	*Papillomavirus type 18*
Bartonella henselae	*Haemophilus ducreyi*	*Parvovirus B19 (Plasmid)*
Bartonella Quintana	*Haemophilus influenzae*	*Rickettsia conorii*
Bk Virus	*Helicobacter pylori*	*Salmonella enteritidis*

Borrelia afzelii	*Herpes simplex 1*	*Salmonella typhi*
Borrelia burgdorferi	*Herpes simplex 2*	*Staphylococcus aureus (MecA-)*
Brucella abortus	*Hhv-6*	*Staphylococcus aureus (MecA+)*
Campylobacter jejuni	*Hhv-8*	*Streptococcus agalactiae*
Candida albicans	*Klebsiella pneumoniae (NDM-1)*	*Toxoplasma gondii*
Candida auris	*Legionella pneumophila*	*Treponema pallidum*
Chlamydia trachomatis	*Leishmania chagasi*	*Trichomonas vaginalis*
Chlamydophila pneumoniae	*Leishmania infantum*	*Trypanosoma cruzi*
Chlamydophila psittaci	*Listeria monocytogenes*	*Ureaplasma parvum*
Clostridium difficile	*Moraxella catarrhalis*	*Ureaplasma urealyticum*
Coccidioides immitis	*Mycobacterium avium*	*Varicella-Zoster Virus*
Coxiella burnetii	*Mycobacterium intracellulare*	*Vibrio cholerae*
Cryptosporidium parvum	*Mycobacterium kansasii*	*Yersinia enterocolitica*
Enterococcus faecalis (VanB)	*Mycobacterium tuberculosis*	*Borrelia garinii*
Enterococcus faecium (VanA)	*Mycobacterium ulcerans*	*Cytomegalovirus*
Epstein-Barr Virus	*Mycoplasma genitalium*	*Streptococcus pneumoniae*
Escherichia coli (EAEC)	*Mycoplasma hominis*	
Escherichia coli (EIEC)	*Neisseria gonorrhoeae*	

ARN		
Coronavírus Oc43	*Parainfluenza Humana 1*	*Parainfluenza 4 A*
Vírus Chikungunya	*Gripe A H1*	*Vírus Respiratório Sincicial (Subtipo A)*
Coronavírus	*Gripe A H3*	*Vírus Respiratório Sincicial (Subtipo B)*
Coronavírus SARS (2003)	*Gripe A H5*	*Rinovirus*
Coxsackie A6	*Gripe B*	*Rotavírus*
Coxsackie B1	*Sarampo*	*Rubéola*
Coxsackie B5	*MERS Coronavírus*	*SARS-CoV-2*
Vírus do dengue 1	*Papeira*	*Vírus da encefalite da carraça*
Vírus do dengue 2	*Norovírus*	*Vírus da febre do Vale do Nilo*
Vírus do dengue 3	*Nova Gripe A H1n1*	*Vírus da Febre Amarela*
Vírus do dengue 4	*Parainfluenza 1*	*Vírus Zika*
Echovírus 5	*Parainfluenza 2*	*Vírus Zika (Linhagem asiática)*
Enterovírus 68	*Parainfluenza 3*	

- **Estudo de interferência**

A presença de inibidores de PCR na amostra pode produzir uma interferência positiva ou negativa nos resultados do teste. Foi testada a presença de diferentes inibidores nas amostras.

Pulverizadores nasais

Não foi detetada qualquer interferência positiva ou negativa ao carregar até 10% no meio de transporte BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection de uma matriz de secreções nasofaríngeas tratadas com o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis, com as seguintes substâncias:

Medicamento	Substância ativa
Nasacort	Acetonido de triamcinolona
Aturgyl	Oximetazolina
Beconase	Dipropionato de beclometasona
Budésonide	Budesonida
Mométasone	Mometasona
Avamys	Furoato de fluticasona
Fixorinox	Propionato de fluticasona

Sangue
A presença de sangue nas zaragatoas nasofaríngeas pode produzir uma interferência positiva ou negativa no resultado do teste PCR. O nosso estudo demonstra que as concentrações sanguíneas até 1% não interferem com a reação de PCR quando o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella é utilizado com os kits BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection e BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis. Para concentrações sanguíneas de 2% e superiores, há uma diminuição da sensibilidade. Desta forma, a concentração sanguínea na amostra não deve ser superior a 1%.

- **Desempenhos clínicos**

Os desempenhos clínicos foram determinados em 146 amostras de 4 laboratórios diferentes que foram classificadas como positivas ou negativas para *B. pertussis* ou *B. parapertussis* utilizando testes PCR com marcação CE, referenciados pelo Ministério da Saúde de França.
Estes testes permitem a identificação destas duas estirpes através da amplificação dos genes IS481 e IS1001, que também estão presentes nas estirpes de *B. holmesii* e *B. bronchiseptica*.
As amostras foram classificadas com o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella em extratos de ADN purificado ou após o tratamento com o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis.

	Número de amostras	*B. pertussis*		*B. parapertussis*		Coinfeções	Negativas para Bordetella
		+	-	+	-		
Laboratório 1	63	58	1	8	51	8*	5
Laboratório 2	12	12	0	2	10	2	0
Laboratório 3	31	0	0	0	0	0	31
Laboratório 4	40	0	0	0	0	0	40

*Entre as 8 amostras classificadas como positivas para *B. pertussis* e *B. parapertussis* do laboratório 1, não foi confirmada nenhuma coinfeção utilizando o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella, bem como utilizando outro kit com marcação CE no mercado.

A tabela de contingência abaixo mostra o desempenho do kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella em amostras após a extração/purificação de ADN com um kit comercial:

		Referência PCR	
		Positivo	Negativo
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positivo	69	0
	Negativo	1	76

Sensibilidade: 98,57% (IC 95% : 92,30% a 99,96%) **Especificidade: 100%** (IC 95%: 95,26% a 100%)

A tabela de contingência abaixo mostra o desempenho do BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella em amostras tratadas com o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis:

		Referência PCR	
		Positivo	Negativo
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positivo	66	0
	Negativo	4	76

Sensibilidade: 94,29% (IC 95%: 86,01% a 98,42%) **Especificidade: 100%** (IC 95%: 95,26% a 100%)

Para este estudo, não tínhamos acesso às amostras clínicas de pacientes positivas para *B. bronchiseptica* e *B. holmesii* (amostras raras). O desempenho do kit para estas duas espécies foi validado com estirpes fornecidas pelo Centro de Referência Nacional francês para tosse convulsa e outra Bordetelose.

- **Precisão**

Os dados de precisão no contexto do kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella foram determinados com base em 4 condições:

- Variabilidade intraensaio (intradiária, dentro da mesma experiência)
- Variabilidade entre dias
- Variabilidade interoperadores
- Variabilidade entre lotes

Os dados variáveis são apresentados em termos de valor médio, desvio padrão e variação de coeficiente, baseados nos valores de ciclo limite (Cq) do ADN de Bordetella.

Dados variáveis intraensaio:

Foram testadas duas diluições de amostra para cada espécie de Bordetella detetada pelo kit: 1 alta (+++) correspondente a 1000 cópias/µL e 1 baixa (+) correspondente a 10 cópias/µL. Foram utilizadas duas diluições baixas diferentes para *B. pertussis* e *B. parapertussis*, uma vez que os seus dois alvos positivos têm sensibilidades diferentes, os genes IS481 e IS1001 são multicópias e a ptxA-Pr e os genes FLA são monocópias.
Cada amostra foi testada 30 vezes.

ADN extraído

			Mix 1		
	Diluição de amostra	**Alvo**	**Cq médio**	**SD**	**% de CV**
B pertussis	+++	IS481	13,3	0,1	0,9
	+ (ptxA-Pr)		27,4	1,1	4,0
	- (IS481)		34,7	0,3	1,0
	+++	ptxA-Pr	19,6	0,2	0,8
	+ (ptxA-Pr)		34,3	0,7	2,2
B holmesii	+++	IS481	21,2	0,1	0,7
	+		36,2	0,5	1,3

			Mix 2		
	Diluição de amostra	**Alvo**	**Cq médio**	**SD**	**% de CV**
B parapertussis	+++	IS1001	15,8	0,3	1,7
	+ (FLA1 e 2)		29,1	0,1	0,5
	+ (IS1001)		35,1	0,7	1,9
	+++	FLA1	21,5	0,2	0,8
	+ (FLA1 e 2)		35,2	0,4	1,2
	+++ (FLA1 e 2)	FLA2	21,9	0,2	0,8
			34,7	0,3	0,9
B bronchiseptica	+++	FLA2	21,8	0,1	0,6
	+		36,6	0,6	1,7

Pré-tratamento com o kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis

	Diluição de amostra	Alvo	Mix 1 Cq médio	SD	% de CV		Diluição de amostra	Alvo	Mix 2 Cq médio	SD	% de CV
B pertussis	+++	IS481	14,7	0,2	1,0	*B parapertussis*	+++	IS1001	13,7	0,2	1,2
	+ (ptxA-Pr)		28,8	1,0	3,4		+ (FLA1 e 2)		31,3	0,2	0,8
	+ (IS481)		34,4	1,2	3,4		+ (IS1001)		34,5	0,8	2,4
	+++	ptxA-Pr	22,4	0,1	0,6		+++	FLA1	19,2	0,2	1,1
	+ (ptxA-Pr)		35,5	1,1	3,0		+ (FLA1 e 2)		37,1	0,6	1,7
							+++	FLA2	18,9	0,2	1,1
							(FLA1 e 2)		34,9	0,5	1,4
B holmesii	+++	IS481	21,5	0,0	0,2	*B bronchiseptica*	+++	FLA2	18,6	0,2	0,8
	+		35,4	1,4	4,0		+		34,8	0,3	0,8

Dados variáveis interensaios:
Foram testadas duas diluições de amostra para cada espécie de Bordetella detetada pelo kit: 1 alta (+++) correspondente a 1000 cópias/µL e 1 baixa (+) correspondente a 10 cópias/µL.
Cada amostra é testada em duplicado duas vezes por dia, durante 5 dias.
As amostras negativas apresentam resultados negativos.

	+++			+		
Gene	Valor Cq médio da amostra +++	Desvio padrão	Coeficiente de variação %	Valor Cq médio da amostra +	Desvio padrão	Coeficiente de variação %
IS481	27,7	0,1	0,4	33,9	0,2	0,6
ptxA-Pr	27,3	0,1	0,3	33,4	0,2	0,5
IS1001	27,6	0,1	0,4	33,6	0,3	0,8
FLA1	29,5	0,2	0,6	35,7	0,1	0,4
FLA2	28,6	0,2	0,8	34,7	0,3	0,7

Dados variáveis interoperadores:
Foram testadas duas diluições de amostra para cada espécie de Bordetella detetada pelo kit: 1 alta (+++) correspondente a 1000 cópias/µL e 1 baixa (+) correspondente a 10 cópias/µL.
duas vezes por dia por dois operadores diferentes, durante 5 dias.
As amostras negativas apresentam resultados negativos.

	+++			+		
Gene	Valor Cq médio da amostra +++	Desvio padrão	Coeficiente de variação %	Valor Cq médio da amostra +	Desvio padrão	Coeficiente de variação %
IS481	27,6	0,1	0,4	33,9	0,0	0,1
ptxA-Pr	27,2	0,1	0,4	33,4	0,0	0,1
IS1001	27,5	0,1	0,2	33,6	0,0	0,1
FLA1	29,4	0,1	0,4	35,6	0,0	0,1
FLA2	28,6	0,0	0,0	34,8	0,0	0,1

Dados variáveis entre lotes:
Foram testadas duas diluições de amostra para cada espécie de Bordetella detetada pelo kit: 1 alta (+++) correspondente a 1000 cópias/µL e 1 baixa (+) correspondente a 10 cópias/µL.

Cada amostra foi testada em triplicado ou duplicado em dois lotes diferentes.
As amostras negativas apresentam resultados negativos.

	+++			+		
Gene	Valor Cq médio da amostra +++	Desvio padrão	Coeficiente de variação %	Valor Cq médio da amostra +	Desvio padrão	Coeficiente de variação %
IS481	26,9	0,2	0,6	33,4	0,4	1,1
ptxA-Pr	27,4	0,1	0,5	33,7	0,7	2,0
IS1001	26,9	0,0	0,0	33,0	0,3	0,9
FLA1	29,1	0,1	0,5	35,1	0,0	0,0
FLA2	28,5	0,0	0,1	34,6	0,1	0,3

12 I LIMITAÇÕES

1. O incumprimento de qualquer instrução no folheto pode afetar de forma adversa o desempenho do teste e/ou invalidar o resultado do teste.
2. Tal como sucede com todos os testes de diagnóstico, os resultados têm de ser considerados juntamente com outras informações clínicas à disposição do médico. Um resultado negativo nunca deve excluir a possibilidade de presença de Bordetella na amostra (por exemplo, os genes podem estar presentes numa concentração inferior ao limite mínimo de deteção do teste, pode haver interferências) e um resultado positivo nunca pode assegurar a presença de Bordetella na amostra (por exemplo, contaminação). Um diagnóstico definitivo só pode ser efetuado pelo médico após a avaliação de todos os dados clínicos e de laboratório.
3. As amostras com mais de 1% de sangue podem interferir com o resultado do teste. No caso de existir sangue na amostra, o resultado deve ser interpretado com cautela.

13 I BIBLIOGRAFIA

- Pittet LF, Emonet S, Schrenzel J, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Bordetella holmesii : an under-recognized Bordetella species. The Lancet Infectious Diseases. 2014; 14(6):510-9.
- Pittet LF, Emonet S, François P, Bonetti EJ, Schrenzel J, Hug M, Altwegg M, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Diagnosis of whooping cough in Switzerland: Differentiating Bordetella pertussis from Bordetella holmesii by polymerase chain reaction. PLoS One. 2014; 9(2): e88936
-Sanz JC, Abad R, Sanz C, Miguel A. Diagnóstico diferencial de Bordetella bronchiseptica por RT-PCR en un ní no con tos paroxística sin antecedentes patológicos previos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.09.016

14 I SÍMBOLOS

	Consultar as instruções de utilização ou as instruções de utilização eletrónicas		Suficiente para <n> teste(s)	REF	Número de catálogo
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*		Limite de temperatura		Não reutilizar
	Fabricante	LOT	Código de lote		Data de validade
	Manter afastado da luz solar	Mmix	Master Mix		Microplaca
CONTROL -	Controlo negativo	CONTROL +	Controlo positivo	UDI	Identificação única do dispositivo
	Saco com tiras de tampas		Não utilizar se a embalagem estiver danificada e consultar as instruções de utilização	CH REP	Representante autorizado na Suíça

	Importador	+/-	Deteção qualitativa por PCR		

15 I INFORMAÇÕES SOBRE O FABRICANTE

BIOSYNEX S.A.
22 boulevard Sébastien Brant
67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN – France
Standard:
Tel : +33 3 88 78 78 87
www.biosynex.com
Contactos França:
Tel. : +33 3 88 77 57 00
service.cients@biosynex.com
Contactos noutros países:
Tel. : +33 3 88 77 57 52
sales@biosynex.com
Serviço pós-venda:
Tel. : +33 3 88 77 57 25
Tech.support@biosynex.com

CH REP **BIOSYNEX SWISS S.A.**
Route de Rossemaison 100
2800 DELEMONT - Switzerland

Últimas alterações:
Atualização da tabela de símbolos e dos dados de contacto do fabricante.
§7: correção relativa à amostragem por aspiração.

EL

CE 0123

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella (κοκκύτης)

PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΙΚΉ ΑΝΊΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΊΗΣΗ ΤΗΣ BORDETELLA PERTUSSIS (ΑΙΜΌΦΙΛΟΣ ΤΟΥ ΚΟΚΚΎΤΗ), BORDETELLA PARAPERTUSSIS, BORDETELLA BRONCHISEPTICA ΚΑΙ BORDETELLA HOLMESII ΣΕ ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΙΚΆ ΕΠΙΧΡΊΣΜΑΤΑ Ή ΡΙΝΙΚΈΣ ΑΝΑΡΡΟΦΉΣΕΙΣ.

Αποκλειστικά για επαγγελματική in vitro διαγνωστική χρήση.

REF 3150068_SEC01 / 3150068_SEC02

1 I ΕΝΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΟΣ ΣΚΟΠΟΣ

Το BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella είναι ένα μοριακό «in vitro» διαγνωστικό τεστ για την ποιοτική ανίχνευση με qPCR και διαφοροποίηση 4 ειδών βακτηρίων του γένους Bordetella (Κοκκύτης) που συναντώνται στην ιατρική: *B. pertussis, B. parapertussis, B. bronchiseptica* και *B. holmesii.* Το τεστ είναι ένα βοήθημα για τη διάγνωση του κοκκύτη που πραγματοποιείται με τη χρήση εκχυλίσματος DNA που λαμβάνεται από ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα ή ρινικές αναρροφήσεις. Αυτή η μη αυτοματοποιημένη δοκιμή προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση στο εργαστήριο μόνο από επαγγελματίες.

2 I ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος Bordetella αποτελείται από 9 διαφορετικά είδη. Τα κύρια είδη που ευθύνονται για τις ασθένειες του αναπνευστικού στον άνθρωπο είναι:

- B. pertussis που είναι ο υπεύθυνος για τον κοκκύτη και του οποίου η «δεξαμενή αποθήκευσης» είναι αποκλειστικά ανθρώπινη,
- B. parapertussis, ένα είδος κοντά στο B. pertussis αλλά που δεν εκκρίνει τοξίνη του κοκκύτη και που μπορεί να ευθύνεται για σύνδρομο κοκκύτη που είναι συνήθως λιγότερο σοβαρό,

B. bronchiseptica, που προσβάλλει μεγάλο αριθμό θηλαστικών και ευθύνεται στον άνθρωπο για λοιμώξεις του αναπνευστικού κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους,

- και B. holmesii που μπορεί επίσης να είναι υπεύθυνη για αναπνευστικά συμπτώματα παρόμοια με τον κοκκύτη και ακόμη και τη σηψαιμία.

Σε μη εμβολιασμένους ασθενείς ή σε εκείνους των οποίων η κατάσταση εμβολιασμού κατά του κοκκύτη είναι άγνωστη, που παρουσιάζουν επίμονο βήχα, η δοκιμή Bordetella θα πρέπει να γίνεται το συντομότερο δυνατό για την έναρξη της αντιβιοτικής θεραπείας και την απομόνωση του ασθενούς προκειμένου να σπάσει η αλυσίδα της λοίμωξης.

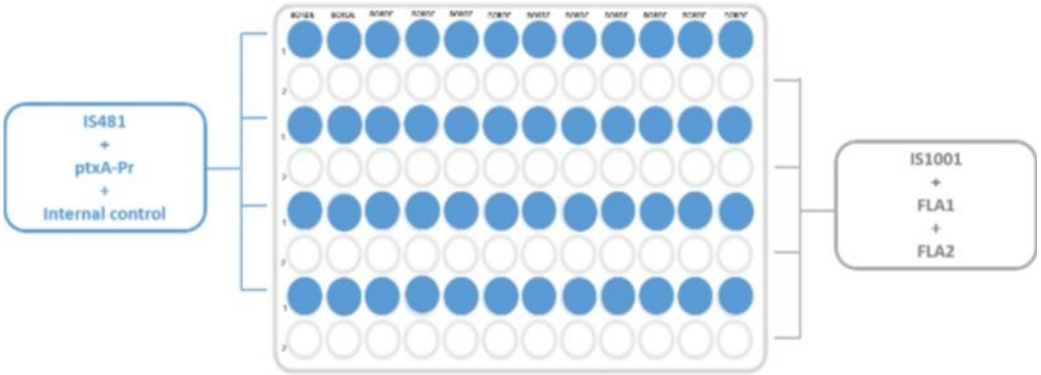
Η διάγνωση του κοκκύτη με PCR θα πρέπει να γίνεται εντός των πρώτων τριών εβδομάδων μετά την έναρξη των συμπτωμάτων.

3 I ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Το κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella είναι μια «in vitro» διαγνωστική δοκιμή που βασίζεται στην τεχνολογία Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) σε πραγματικό χρόνο με υδρόλυση φθορίζοντος ανιχνευτή. Αποτελείται από μικροπλάκες 96 φρεατίων προγεμισμένες με δύο έτοιμα προς χρήση μείγματα Master που περιέχουν dNTPs, MgCl2, εκκινητές και φθορίζοντες ανιχνευτές, ένζυμο πολυμεράσης Taq και ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης.

Ο προσδιορισμός αποτελείται από ένα στάδιο multiplex PCR που πραγματοποιείται σε έναν θερμοκυκλωτή σε πραγματικό χρόνο, επιτρέποντας την ειδική ενίσχυση και ταυτόχρονη ανίχνευση μοριακών στόχων που φέρουν τις αλληλουχίες ενδιαφέροντος: το οπερόνιο TOX (αλληλουχία IS481), την περιοχή του υποκινητή της τοξίνης του κοκκύτη (ptxA-Pr), την αλληλουχία εισαγωγής h-IS1001 που είναι ειδική για το *B. holmesii* και το γονίδιο μαστιγίνης ειδικό για το *B. parapertussis* και το οποίο επιτρέπει τη διαφοροποίησή του από το *B. bronchiseptica* σε δύο στάδια (αλληλουχίες FLA1 και FLA2), καθώς και τον εσωτερικό διαδικαστικό έλεγχο – (γονίδιο ανθρώπινης RNAse P) που επιτρέπει την αξιολόγηση της ποιότητας της συλλογής βιολογικών δειγμάτων και την επικύρωση των σταδίων εξαγωγής και καθαρισμού DNA.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται δύο μείγματα Master που περιέχουν ανιχνευτές επισημασμένους με φθοροφόρα FAM, HEX και Cy5.



Στο μπλε χρώματος Master μείγμα που περιέχεται στα φρεάτια με την ένδειξη "1" στην προγεμισμένη πλάκα, το φθοροφόρο FAM χρησιμοποιείται για την ειδική για την αλληλουχία ενίσχυση του IS481, HEX για την αλληλουχία ptxA-Pr και Cy5 για το γονίδιο RNAse P. Στο διαυγές μείγμα Master που περιέχεται στα φρεάτια με την ένδειξη "2" στην πλάκα, το φθοροφόρο FAM χρησιμοποιείται για την ειδική για την αλληλουχία ενίσχυση του IS1001, το HEX για την αλληλουχία FLA1 και το Cy5 για την αλληλουχία FLA2.
Ο προσδιορισμός του είδους Bordetella εξαρτάται από τον συνδυασμό ανίχνευσης αυτών των γονιδίων όπως περιγράφεται στην §10.

Η αύξηση του σήματος φθορισμού ανιχνεύεται μόνο εάν η αλληλουχία στόχος συμπληρωματική προς τον ενισχυμένο ανιχνευτή υπάρχει στο δείγμα. Το σήμα φθορισμού είναι επομένως ευθέως ανάλογο με την ενίσχυση του στόχου κατά τη φάση ενίσχυσης. Η τιμή Cq (ποσοτικοποίηση κύκλου) αντιστοιχεί στον αριθμό των κύκλων στους οποίους ο φθορισμός αρχίζει να αυξάνεται εκθετικά σε αντίθεση με το φόντο. Το κιτ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δύο τύπους δειγμάτων:
- ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα
- ρινοφαρυγγικά/ενδορινικά δείγματα αναρρόφησης

Πριν από τη χρήση τους με το κιτ ενίσχυσης BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella (§9),
τα δείγματα πρέπει πρώτα να συλλέγονται και να υποβάλλονται σε επεξεργασία σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις §7 και §8 χρησιμοποιώντας κιτ συλλογής δειγμάτων BIOSYNEX AMPLIQUICK (αναφορά 3150060 και σχετικές αναφορές) και κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (αναφορά 3150059 και σχετικές αναφορές) ή να υποβάλλονται σε επεξεργασία για να ληφθούν καθαρισμένα εκχυλίσματα DNA χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο κιτ.

4 I ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΟΥ ΚΙΤ

Υλικά που παρέχονται

- 2 διαιρούμενες μικροπλάκες 96 πηγαδιών προγεμισμένες με τα μείγματα Master
- 1 σωληνάριο θετικού μάρτυρα (CONTROL +, κόκκινο καπάκι)
- 1 σωληνάριο αρνητικού μάρτυρα (CONTROL -, πράσινο καπάκι)
- 2 σακούλες οπτικών λωρίδων καπακιού, για σφράγιση μικροπλακών

Απαιτούμενα υλικά τα οποία δεν παρέχονται

- Κιτ εξαγωγής DNA - Γάντια μιας χρήσης χωρίς πούδρα
- Πιπέτες και φιλτραρισμένα άκρα - Θερμικός κύκλος PCR σε πραγματικό χρόνο
- PCR μικροπλάκα ή μικροσωλήνες φυγοκέντρησης

Ο θερμικός κυκλοποιητής PCR που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή πρέπει να έχει τα ακόλουθα κύρια χαρακτηριστικά:
• Ανοικτό σύστημα
• Ποσοτικές αναλύσεις PCR σε πραγματικό χρόνο.
• Προγραμματιζόμενο μπλοκ θερμικού κύκλου

Αναφορά	Μπλοκ θερμικής ανακύκλωσης
3150068_SEC01	0,1 ml χαμηλού προφίλ
3150068_SEC02	0,2 ml υψηλού προφίλ

• Πηγή διέγερσης: LED, λαμπτήρας ή λέιζερ

- Σετ φίλτρων (μήκη κύματος διέγερσης/εκπομπής) κατάλληλα για την ανίχνευση φθοροφόρων «αναφορών» των ανιχνευτών FAM, HEX και Cy5.
- Σύνδεση με υπολογιστή με χρήση ειδικού λογισμικού ανάλυσης που επιτρέπει την ανάκτηση δεδομένων φθορισμού, απόλυτους ποσοτικούς προσδιορισμούς και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Το κιτ έχει αναπτυχθεί και επικυρωθεί με τους ακόλουθους θερμικούς κυκλοποιητές PCR σε πραγματικό χρόνο:

Αναφορά	Θερμικός κυκλοποιητής
3150068_SEC01	Σύστημα ανίχνευσης PCR σε πραγματικό χρόνο αφής CFX96™ (Bio-Rad). Σύστημα ανίχνευσης PCR σε πραγματικό χρόνο CFX96™ Opus (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) Σύστημα QuantStudio 5 (Εφαρμοσμένα βιοσυστήματα) LightCycler 480 (Roche) Amplix-DT lite 48 (Τεχνολογία DNA)
3150068_SEC02	Σύστημα ανίχνευσης PCR σε πραγματικό χρόνο αφής CFX96™ (Bio-Rad). Σύστημα ανίχνευσης PCR σε πραγματικό χρόνο CFX96™ Opus (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) Σύστημα QuantStudio 5 (Εφαρμοσμένα βιοσυστήματα) Amplix-DT lite 48 (Τεχνολογία DNA)

Εάν χρησιμοποιείται άλλος θερμικός κυκλοποιητής, εκτελέστε τη δική σας επικύρωση του κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella χρησιμοποιώντας τους παρεχόμενους μάρτυρες ή και τα κατάλληλα αναπνευστικά δείγματα πριν χρησιμοποιήσετε τη δοκιμή.

5 I ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Ακολουθήστε προσεκτικά αυτές τις οδηγίες χρήσης. Η μη τήρηση οποιασδήποτε οδηγίας αυτής της IFU μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την απόδοση της δοκιμής και να έχει επιβλαβείς συνέπειες.
- Ακολουθήστε την Ορθή Εργαστηριακή Πρακτική και φοράτε εργαστηριακά γάντια μιας χρήσης χωρίς πούδρα καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας δοκιμής.
- Η καθημερινή διαχείριση μεγάλου αριθμού δειγμάτων και η υψηλή ευαισθησία της τεχνικής PCR μπορούν, εάν λείψει προφύλαξης, να δημιουργήσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μόλυνσης. Ως εκ τούτου, η PCR πριν από το χειρισμό, η μετά την PCR και η εξαγωγή DNA θα πρέπει να εκτελούνται σε ξεχωριστούς χώρους. Να φοράτε γάντια μίας χρήσης σε κάθε ζώνη και να τα αλλάζετε πριν μετακινηθείτε από τη μία ζώνη στην άλλη.
- Το τεστ δοκιμής και το καπάκι προορίζονται μόνο για μία χρήση. Να μην επαναχρησιμοποιηθεί. Μην ανοίγετε τους μικροσωλήνες PCR στο τέλος της δοκιμής.
- Μην χρησιμοποιείτε το τεστ εάν το φύλλο αλουμινίου είναι ανοιχτό ή έχει καταστραφεί. Μόλις αφαιρεθεί το αλουμινόχαρτο, χρησιμοποιήστε αμέσως το τεστ.
- Μην χρησιμοποιείτε το κιτ εάν παρελήφθη χωρίς να είναι παγωμένο.
- Μη χρησιμοποιείτε το κιτ σε περίπτωση θραύσης λόγω διαρροής. Σε περίπτωση ζημιάς μόνο της συσκευασίας (χωρίς θραύση ή διαρροή), το κιτ παραμένει χρησιμοποιήσιμο.
- Προστατέψτε το κιτ από το φως.
- Φυγοκεντρήστε τους σωλήνες πριν ανοίξετε, ανοίγοντάς τους το ένα μετά το άλλο κλείνοντάς τους καλά μεταξύ τους για να αποφύγετε τυχόν μόλυνση.
- Το CTRL+ περιέχει σημαντικές ποσότητες αλληλουχιών DNA. Ως εκ τούτου, μπορεί να μολύνει δυνητικά τα άλλα συστατικά του κιτ εάν δεν ακολουθηθούν οι καλές πρακτικές μοριακής βιολογίας. Για να περιοριστεί αυτός ο κίνδυνος μόλυνσης, συνιστάται να αποθηκεύετε αυτό το εξάρτημα έξω από το κιτ κατά το πρώτο άνοιγμα του κιτ.
- Οι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες που περιλαμβάνονται στο κιτ μιμούνται τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με αρνητικά ή θετικά δείγματα αντίστοιχα. Πρέπει να χρησιμοποιούνται με κάθε νέα εκτέλεση.
- Για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει μόλυνση κατά τον χειρισμό, επαφίεται στον χρήστη να συμπεριλάβει ως μέρος της εσωτερικής ποιοτικής προσέγγισης, στην επιλεγμένη συχνότητα, ένα πηγαδάκι αρνητικού ελέγχου πειράματος στο οποίο προστίθενται 8 μL νερού βαθμού μοριακής βιολογίας στο κύριο μείγμα

- Όταν χρησιμοποιείτε αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες με μια σειρά ασθενών, συνιστάται πρώτα η κατάθεση του αρνητικού μάρτυρα, μετά η κατάθεση των δειγμάτων ασθενών και η ολοκλήρωση με την κατάθεση του θετικού μάρτυρα.
- Απορρίψτε τα λερωμένα εξαρτήματα ή τα κενά συστατικά του κιτ σε κάδο απορριμμάτων κατάλληλο για βιολογικά απόβλητα.
- Η συσκευή περιέχει υλικό βακτηριακής ή ζωικής προέλευσης και μπορεί να μεταδώσει μολυσματικούς παράγοντες και θα πρέπει να χρησιμοποιείται με εξαιρετική προσοχή.
- Εάν, σε σχέση με τη χρήση του BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella, έχει συμβεί θάνατος ή σοβαρή επιδείνωση της υγείας, αυτό θα πρέπει να αναφερθεί στον κατασκευαστή και στην αρμόδια αρχή της χώρας σας. Εάν υπάρχουν αμφιβολίες, θα πρέπει να γίνεται αναφορά.
- Διατίθεται, κατόπιν αιτήσεως, δελτίο δεδομένων ασφάλειας. Η περίληψη της ασφάλειας και της απόδοσης θα είναι διαθέσιμη online στο Eudamed.

6 I ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

Το κιτ αποστέλλεται κατεψυγμένο. Τα εξαρτήματα του κιτ πρέπει να φτάνουν παγωμένα. Αποθηκεύστε το κιτ σε θερμοκρασία -20°C. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του κιτ. Μη χρησιμοποιείτε το κιτ και οποιοδήποτε από τα συστατικά του μετά την ημερομηνία λήξης. Προστατέψτε το κιτ και τα αντιδραστήρια από το άμεσο φως.
Ο θετικός και ο αρνητικός έλεγχος μπορεί να υποβληθούν σε έως και 15 κύκλους κατάψυξης/απόψυξης.
Αφαιρέστε και αποψύξτε μόνο τον απαιτούμενο αριθμό λωρίδων φρεατίων. Καθώς οι ταινίες είναι έτοιμες για χρήση, δεν υπάρχει λόγος να τις υποβάλετε σε επαναλαμβανόμενους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

7 I ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ

Το BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella επιτρέπει την ενίσχυση του DNA και των 4 ειδών Bordetella. Η δοκιμή μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας καθαρισμένο εκχύλισμα DNA από ρινοφαρυγγικά δείγματα (επιχρίσματα) ή ρινοφαρυγγικές/ενδορινικές αναρροφήσεις, ή τα ίδια δείγματα που συλλέχθηκαν στη συλλογή δειγμάτων BIOSYNEX AMPLIQUICK (αναφορά 3150060 και σχετικές αναφορές) και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (αναφορά 3150059 και σχετικές αναφορές).

- Συλλέξτε ρινοφαρυγγικά δείγματα χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα επιχρίσματα που εκφορτώνονται σε αποστειρωμένα σωληνάρια που περιέχουν μέσο μεταφοράς ή αυτά που είναι διαθέσιμα στο κιτ συλλογής δειγμάτων BIOSYNEX AMPLIQUICK (αναφορά 3150060 και σχετικές αναφορές).
- Συλλέξτε ρινοφαρυγγικά/ενδορινικά δείγματα αναρρόφησης με αναρροφητήρα βλέννας σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή και αδειάστε τα στο μέσο μεταφοράς του κιτ συλλογής δειγμάτων BIOSYNEX AMPLIQUICK (αριθ. καταλόγου 3150060 και σχετιζόμενοι αριθμοί καταλόγου). Όταν χρησιμοποιείται το κιτ λύσης BIOSYNEX AMPLIQUICK (κωδ. 3150059), τα αναρροφημένα δείγματα πρέπει να χρησιμοποιούνται απευθείας χωρίς να εκφορτώνονται σε μέσο μεταφοράς.

Τα δείγματα που απορρίπτονται στο μέσο μεταφοράς BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection μπορούν είτε να εξαχθούν αμέσως ή εντός 4 ωρών εάν αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου ή να αποθηκευτούν μεταξύ 2°C και 8°C για 24 ώρες.

Η μεταφορά κλινικών δειγμάτων πρέπει να συμμορφώνεται με τους τοπικούς κανονισμούς για τη μεταφορά μολυσματικών παραγόντων.

8 I ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Η εκχύλιση με νουκλεϊκά οξέα πρέπει να εκτελείται πριν από το πρωτόκολλο ενίσχυσης χρησιμοποιώντας κατάλληλο σύστημα εκχύλισης για βακτηριακό DNA. Ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή.
Το κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella έχει επικυρωθεί με τα ακόλουθα κιτ εξαγωγής:

- BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis (αναφορά 3150059 και σχετικές αναφορές). **Το BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο με ρινοφαρυγγικά δείγματα που συλλέγονται με τη συλλογή δειγμάτων BIOSYNEX AMPLIQUICK. Τα δείγματα αναρρόφησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς εκφόρτωση σε μέσο μεταφοράς.**
- Μίνι κιτ QIAamp DNA (Qiagen – Αναφορά 51306)
- NuceloMag Dx Pathogen (Macherey Nagel – 744215.4)
- Κιτ εξαγωγής βακτηριακού DNA Amplix σε αυτοματοποιημένο σύστημα Amplix (Τεχνολογία DNA - Αναφορά OP05006)

Εάν χρησιμοποιείται άλλη μέθοδος ή κιτ εξαγωγής DNA, εκτελέστε την επικύρωση της δικής σας μεθόδου του κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella χρησιμοποιώντας κατάλληλα αναπνευστικά δείγματα πριν από τη χρήση της δοκιμής (μην χρησιμοποιείτε τους μάρτυρες που παρέχονται).

Δεν είναι απαραίτητο να εξαγάγετε τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες με το κιτ εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων. Εάν καθυστερήσει η χρήση καθαρισμένου DNA, πριν την προσθήκη στο Master Mix, αποθηκεύστε στους 4°C ή σε πάγο την ημέρα της δοκιμής.

9 I ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ

Για το σχέδιο της πλάκας, ανατρέξτε στην §3.
Συνιστάται οι ταινίες Master mix να τοποθετούνται σε σχάρα ψύξης ή σε πάγο κατά την προσθήκη δειγμάτων.

1. Πάρτε ένα σπάσιμο πιάτο σε ταινίες των 8 φρεατίων και πάρτε τον αριθμό των λωρίδων που απαιτούνται. Εάν χρειάζεται λιγότερη από μια ολόκληρη ταινία 8 φρεατίων, η λωρίδα μπορεί να κοπεί οριζόντια χρησιμοποιώντας ένα ψαλίδι.
2. Φυγοκεντρήστε τις λωρίδες για λίγα δευτερόλεπτα για να συλλέξετε τυχόν σταγονίδια στις άκρες του πηγαδιού ή στη σφράγιση.
3. Αφαιρέστε προσεκτικά και απορρίψτε το φύλλο αλουμινίου. Μόλις αφαιρεθεί το αλουμινόχαρτο, χρησιμοποιήστε αμέσως το τεστ.
4. Προσθέστε 8 μL δείγματος ή ελέγχου σύμφωνα με το σχέδιο της πλάκας.
5. Κλείστε τα φρεάτια με τα παρεχόμενα διαφανή καπάκια.
6. Φυγοκεντρήστε τις ταινίες για λίγα δευτερόλεπτα.
7. Τοποθετήστε τις στον θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το ακόλουθο πρόγραμμα ενίσχυσης:

Πρόγραμμα PCR:

Βήμα	Επαναλήψεις	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Απόκτημα
Ενεργοποίηση Taq	1x	95°C	3 λεπτά	-
Μετουσίωση	50x	95°C	10 δευτερόλεπτα	-
Υβριδοποίηση / Επιμήκυνση		58°C	45 δευτερόλεπτα	Ναι

Εισαγάγετε 20 μL όγκου αντίδρασης στο πρόγραμμα του Θερμικού κυκλοποιητή
Ανατρέξτε στις οδηγίες λειτουργίας του θερμικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται για πληροφορίες προγραμματισμού.

Ρύθμιση καναλιών ανίχνευσης:

Μείγμα Blue Master	
Στόχος	Φθοροχρώμιο
IS481	FAM
ptxA-Pr	HEX
RNAse P (διαδικαστικός έλεγχος)	Cy5
Μείγμα Clear Master	
Στόχος	Φθοροχρώμιο
IS1001	FAM
FLA1	HEX
FLA2	Cy5

10 I ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

A. Κριτήρια επικύρωσης δοκιμής

Αρνητικός έλεγχος:

Ο φθορισμός που εκπέμπεται πρέπει να είναι κάτω από το κατώφλι με εξαίρεση το κανάλι Cy5 του μείγματος Blue Master. Αυτός είναι ένας δείκτης μη ειδικής ενίσχυσης. Εάν ο φθορισμός είναι πάνω από το όριο, ελέγξτε για άτυπη

καμπύλη. Στην περίπτωση μιας καμπύλης ενίσχυσης, πρέπει να ληφθεί υπόψη μια μόλυνση ή ένα σφάλμα κατανομής στους μικροσωλήνες. Θα πρέπει να ενισχυθεί μόνο η RNAse P εσωτερικού ελέγχου.

Θετικός έλεγχος:
Η τιμή του θετικού μάρτυρα θα πρέπει κατά προτίμηση να ανιχνεύεται πριν από 30 κύκλους (Cq ≤ 30). Σε περίπτωση απουσίας ενίσχυσης του θετικού μάρτυρα, η ύπαρξη προβλήματος ενίσχυσης ή ανίχνευσης φθορισμού (ελαττωματικός θερμικός κυκλοποιητή ή όργανο μη προσαρμοσμένο στη μέθοδο) θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη.

Εσωτερικός έλεγχος ενίσχυσης:
Ο εξωγενής εσωτερικός έλεγχος RNAse P διασφαλίζει ότι τα ένζυμα στο Master mix είναι λειτουργικά και επικυρώνει τα βήματα συλλογής και εκχύλισης νουκλεϊκού οξέος. Πράγματι, η καμπύλη ενίσχυσης του διαδικαστικού ελέγχου RNAse P θα πρέπει να παρατηρείται στο κανάλι Cy5 των φρεατίων που περιέχουν το μπλε χρώματος Master μείγμα.
Ωστόσο, μπορούν να παρατηρηθούν δύο καταστάσεις έλλειψης ενίσχυσης του εσωτερικού ελέγχου:

- Εάν τα γονίδια-στόχοι είναι αρχικά παρόντα στο δείγμα με μεγάλο αριθμό αντιγράφων, ο εσωτερικός έλεγχος ενδέχεται να μην ενισχυθεί. Αυτό το αποτέλεσμα είναι συνεπές και δεν ακυρώνει τη δοκιμή. Θα πρέπει να ερμηνευθεί ως θετικό αποτέλεσμα παρά την έλλειψη σήματος από τον εσωτερικό έλεγχο. Αυτό το φαινόμενο είναι αποτέλεσμα του ανταγωνισμού ενίσχυσης μεταξύ του εσωτερικού ελέγχου και των στόχων που υπάρχουν σε υψηλούς αριθμούς αντιγράφων.
- Εάν τα γονίδια-στόχοι στα κανάλια FAM και HEX δεν έχουν ενισχυθεί, καθώς και ο εσωτερικός έλεγχος στο κανάλι Cy5 στο μείγμα Blue Master, τότε δεν μπορεί να αποδοθεί κανένα αποτέλεσμα. Αυτή η κατάσταση υπογραμμίζει την παρουσία αναστολέων PCR. Η PCR πρέπει να επαναλαμβάνεται ξεκινώντας από το πρωτογενές δείγμα και κατά προτίμηση σε εκχύλισμα DNA.

B. Ποιοτική ερμηνεία (θετική ή αρνητική)

Τα σήματα πάνω από το κατώφλι, και οπτικά συμβατά με μια κλασσική καμπύλη ενίσχυσης PCR, θεωρούνται θετικά αποτελέσματα.
Ορισμένα δείγματα ενδέχεται να εμφανίζουν άτυπες καμπύλες που δεν είναι χαρακτηριστικές των καμπυλών ενίσχυσης. Στην περίπτωση αυτή, το αποτέλεσμα δεν πρέπει να θεωρείται ερμηνεύσιμο και η ανάλυση του δείγματος να επαναλαμβάνεται με τους μάρτυρες.

Κανάλια ανίχνευσης						Ερμηνεία
Μείγμα Blue Master 1			Μείγμα Clear Master 2			
FAM (IS481)	HEX (ptxA-Pr)	Cy5 (RNAseP)	FAM (IS1001)	HEX (FLA1)	Cy5 (FLA2)	
-	-	+	-	-	-	Αρνητικός έλεγχος:
+	+	+	+	+	+	Θετικός έλεγχος:
+	+	+	-	-	-	Ασθενής με ειδικό DNA του B. pertussis
+	+	-	-	-	-	
+	-	+	-	-	-	Ασθενής με ειδικό DNA του B. holmesii
+	-	-	-	-	-	
+ Εάν Cq >30	-	+/-	-	-	-	Ασθενής με Bordetella spp DNA
-	-	+	+	+	+	Ασθενής με ειδικό DNA του B. parapertussis
-	-	-	+	+	+	
-	-	+/-	+ Εάν Cq >30	-	-	Ασθενής με B. parapertussis ή B. bronchiseptica ειδικό DNA
+/-*	-	+	+/-*	-	+	Ασθενής με ειδικό DNA για B. bronchiseptica
+/-*	-	-	+/-*	-	+	
-	-	-	-	-	-	Μη έγκυρο αποτέλεσμα, επανέλεγχος

*Το αποτέλεσμα εξαρτάται από το στέλεχος. Πράγματι, ανάλογα με το στέλεχος, ορισμένα είδη μπορεί να φέρουν ή όχι το γονίδιο. Έτσι, το στέλεχος B. bronchiseptica FR3523 είναι θετικό για IS1001 ενώ το στέλεχος αναφοράς RB50 είναι αρνητικό για αυτό το γονίδιο.

Το μείγμα Master 1 (μπλε) επιτρέπει την ανίχνευση του B. pertussis ή του B. holmesii και το μείγμα Master 2 (άχρωμο) την ανίχνευση του B. parapertussis. Ο συνδυασμός της έκφρασης των διαφορετικών γονιδίων που ανιχνεύονται στα δύο φρεάτια επιτρέπει την ταυτοποίηση του άλλου είδους B. bronchiseptica.

11 I ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ

- **Αναλυτική ευαισθησία**

Το όριο ανίχνευσης (LoD) του κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella ορίζεται ως η συγκέντρωση που μπορεί να ανιχνευθεί στο 95% τουλάχιστον σε ένα συγκεκριμένο δείγμα DNA Bordetella.

Όρια ανίχνευσης σε δείγματα DNA που έχουν εξαχθεί ανά είδος:
Το LoD_{95} στο εξαγόμενο DNA εκφράζεται σε αριθμό αντιγράφων DNA/μl. Τα ποσοτικοποιημένα εκχυλίσματα DNA αγοράστηκαν από την Vircell (Amplirun®). Τα LoDs αξιολογήθηκαν για το Bordetella holmesii στο κύριο μείγμα 1 καθώς είναι θετικό για το γονίδιο IS481, το Bordetella pertussis στο κύριο μείγμα 1 καθώς είναι θετικό και για τους δύο στόχους IS481 και ptxA-Pr και για το Bordetella parapertussis στο κύριο μείγμα 2 ως αυτό είναι θετικό για το IS1001 και τα δύο γονίδια FLA. Το ποσοτικοποιημένο DNA του B bronchiseptica δεν είναι διαθέσιμο στην αγορά, επομένως το LoD_{95} δεν μπορούσε να αξιολογηθεί για αυτό το είδος.
Το LoD_{95} του BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella στο εξαγόμενο DNA έχει προσδιοριστεί στατιστικά για κάθε στέλεχος και αλληλουχία γονιδίου. Τα αποτελέσματα δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Στέλεχος Bordetella	LoD_{95} (αντίγραφα/μL)
Bordetella pertussis *(Αιμόφιλος του κοκκύτη)*	IS481: 0,043 ptxA-Pr: 4,017
Bordetella parapertussis	IS1001: 0,265 FLA 1: 18,418 FLA 2: 16,033
Bordetella holmesii	IS481: 0,253

Όρια ανίχνευσης για δείγματα που συλλέχθηκαν με μέσο μεταφοράς AMPLIQUICK Sample Collection και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis:
Τα LoDs προσδιορίστηκαν με την εκτέλεση μιας σειράς αραιώσεων ενός δείγματος αναφοράς με γνωστή συγκέντρωση CFU/mL σε πιστοποιημένα αρνητικά ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα Bordetella που εκφορτώθηκαν στο μέσο μεταφοράς BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection ή αρνητικά δείγματα ρινικής αναρρόφησης και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το κιτ BIOSYNEX® AMPLIQUI Lysis.

Το LoD_{95} του BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella σε DNA που έχει υποστεί επεξεργασία με BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis έχει προσδιοριστεί στατιστικά για κάθε στέλεχος και γονιδιακή αλληλουχία. Τα αποτελέσματα δίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Στέλεχος Bordetella	LoD_{95} για ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA κοινοποίηση	FLA 4
Bordetella pertussis (Αιμόφιλος του κοκκύτη)	22.837 CFU/mL	451.291 CFU/mL	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	38.264 CFU/mL	528.032 CFU/mL	429.806 CFU/mL
Bordetella holmesii	113.354 CFU/mL	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1791.123 CFU/mL

Στέλεχος Bordetella	LoD$_{95}$ για ρινικές αναρροφήσεις				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA κοινοποίηση	FLA 4
Bordetella pertussis (Αιμόφιλος του κοκκύτη)	36.679 CFU/mL	2758.238 CFU/mL	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	52.0 CFU/mL	1535.5 CFU/mL	445.297 CFU/mL
Bordetella holmesii	87.674 CFU/mL	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1101.8 CFU/mL

- **Αναλυτική ιδιαιτερότητα**

Ο σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές και ανιχνευτές) επικυρώθηκε σε πυρίτιο με ευθυγράμμιση BLAST. Η σύγκριση των αλληλουχιών που ελήφθησαν δείχνει μια συγκεκριμένη ανίχνευση των στόχων BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella.
Κανένας εκκινητής ή ανιχνευτής δεν ανιχνεύει βακτηριακό DNA εκτός από αυτό των 4 ειδών Bordetella προς τους οποίους στοχεύουν.

Δοκιμάστηκαν 18 εκχυλίσματα DNA από αναγνωρισμένα και αναφερόμενα στελέχη.
11 εκχυλίσματα DNA από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς της Γαλλίας θετικά για κοκκύτη και άλλη βορδετέλωση, 3 αλληλουχίες DNA ελέγχου από βιοτράπεζα (Amplirun®, Vircell) και 4 καλλιέργειες τυπικού βακτηριακού στελέχους (Zeptometrix®).

	Έλεγχος DNA	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA1	FLA2
Βιοτράπεζα	*Bordetella pertussis DNA*	+	+	-	-	-
	Bordetella parapertussis DNA	-	-	+	+	+
	Bordetella holmesii DNA	+	-	-	-	-

	Είδη	Στέλεχος	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA1	FLA2
Κοινή καλλιέργεια	*Bordetella pertussis (Αιμόφιλος του κοκκύτη)*	A639	+	+	-	-	-
	Bordetella parapertussis	A747	-	-	+	+	+
	Bordetella holmesii	F061	+	-	-	-	-
	Bordetella bronchiseptica	Z341	-	-	-	+	-
NRC	*Bordetella bronchiseptica*	RB50	+	-	-	-	+
		LAR	+	-	-	+	+
		FR3523	-	-	+	-	+
	Bordetella Petrii	KMBW	-	-	-	-	-

		FR5141	-	-	-	-	-
	Bordetella avium	CIP103348T	-	-	-	-	-
		FR6062	-	-	-	-	-
	Bordetella hinzii	CIP104527T	-	-	-	-	-
		FR5948	-	-	-	-	-
	Bordetella trematum	CIP105351T	-	-	-	-	-
		FR5853	-	-	-	-	-

Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Μια ομάδα 76 δειγμάτων DNA και 38 δειγμάτων RNA από μια βιοτράπεζα που παρατίθεται στους παρακάτω πίνακες δοκιμάστηκε με το κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella. Για όλα αυτά τα δείγματα, δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση των στόχων ενδιαφέροντος.

DNA		
Acanthamoeba castellanii	*Escherichia coli (ETEC)*	*Neisseria meningitidis Sg A*
Αδενοϊός	*Escherichia coli (VTEC)*	*Neisseria meningitidis Sg B*
Αδενοϊός 41	*Francisella tularensis*	*Neisseria meningitidis Sg C*
Aspergillus fumigatus	*Gardnerella vaginalis*	*Ιός θηλώματος τύπου 16*
Bacillus cereus	*Giardia intestinalis*	*Ιός θηλώματος τύπου 18*
Bartonella henselae	*Haemophilus ducreyi*	*Παρβοϊός B19 (πλασμίδιο)*
Bartonella Quintana	*Haemophilus influenzae*	*Rickettsia conorii*
Ιός Bk	*Ελικοβακτήριο του πυλωρού*	*Salmonella enteritidis*
Borrelia afzelii	*Απλός έρπης 1*	*Salmonella typhi*
Borrelia burgdorferi	*Απλός έρπης 2*	*Staphylococcus aureus (MecA-)*
Brucella abortus	*Hhv-6*	*Staphylococcus aureus (MecA+)*
Campylobacter jejuni	*Hhv-8*	*Streptococcus agalactiae*
Candida albicans	*Klebsiella pneumoniae (NDM-1)*	*Τοξόπλασμα gondii*
Candida auris	*Legionella pneumophila*	*Treponema pallidum*
Chlamydia trachomatis	*Leishmania chagasi*	*Trichomonas vaginalis*
Chlamydophila pneumoniae	*Leishmania infantum*	*Trypanosoma cruzi*
Chlamydophila psittaci	*Listeria monocytogenes*	*Ureaplasma parvum*
Clostridium difficile	*Moraxella catarrhalis*	*Ureaplasma urealyticum*
Coccidioides immitis	*Mycobacterium avium*	*Ιός ανεμευλογιάς-ζωστήρας*
Coxiella burnetii	*Mycobacterium intracellulare*	*Vibrio cholerae*
Cryptosporidium parvum	*Mycobacterium kansasii*	*Yersinia enterocolitica*
Enterococcus faecalis (VanB)	*Mycobacterium tuberculosis*	*Borrelia garinii*
Enterococcus faecium (VanA)	*Mycobacterium ulcerans*	*Κυτομεγαλοϊός*
Ιός Epstein-Barr	*Mycoplasma genitalium*	*Streptococcus pneumoniae*
Escherichia coli (EAEC)	*Mycoplasma hominis*	
Escherichia coli (EIEC)	*Neisseria gonorrhoeae*	

RNA		
Κορωνοϊός Oc43	*Ανθρώπινη παραγρίπη 1*	*Παραγρίπη 4 A*
Ιός Chikungunya	*Γρίπη A H1*	*Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (Υποτύπος A)*
Κορωνοϊός	*Γρίπη A H3*	*Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (Υποτύπος B)*
Κορωνοϊός SARS (2003)	*Γρίπη A H5*	*Ρινοϊός*
Coxsackie A6	*Γρίπη B*	*Ροταϊός*

Coxsackie B1	*Ιλαρά*	*Ερυθρά*
Coxsackie B5	*Κορωνοϊός MERS*	*SARS-CoV-2*
Ιός δάγκειου πυρετού 1	*Παρωτίτιδα*	*Ιός εγκεφαλίτιδας που μεταδίδεται από κρότωνες*
Ιός δάγκειου πυρετού 2	*Νοροϊός*	*Ιός του Δυτικού Νείλου*
Ιός δάγκειου πυρετού 3	*Νέα Γρίπη A H1n1*	*Ιός Κίτρινου Πυρετού*
Ιός δάγκειου πυρετού 4	*Παραγρίπη 1*	*Ιός Ζίκα*
Ηχοϊός 5	*Παραγρίπη 2*	*Ιός Ζίκα (Asian Lineage)*
Εντεροϊός 68	*Παραγρίπη 3*	

- **Μελέτη παρεμβολών**

Η παρουσία αναστολέων PCR στο δείγμα μπορεί να προκαλέσει θετική ή αρνητική παρέμβαση στα αποτελέσματα της δοκιμής. Ελέγχθηκε η παρουσία διαφόρων αναστολέων στα δείγματα.

Ρινικά σπρέι

Δεν βρέθηκε θετική ή αρνητική παρέμβαση με φόρτωση έως και 10% στο μέσο μεταφοράς BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection από μια μήτρα ρινοφαρυγγικών εκκρίσεων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis, με τις ακόλουθες ουσίες:

Προϊόν	Δραστική Ουσία
Nasacort	Ακετονίδιο τριαμκινολόνης
Aturgyl	Οξυμεταζολίνη
Μπεκονάση	Διπροπιονική μπεκλομεθαζόνη
Βουδεσονίδη	Βουδεσονίδη
Μομεταζόνη	Μομεταζόνη
Avamys	Φουροϊκή φλουτικαζόνη
Fixorinox	Προπιονική φλουτικαζόνη

Αίμα

Η παρουσία αίματος σε ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα μπορεί να προκαλέσει θετική ή αρνητική παρέμβαση στο αποτέλεσμα της εξέτασης PCR. Η μελέτη μας δείχνει ότι οι συγκεντρώσεις στο αίμα έως και 1% δεν επηρεάζουν την αντίδραση PCR όταν το κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella χρησιμοποιείται με τα κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Collection και BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis. Για συγκεντρώσεις στο αίμα από 2% και πάνω, υπάρχει μείωση της ευαισθησίας. Επομένως, η συγκέντρωση αίματος στο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1%.

- **Κλινικές επιδόσεις**

Οι κλινικές επιδόσεις προσδιορίστηκαν σε 146 δείγματα από 4 διαφορετικά εργαστήρια που ήταν θετικά ή αρνητικά για B. pertussis ή B. parapertussis χρησιμοποιώντας δοκιμές PCR με σήμανση CE που αναφέρονται από το Γαλλικό Υπουργείο Υγείας.

Αυτές οι δοκιμές επιτρέπουν την ταυτοποίηση αυτών των δύο στελεχών μέσω της ενίσχυσης των γονιδίων IS481 και IS1001, τα οποία υπάρχουν επίσης στα στελέχη B. holmesii και B. bronchiseptica.

Τα δείγματα πιστοποιήθηκαν με το κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella σε καθαρισμένα εκχυλίσματα DNA ή μετά από επεξεργασία με το κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis.

	Αριθμός δειγμάτων	*B. pertussis*		*B. parapertussis*		*Συν-λοιμώξεις*	*Αρνητικό για Bordetella*
		+	-	+	-		
Εργαστήριο 1	63	58	1	8	51	8*	5
Εργαστήριο 2	12	12	0	2	10	2	0
Εργαστήριο 3	31	0	0	0	0	0	31
Εργαστήριο 4	40	0	0	0	0	0	40

*Μεταξύ των 8 δειγμάτων που χαρακτηρίστηκαν θετικά για B. pertussis και B. parapertussis από το εργαστήριο 1, δεν επιβεβαιώθηκε καμία συνλοίμωξη χρησιμοποιώντας το κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella καθώς και ένα άλλο κιτ με σήμανση CE στην αγορά.

Ο παρακάτω πίνακας έκτακτης ανάγκης δείχνει την απόδοση του κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella (κοκκύτης) σε δείγματα μετά από εξαγωγή/καθαρισμό DNA με κιτ του εμπορίου:

		Αναφορά PCR	
		Θετικό	Αρνητικό
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella (κοκκύτης)	Θετικό	69	0
	Αρνητικό	1	76

Ευαισθησία: 98.57% (95%CI: 92.30% έως 99.96%) **Ειδικότητα: 100%** (95%CI: 95.26% έως 100%)

Ο παρακάτω πίνακας έκτακτης ανάγκης δείχνει την απόδοση του BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella σε δείγματα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis:

		Αναφορά PCR	
		Θετικό	Αρνητικό
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella (κοκκύτης)	Θετικό	66	0
	Αρνητικό	4	76

Ευαισθησία: 94.29% (95%CI: 86.01% έως 98.42%) **Ειδικότητα: 100%** (95%CI: 95.26% έως 100%)

Για αυτήν τη μελέτη, δεν είχαμε πρόσβαση σε κλινικά δείγματα από ασθενείς θετικούς για B. bronchiseptica και B. holmessi (σπάνια δείγματα). Οι επιδόσεις του κιτ για αυτά τα δύο είδη επικυρώθηκαν με τη χρήση στελεχών που παρέχονται από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς της Γαλλίας για τον κοκκύτη και άλλες βορδελλώσεις.

- **Ακρίβεια δεδομένων**

Τα δεδομένα ακριβείας στο πλαίσιο του κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella προσδιορίστηκαν με βάση 4 συνθήκες:

- Μεταβλητότητα εντός της ανάλυσης (εντός ημέρας, εντός του ίδιου πειράματος)
- Μεταβλητότητα μεταξύ ημερών
- Μεταβλητότητα μεταξύ χειριστών
- Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων

Τα δεδομένα μεταβλητότητας εκφράζονται ως προς τη μέση τιμή, την τυπική απόκλιση και τον συντελεστή διακύμανσης, με βάση τις τιμές κατωφλίου ποσοτικού προσδιορισμού (Cq) του Bordetella DNA.

Δεδομένα μεταβλητότητας εντός της ανάλυσης:

Δύο αραιώσεις δειγμάτων δοκιμάστηκαν για κάθε είδος Bordetella που ανιχνεύθηκε από το κιτ: 1 υψηλό (+++) που αντιστοιχεί σε 1000 αντίγραφα/μL και 1 χαμηλό (+) που αντιστοιχεί σε 10 αντίγραφα/μL. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές χαμηλές αραιώσεις για το B. pertussis και το B. parapertussis, καθώς οι δύο θετικοί στόχοι τους έχουν διαφορετικές ευαισθησίες και τα γονίδια IS481 και IS1001 είναι πολλαπλά αντίγραφα και τα γονίδια ptxA-Pr και FLA είναι μονοτυπικά.

Κάθε δείγμα δοκιμάστηκε 30 φορές.

Εξήχθη DNA

	Αραίωμα δείγματος	Στόχος	Μείγμα 1 Μέσος όρος Cq	SD	CV %
B pertussis	+++	IS481	13,3	0,1	0,9
	+ (ptxA-Pr)		27,4	1,1	4,0
	- (IS481)		34,7	0,3	1,0
	+++	ptxA-Pr	19,6	0,2	0,8
	+ (ptxA-Pr)		34,3	0,7	2,2
B holmesii	+++	IS481	21,2	0,1	0,7
	+		36,2	0,5	1,3

	Αραίωμα δείγματος	Στόχος	Μείγμα 2 Μέσος όρος Cq	SD	CV %
B. parapertussis	+++	IS1001	15,8	0,3	1,7
	+ (FLA1&2)		29,1	0,1	0,5
	+ (IS1001)		35,1	0,7	1,9
	+++	FLA1	21,5	0,2	0,8
	+ (FLA1&2)		35,2	0,4	1,2
	+++	FLA2	21,9	0,2	0,8
	(FLA1&2)		34,7	0,3	0,9
B bronchisepti	+++	FLA 2	21,8	0,1	0,6
	+		36,6	0,6	1,7

Προεπεξεργασία με κιτ BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis

	Αραίωμα δείγματος	Στόχος	Μείγμα 1 Μέσος όρος Cq	SD	CV %
B pertussis	+++	IS481	14,7	0,2	1,0
	+ (ptxA-Pr)		28,8	1,0	3,4
	+ (IS481)		34,4	1,2	3,4
	+++	ptxA-Pr	22,4	0,1	0,6
	+ (ptxA-Pr)		35,5	1,1	3,0
B holmesii	+++	IS481	21,5	0,0	0,2
	+		35,4	1,4	4,0

	Αραίωμα δείγματος	Στόχος	Μείγμα 2 Μέσος όρος Cq	SD	CV %
B. parapertussis	+++	IS1001	13,7	0,2	1,2
	+ (FLA1&2)		31,3	0,2	0,8
	+ (IS1001)		34,5	0,8	2,4
	+++	FLA1	19,2	0,2	1,1
	+ (FLA1&2)		37,1	0,6	1,7
	+++	FLA2	18,9	0,2	1,1
	(FLA1&2)		34,9	0,5	1,4
B bronchiseptica	+++	FLA 2	18,6	0,2	0,8
	+		34,8	0,3	0,8

<u>Δεδομένα μεταβλητότητας μεταξύ των αναλύσεων</u>
Δύο αραιώσεις δειγμάτων δοκιμάστηκαν για κάθε είδος Bordetella που ανιχνεύθηκε από το κιτ: 1 υψηλό (+++) που αντιστοιχεί σε 1000 αντίγραφα/μL και 1 χαμηλό (+) που αντιστοιχεί σε 10 αντίγραφα/μL.
Κάθε δείγμα ελέγχεται εις διπλούν δύο φορές την ημέρα, κατά τη διάρκεια 5 ημερών.
Το αρνητικό δείγμα δίνει αρνητικά αποτελέσματα.

	+++			+		
Γονίδιο	Δείγμα μέσης τιμής Cq +++	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης %	Μέση τιμή Cq δείγμα +	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης %
IS481	27,7	0,1	0,4	33,9	0,2	0,6
ptxA-Pr	27,3	0,1	0,3	33,4	0,2	0,5
IS1001	27,6	0,1	0,4	33,6	0,3	0,8
FLA1	29,5	0,2	0,6	35,7	0,1	0,4
FLA2	28,6	0,2	0,8	34,7	0,3	0,7

Δεδομένα μεταβλητότητας μεταξύ των χειριστών
Δύο αραιώσεις δειγμάτων δοκιμάστηκαν για κάθε είδος Bordetella που ανιχνεύθηκε από το κιτ: 1 υψηλό (+++) που αντιστοιχεί σε 1000 αντίγραφα/μL και 1 χαμηλό (+) που αντιστοιχεί σε 10 αντίγραφα/μL.
Δύο φορές την ημέρα από δύο διαφορετικούς χειριστές, κατά τη διάρκεια 5 ημερών.
Το αρνητικό δείγμα δίνει αρνητικά αποτελέσματα.

	+++			+		
Γονίδιο	Δείγμα μέσης τιμής Cq +++	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης %	Μέση τιμή Cq δείγμα +	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης %
IS481	27,6	0,1	0,4	33,9	0,0	0,1
ptxA-Pr	27,2	0,1	0,4	33,4	0,0	0,1
IS1001	27,5	0,1	0,2	33,6	0,0	0,1
FLA1	29,4	0,1	0,4	35,6	0,0	0,1
FLA2	28,6	0,0	0,0	34,8	0,0	0,1

Δεδομένα μεταβλητότητας μεταξύ των παρτίδων:
Δύο αραιώσεις δειγμάτων δοκιμάστηκαν για κάθε είδος Bordetella που ανιχνεύθηκε από το κιτ: 1 υψηλό (+++) που αντιστοιχεί σε 1000 αντίγραφα/μL και 1 χαμηλό (+) που αντιστοιχεί σε 10 αντίγραφα/μL.
Κάθε δείγμα δοκιμάστηκε εις τριπλούν ή εις διπλούν σε δύο διαφορετικές παρτίδες.
Το αρνητικό δείγμα δίνει αρνητικά αποτελέσματα.

	+++			+		
Γονίδιο	Δείγμα μέσης τιμής Cq +++	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης %	Μέση τιμή Cq δείγμα +	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης %
IS481	26,9	0,2	0,6	33,4	0,4	1,1
ptxA-Pr	27,4	0,1	0,5	33,7	0,7	2,0
IS1001	26,9	0,0	0,0	33,0	0,3	0,9
FLA1	29,1	0,1	0,5	35,1	0,0	0,0
FLA2	28,5	0,0	0,1	34,6	0,1	0,3

12 I ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Μη τήρηση οποιασδήποτε οδηγίας της IFU μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την απόδοση της δοκιμής και/ή να ακυρώσει το αποτέλεσμα της δοκιμής.
2. Όπως για κάθε διαγνωστική εξέταση, τα αποτελέσματα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη με άλλες κλινικές πληροφορίες που έχει στη διάθεσή του ο ιατρός. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν μπορεί ποτέ να αποκλείσει την παρουσία Bordetella στο δείγμα (π.χ. γονίδια μπορεί να υπάρχουν σε συγκέντρωση κάτω από το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της δοκιμής, παρεμβολή) και ένα θετικό αποτέλεσμα δεν μπορεί ποτέ να εξασφαλίσει την παρουσία Bordetella στο δείγμα (π. μόλυνση). Η οριστική διάγνωση μπορεί να γίνει μόνο από τον ιατρό μετά από αξιολόγηση όλων των κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων.
3. Δείγματα με περισσότερο από 1% αίμα ενδέχεται να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της εξέτασης. Σε περίπτωση αίματος στο δείγμα, εξετάστε το αποτέλεσμα με προσοχή.

13 I ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Pittet LF, Emonet S, Schrenzel J, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Bordetella holmesii : an under-recognized Bordetella species. The Lancet Infectious Diseases. 2014; 14(6):510-9.
- Pittet LF, Emonet S, François P, Bonetti EJ, Schrenzel J, Hug M, Altwegg M, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Diagnosis of whooping cough in Switzerland: Differentiating Bordetella pertussis from Bordetella holmesii by polymerase chain reaction. PLoS One. 2014; 9(2): e88936
-Sanz JC, Abad R, Sanz C, Miguel A. Diagnóstico diferencial de Bordetella bronchiseptica por RT-PCR en un ni ̃ no con tos paroxística sin antecedentes patológicos previos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.09.016

14 I ΣΥΜΒΟΛΑ

	Ανατρέξτε στις οδηγίες για Να τις χρησιμοποιήστε ή να τις συμβουλευτείτε Ηλεκτρονικές οδηγίες Για χρήση		Το περιεχόμενο επαρκεί για <n> εξετάσεις	REF	Αριθμός καταλόγου
IVD	*In vitro* διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν		Περιορισμοί θερμοκρασίας		Μην επαναχρησιμοποιείτε
	Κατασκευαστής	LOT	Κωδικός παρτίδας		Ημερομηνία λήξης
	Κρατήστε το μακριά από το ηλιακό φως	Mmix	Μείγμα Master		Μικροτρυβλίο
CONTROL -	Αρνητικός έλεγχος:	CONTROL +		UDI	Μοναδικός αναγνωριστικός κωδικός συσκευής
	Σάκος που περιέχει ταινίες πωμάτων		Μην το χρησιμοποιείτε εάν η συσκευασία είναι κατεστραμμένη και συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	CH REP	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ελβετία
	Εισαγωγέας	+/-	Ποιοτική ανίχνευση με PCR		

15 I ΠΛΗΡΟΦΟΡΊΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΉ

BIOSYNEX S.A.
22 boulevard Sébastien Brant
67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN – France
Πρότυπο:
Tel. : +33 3 88 78 78 87
www.biosynex.com
Επαφές Γαλλία :
Tel.: +33 3 88 77 57 00
service.clients@biosynex.com
Επαφές σε άλλες χώρες :
Tel. : +33 3 88 77 57 52
sales@biosynex.com
Εξυπηρέτηση μετά την πώληση :
Tel. : +33 3 88 77 57 25
Tech.support@biosynex.com

CH REP
BIOSYNEX SWISS S.A.
Route de Rossemaison 100
2800 DELEMONT - Switzerland

Τελευταίες αλλαγές : Επικαιροποίηση του πίνακα συμβόλων και των στοιχείων επικοινωνίας του κατασκευαστή. §7: διόρθωση σχετικά με τη δειγματοληψία αναρρόφησης.

NO

CE 0123

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella

PCRFOR KVALITATIV DETEKSJON OG DIFFERENSIERING AV BORDETELLA PERTUSSIS, BORDETELLA PARAPERTUSSIS, BORDETELLA BRONCHISEPTICA OG BORDETELLA HOLMESII I VATTPINNE ELLER NESEASPIRATOR.

Kun for profesjonell in vitro-diagnostisk bruk

REF 3150068_SEC01 / 3150068_SEC02

1 I TILTENKT FORMÅL

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella er en molekylær *in vitro* diagnostisk test for kvalitativ deteksjon ved qPCR og differensiering av fire bakteriearter av slekten Bordetella som finnes i human medisin: *B. pertussis, B. parapertussis, B. bronchiseptica* og *B. holmesii.* Testen er et hjelpemiddel for diagnostisering avkikhoste utført med et DNA-ekstrakt hentet fra vattpinner eller neseaspirater. Denne ikke-automatiserte testen er kun beregnet for *in vitro*-diagnostisk bruk i laboratorier av helsepersonell.

2 I KLINISK OPPSUMMERING

Slekten Bordetella består av ni forskjellige arter. De viktigste artene som er ansvarlige for luftveissykdommer hos mennesker er:

- *B. pertussis* som er agenten som er ansvarlig for kikhoste og hvis reservoar er utelukkende menneskelig,
- *B. parapertussis,* en art som ligner på *B. pertussis,* men som ikke utskiller *pertussistoksin*, og som kan være ansvarlig for et kikhostesyndrom som vanligvis er mindre alvorlig,
- *B. bronchiseptica*, som rammer et stort antall pattedyr og er ansvarlig for luftveisinfeksjoner hos mennesker, hovedsakelig hos immunkompromitterte,
- og *B. holmesii* som også kan være ansvarlig for luftveissymptomer som kikhoste og til og med septikemi.

Hos uvaksinerte pasienter eller de med ukjent kikhostevaksinasjonsstatus, som har vedvarende hoste, bør Bordetella-testing utføres så snart som mulig for å starte antibiotikabehandling og isolere pasienten for å bryte infeksjonskjeden.

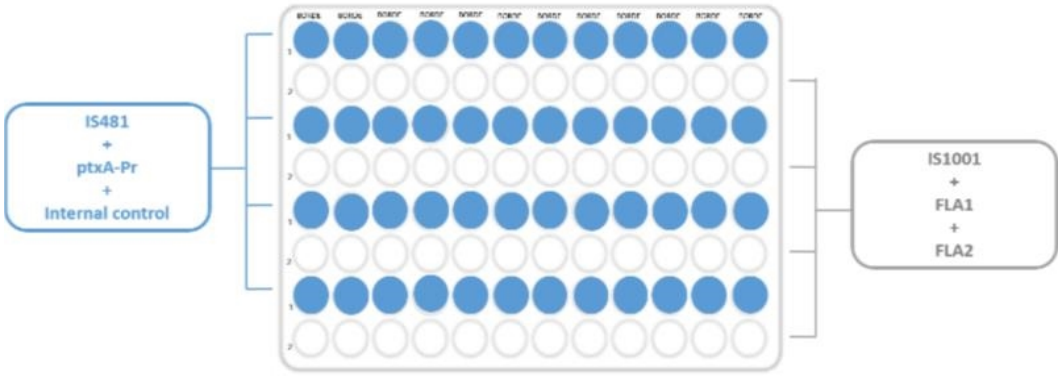
Diagnose av kikhoste ved PCR bør utføres innen de første tre ukene etter symptomdebut.

3 I TESTPRINSIPP

The BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-settet er en *in vitro*-diagnostisk test basert på Polymerasekjedereaksjon (PCR)-teknologived fluorescerende sondehydrolyse. Den består av 96-brønners mikroplater som er ferdigfylt med to Master Mixessom er klare til bruk og inneholder dNTP-er, MgCl2-primere og fluorescerende sonder, Taq-polymerase-enzym og reaksjonsbuffer.

Analysen består av et multipleks-PCR-trinnutført i en termocycler i sanntid som tillater spesifikk amplifisering og samtidig deteksjon av molekylære mål som bærer sekvensene av interesse: Tox-operonet (sekvens IS481), promoterregionen for pertussistoksin (ptxA-Pr), innsettingssekvensen h-IS1001 som er spesifikk for *B. holmesii*, og flagellingenet som er spesifikt for *B. parapertussis*, og som gjør det mulig å skille det fra *B. bronchiseptica* i to trinn (FLA1- og FLA2-sekvenser), samt den interne prosedyrekontrollen – (humant RNAse P-gen) som gjør det mulig å evaluere kvaliteten på den biologiske prøvesamlingen, og å validere DNA-ekstraksjons- og rensetrinn.

Til dette formålet brukes to Master Mixes som inneholder sonder merket med FAM-, HEX- og Cy5-fluoroforer.



I den blåfargede Master Mix som finnes i brønnene merket «1» på den ferdigfylte platen, brukes fluorofor FAM for sekvensspesifikk amplifisering av IS481, HEX for sekvensen ptxA-Pr og Cy5 for RNAse P-genet. I den blåfargede Master Mix som finnes i brønnene merket «2» på den ferdigfylte platen, brukes fluorofor FAM for sekvensspesifikk amplifisering av IS1001, HEX for sekvensen FLA1 og Cy5 for FLA2.
Bestemmelse av Bordetella-arter avhenger av kombinasjonen av påvisning av disse genene som beskrevet i §10.

Økningen i fluorescenssignalet oppdages bare hvis målsekvensen som er komplementær til den forsterkede sonden, er til stede i prøven. Det fluorescerende signalet er derfor direkte proporsjonalt med forsterkningen av målet under forsterkningsfasen. Cq-verdien (sykluskvantifisering) tilsvarer antall sykluser der fluorescensen begynner å øke eksponensielt i kontrast til bakgrunnen. Settet kan brukes på to typer prøver:
- vattpinner
- neseaspirater

Før de brukes med BIOSYNEX AMPLIQUICK ® Bordetella forsterkningssett (§9),
må prøvene først samles inn og behandles i henhold til prosedyrene beskrevet i §7 og §8 med bruk av BIOSYNEX AMPLIQUICK ® prøvetakingssett (ref 3150060 og relaterte referanser) og BIOSYNEX AMPLIQUICK ® Lysis-sett (ref 3150059 og relaterte referanser), eller behandles for å oppnå rensede DNA-ekstrakter ved bruk av et egnet sett.

4 I INNHOLD I KITET

Materiale som medfølger

- 2 brytbare 96-brønners mikroplater forhåndsfylt med Master Mix
- 1 rør med positiv kontroll (CONTROL +, rød hette)
- 1 rør med positiv kontroll (CONTROL-, rød hette)
- 2 poser med optiske hettestrimler, for mikroplateforsegling
- 1 bruksanvisning

Nødvendig utstyr som ikke er inkludert

- DNA-ekstraksjonssett - Pudderfrie engangshansker
- Pipetter og filterspisser - Termalcycler PCR i sanntid
- PCR-mikroplater eller mikrorørsentrifuge

PCR-maskiner som brukes til testen, må ha følgende hovedegenskaper:
- Åpent system
- Kvantitative PCR-analyser i sanntid.
- Programmerbar thermal cycler-blokk

Referanser	Thermal cycler-blokk
3150068_SEC01	0,1 ml lav profil
3150068_SEC02:	0,2 ml høy profil

- Eksitasjonskilde: Lysdioder, lampe eller laser
- Filtersett (eksitasjons-/emisjonsbølgelengder) som er egnet for deteksjon av «rapport» -fluoroforer i FAM-, HEX- og Cy5-sondene.
- Tilkobling med en datamaskin ved hjelp av spesifikk analyseprogramvare som tillater gjenoppretting av fluorescensdata, absolutte kvantifiseringsanalyser og tolkning av resultater.

Settet er utviklet og validert med følgende sanntids PCR thermal-cyclere i sanntid:

Referanser	Thermal cycler
3150068_SEC01	CFX96™ Touch PCR-deteksjonssystem i sanntid (Bio-Rad) CFX96™ Opus PCR-deteksjonssystem i sanntid (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) QuantStudio 5 System (brukte biosystemer) LightCycler 480 (Roche) Amplix-DT lite 48 (DNA-teknologi)

3150068_SEC02	CFX96™ Touch PCR-deteksjonssystem i sanntid (Bio-Rad) CFX96™ Opus PCR-deteksjonssystem i sanntid (Bio-Rad) QuantGene 9600 (Bioer) QuantStudio 5 System (brukte biosystemer) Amplix-DT lite 48 (DNA-teknologi)

Hvis en annen thermal cycler brukes, må du gjøre en egen validering av BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-settet ved hjelp av de medfølgende kontrollene og/eller kvalifiserte pusteprøver før du bruker testen.

5 I FORHOLDSREGLER

- Følg bruksanvisningen nøye. Unnlatelse av å følge instruksjonene i denne bruksanvisningen kan påvirke testytelsen negativt og ha skadelige konsekvenser.
- Følg god laboratoriepraksis og bruk pudderfrie engangshansker i laboratoriet under hele testprosedyren.
- Den daglige håndteringen av et stort antall prøver og den høye følsomheten til PCR-teknikken kan, i fravær av forholdsregler, generere falske positive resultater ved forurensning. Forhånds-PCR, etter-PCR og DNA-ekstraksjon bør derfor utføres i separate rom. Bruk engangshansker i hver sone, og bytt hansker før du går fra én sone til en annen.
- Test og pipetter er kun til engangsbruk. Må ikke gjenbrukes. Ikke åpne PCR-rørene på slutten av testen.
- Ikke bruk testen hvis aluminiumsfolien er åpnet eller skadet. Bruk testen umiddelbart etter at aluminiumsfolien er fjernet.
- Ikke bruk settet hvis det var frossent ved ankomst.
- Ikke bruk settet hvis det lekker eller har skadfer. Settet kan fortsatt brukes selv om det skulle være mindre skader på emballasjen (ingen revner eller lekkasjer).
- Beskytt settet mot lys.
- Sentrifuger rørene før åpning, åpne dem etter hverandre ved å lukkedem godt mellom hver åpning for å unngå forurensning.
- CTRL+ inneholder betydelige mengder DNA-sekvenser. Det kan derfor potensielt forurense de andre komponentene i settet hvis god molekylærbiologisk praksis ikke følges. For å begrense risikoen for forurensning, anbefales det å oppbevare denne komponenten utenfor settet ved den første åpningen av settet.
- De negative og positive kontrollene som er inkludert i settet, etterligner resultater som er oppnådd med henholdsvis negative eller positive prøver. De må brukes med hver ny kjøring.

For å sikre at det ikke oppstår forurensning under håndtering, er det opp til brukeren å inkludere, som en del av den interne kvalitetstilnærming, ved den valgte frekvensen, en eksperimentell negativ kontrollbrønn der 8 µL vann av molekylærbiologisk kvalitet tilsettes Master Mix .

- Når man bruker negative og positive kontroller med en serie pasienter, anbefales det først å deponere den negative kontrollen, deretter deponere pasientprøvene og avslutte deponeringen av den positive kontrollen.
- Kasser tilsmussede deler og tomme kitkomponenter i en avfallsbeholder for biologisk avfall.
- Utstyret inneholder materiale av bakteriell eller animalsk opprinnelse som kan overføre smittestoffer og bør håndteres med ekstrem forsiktighet.
- Eventuelle dødsfall eller alvorlige helsehendelser forbundet med bruk av BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella skal rapporteres til produsenten og kontrollmyndighetene i landet ditt. Hvis du er i tvil, er det best å rapportere.
- Sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på forespørsel. Sammendrag av sikkerhet og ytelse vil være tilgjengelig på nettsiden til Eudamed.

6 I OPPBEVARING OG STABILITET AV REAGENS

Settet sendes frosset. Komponentene i settet må ankomme frosset. Oppbevar settet ved en temperatur på -20 °C. Under disse forholdene er reagensene stabile frem til utløpsdatoen som er angitt på etiketten. Ikke bruk settet og noen av komponentene etter utløpsdatoen. Beskytt settet og reagensene mot direkte lys.
Positive og negative kontroller kan gjennomgå opptil 15 fryse/tinesykluser.
Fjern og tin bare opp nødvendige antall brønnstrimler. Ettersom strimlene er klare til bruk, er det ingen grunn til å utsette dem for gjentatte fryse/tinesykluser.

7 I PRØVETAKING OG OPPBEVARING

BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella muliggjør amplifisering av DNA fra alle fire Bordetella-arter. Testen kan utføres ved hjelp av renset DNA-ekstrakt fra neseprøver (vattpinner) eller neseaspirater; eller de samme prøvene

som er samlet i BIOSYNEX AMPLIQUICK ® prøvesamling (ref 3150060 og relaterte referanser) og behandlet med BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis-sett (ref 3150059 og relaterte referanser).

- Samle neseprøver ved hjelp av sterile vattpinner tømt i sterile rør som inneholder transportmedium, eller de som er tilgjengelige i BIOSYNEX AMPLIQUICK prøveoppsamlingssett (ref 3150060 og relaterte referanser).
- Samle neseaspirater med en mukus-aspirator i samsvar med produsentens anbefalinger, og overfør til sterile rør som inneholder transportmedie, eller de som er tilgjengelig i BIOSYNEX AMPLIQUICK prøvetakingssett (ref. 3150060 og relaterte referanser). Ved bruk av BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kit (ref. 3150059) må aspirerte prøver brukes direkte uten å bli lastet over i et transportmedium.

Prøver som tilsettes i BIOSYNEXAMPLIQUICK transportmedium for prøvetaking, kan enten ekstraheres umiddelbart eller innen fire timer hvis de oppbevares ved romtemperatur, eller oppbevares mellom 2 °C og 8 °C i 24 timer.

Transport av kliniske prøver må overholde lokale forskrifter for transport av infeksiøst materiale.

8 I EKSTRAKSJON AV NUKLEINSYRER

Nukleinsyreekstraksjonen må utføres før amplifikasjonsprotokollen ved bruk av et egnet ekstraksjonssystem for bakterielt DNA. Følg produsentens instruksjoner for ekstraksjon.
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-settet er validert med følgende ekstraksjonssett:

- BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis-sett (ref 3150059 og relaterte referanser) **BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis kan bare brukes med nasofaryngeale prøven som er samlet i BIOSYNEXAMPLIQUICK ® prøvesamling. Aspirasjonsprøver kan brukes uten at de tømmes i et transportmedium.**
- QIAamp DNA minisett (Qiagen – Ref 51306)
- NuceloMag Dx Pathogen (Macherey Nagel – 744215.4)
- Amplix bakterielt DNA-ekstraksjonssett på Amplix automatisert system (DNA-teknologi – ref. OP05006)

Hvis en annen DNA-ekstraksjonsmetode eller -sett brukes, må du utføre en egen metodevalidering av BIOSYNEX AMPLIQUICK ®Bordetella-settet ved hjelp av kvalifiserte luftveisprøver før du bruker testen (ikke bruk de medfølgende kontrollene).

Det er ikke nødvendig å trekke ut de positive og negative kontrollene med ekstraksjonssettet for nukleinsyre. Hvis bruk av renset DNA er forsinket, oppbevar ved 4 °C eller på is på testdagen, før tilsetting av Master Mix .

9 I FORSTERKNINGSPROTOKOLL

For platedesign, se §3.
Det anbefales at Master Mix strimlene plasseres på et kjølestativ eller på is mens prøver legges til.

1. Ta en brytbar plate i strimler med 8 brønner, og ta antall strimler som kreves. Hvis det er behov for mindre enn en hel strimmel med 8 brønner, kan strimmelen kuttes horisontalt med en saks.
2. Sentrifuger strimlene i noen sekunder for å samle opp eventuelle dråper på brønnkantene eller på forseglingen.
3. Ta aluminiumsfolien forsiktig av og kast den. Bruk strimelen umiddelbart etter at aluminiumsfolien er fjernet.
4. Tilsett 8 µL prøve eller kontroll i henhold til platedesignet.
5. Lukk brønnene med de medfølgende gjennomsiktige hettene.
6. Sentrifuger strimlene i noen sekunder.
7. Plasser dem i thermal cycleren og kjør følgende forsterkningsprogram:

PCR-program:

Trinn	Repetisjoner	Temperatur	Varighet	Oppnåelse
Taq-aktivering	1x:	95°C	3 min	-
Denaturering	50x:	95°C	10 sek	-
Hybridisering/forlengelse		58°C	45 sek	ja

Tilsett **20 µL** reaksjonsvolum i Thermal Cycler-programmet.
Se bruksanvisningen til Thermal Cycler som brukes for programmeringsinformasjon.

Innstilling av deteksjonskanaler:

Blå Master Mix	
Mål	Fluorokrom
IS481	FAM
ptxA-Pr	HEX
RNAse P (prosedyrekontroll)	Cy5:
Klar Master Mix	
Mål	Fluorokrom
IS1001	FAM
FLA1	HEX
FLA2	Cy5

10 I DATA-ANALYSE OG TOLKNING AV RESULTATER

A. Prøvevalideringskriterier

Negativ kontroll

Fluorescensen som sendes ut må være under terskelen med unntak av Cy5-kanalen i den blå Master Mix. Dette er en indikator på ikke-spesifikk forsterkning. Hvis fluorescensen er over terskelen, se etter en atypisk kurve. Ved en eventuell forsterkningskurve skal en forurensning eller en distribusjonsfeil i mikrorørene vurderes. Bare den interne RNAse P-kontrollen skal amplifiseres.

Positiv kontroll:

Verdien av den positive kontrollen bør helst detekteres før 30 syklus (Cq ≤ 30). Ved fravær av forsterkning av den positive kontrollen, bør eksistensen av et forsterknings- eller fluorescensdeteksjonsproblem (defekt thermal cycler ellerat instrumentet ikke er tilpasset metoden) vurderes.

Intern forsterkningskontroll:

Den eksogene interne RNAse P-kontrollen sikrer at enzymene i Master Mix er funksjonelle og valideren nukleinsyreoppsamlingen og -ekstraksjonstrinnene. Forsterkningskurven til RNAse P-prosedyrekontrollen bør faktisk observeres i Cy5-kanalen til brønnene som inneholder den blåfargede Master Mix.

To situasjoner med manglende forsterkning av den interne kontrollen kan allikevel observeres:

- Hvis målgenene opprinnelig er til stede i prøven med et høyt antall kopier, kan det hende at den interne kontrollen ikke amplifiseres. Dette resultatet er konsistent og gjør ikke testen ugyldig. Det skal tolkes som et positivt resultat til tross for mangel på signal fra den interne kontrollen. Dette fenomenet er et resultat av forsterkningskonkurranse mellom den interne kontrollen og mål som er til stede ved høye kopiantall.
- Hvis målgenene i FAM- OG HEX-kanalene ikke forsterkes, samt den interne kontrollen i Cy5-kanalen i den blå Master Mix, kan ikke noe resultat gjengis. Denne situasjonen fremhever tilstedeværelsen av PCR-hemmere. PCR skal gjentas fra den primære prøven og helst på DNA-ekstrakt.

B. Kvalitativ tolkning (positiv eller negativ)

Signaler over terskelen, **og visuelt samsvar med en klassisk PCR-forsterkningskurve**, betraktes som positive resultater.

Noen prøver kan vise atypiske kurver som ikke er karakteristiske for forsterkningskurver. I dette tilfellet skal resultatet ikke anses som tolkbart og analysen av prøven gjentas med kontrollene.

Deteksjonskanaler						Tolkning
Blå Master Mix 1			Klar Master Mix 2			
FAM (IS481)	HEX (ptxA-Pr)	Cy5 (RNAseP)	FAM (IS1001)	HEX (FLA1)	Cy5 (FLA2)	
-	-	+	-	-	-	Negativ kontroll
+	+	+	+	+	+	Positiv kontroll
+	+	+	-	-	-	Pasient med *B.*

+	+	-	-	-	-	*pertussis spesifikt* DNA
+	-	+	-	-	-	Pasient med *B. holmesii* spesifikt DNA
+	-	-	-	-	-	
+ Hvis Cq >30	-	+/-	-	-	-	Pasient med *Bordetella spp* DNA
-	-	+	+	+	+	Pasient med *B. parapertussis* spesifikt DNA
-	-	-	+	+	+	
-	-	+/-	+ Hvis Cq >30	-	-	Pasient med *B. parapertussis* eller *B. bronchiseptica* DNA
+/-*	-	+	+/-*	-	+	Pasient med *B. bronchiseptica* spesifikt DNA
+/-*	-	-	+/-*	-	+	
-	-	-	-	-	-	Ugyldig resultat, test på nytt

*Resultatet er belastningsavhengig. Faktisk, avhengig av stammen, kan noen arter bære genet eller ikke. Således er *B. bronchiseptica* stamme FR3523 positiv for IS1001 mens referansestammen RB50 er negativ for dette genet.

Master Mix 1 (blå) tillater deteksjon av *B. pertussis* eller *B. holmesii* og Master Mix 2 (fargeløs) deteksjon av *B. parapertussis*. Kombinasjonen av uttrykket av de forskjellige genene som er påvist i de to brønnene, gjør det mulig å identifisere den andre arten *B. bronchiseptica.*

11 I YTELSE

- **Analytisk sensitivitet**

Deteksjonsgrensen (LoD) for BIOSYNEX AMPLIQUICK ®Bordetella-settet er definert som konsentrasjonen som kan detekteres ved minst 95 % på en spesifikk *Bordetella* DNA-prøve.

Deteksjonsgrenser for ekstraherte DNA-prøver per art:

LoD_{95} på ekstrahert DNA uttrykkes i antall kopier av DNA/µl. Kvantifiserte DNA-ekstrakter ble kjøpt fra Vircell (Amplirun®). LoDs ble vurdert for *Bordetella holmesii* på Master Mix 1 da det er positivt for genet IS481, *Bordetella pertussis* på Master Mix 1 da det er positivt for både mål IS481 og ptxA-Pr og for Bordetella *parapertussis* på Master Mix 2 da det er positivt for IS1001 og begge FLA-genene. Kvantifisert DNA fra B bronchiseptica er ikke tilgjengelig på markedet, derfor kunne ikke LoD_{95} vurderes for denne arten.

LoD_{95} av BIOSYNEX AMPLIQUICK ® Bordetella på ekstrahert DNA har blitt statistisk bestemt for hver stamme og gensekvens. Resultatene er oppsummert i tabellen nedenfor.

Bordetellastamme	LoD_{95} (copies/µL)
Bordetella pertussis	IS481: 0,043 ptxA-Pr: 4,017
Bordetella parapertussis	IS1001: 0,265 FLA 1: 18,418 FLA 2: 16,033
Bordetella holmesii	IS481: 0,253

Deteksjonsgrenser for prøver samlet med AMPLIQUICK transportmedium for prøvetaking og behandlet med BIOSYNEX AMPLIQUICK LYSIS-settet:

LoD-ene ble bestemt ved å utføre en serie fortynninger av en referanseprøve med en kjent konsentrasjon CFU/ml i kvalifiserte Bordetella-negative neseprøver (vattpinner) som ble tilsatt i BIOSYNEX AMPLIQUICK ® prøvesamlings-transportmedium eller negative neseaspiratprøver og behandlet med BIOSYNEXAMPLIQUICK ® lysis-sett.

LoD_{95} av BIOSYNEX AMPLIQUICK ® Bordetella på DNA behandlet med BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis har blitt statistisk bestemt for hver stamme og gensekvens. Resultatene er oppsummert i tabellen nedenfor.

Bordetellastamme	LoD_{95} for neseprøver (vattpinner)				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA 4
Bordetella pertussis	22,837 CFU/mL	451,291 CFU/mL	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	38,264 CFU/mL	528,032 CFU/mL	429,806 CFU/mL
Bordetella holmesii	113,354 CFU/mL	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1791,123 CFU/mL

Bordetellastamme	LoD_{95} for nasale aspirater				
	IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA Publi	FLA 4
Bordetella pertussis	36,679 CFU/mL	2758,238 CFU/mL	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	52,0 CFU/mL	1535,5 CFU/mL	445,297 CFU/mL
Bordetella holmesii	87,674 CFU/mL	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	1101,8 CFU/mL

- **Analytisk spesifisitet**

Utformingen av oligonukleotider (primere og prober) ble validert *in silico* ved BLAST-justering. Sammenligningen av sekvensene som ble innhentet, viser en spesifikk påvisning av BIOSYNEXAMPLIQUICK ® Bordetella-målene. Ingen primere eller sonder oppdager bakterielt DNA annet enn det til de 4 artene av Bordetella som er målrettet.

18 DNA-ekstrakter fra kvalifiserte og refererte stammer ble testet.
11 DNA-ekstrakter fra det franske nasjonale referansesenteret for positive for kikhoste og annen Bordetellose, 3 kontroll-DNA-sekvenser fra en biobank (Amplirun ®,Vircell) og 4 kulturer av standard bakteriestamme (Zeptometrix®).

	Kontroll-DNA		IS481	ptxA-Pr	IS1001	FLA1	FLA2
Biobank	*Bordetella pertussis DNA*		+	+	-	-	-
	Bordetella parapertussis DNA		-	-	+	+	+
	Bordetella holmesii DNA		+	-	-	-	-
	Arter	**Stammer**	**IS481**	**ptxA-Pr**	**IS1001**	**FLA1**	**FLA2**

Standardkultur	*Bordetella pertussis*	A639	+	+	-	-	-
	Bordetella parapertussis	A747	-	-	+	+	+
	Bordetella holmesii	F061	+	-	-	-	-
	Bordetella bronchiseptica	Z341	-	-	-	+	-
NRC	*Bordetella bronchiseptica*	RB50	+	-	-	-	+
		LAR	+	-	-	+	+
		FR3523	-	-	+	-	+
	Bordetella Petrii	KMBW	-	-	-	-	-
		FR5141	-	-	-	-	-
	Bordetella avium	CIP103348T	-	-	-	-	-
		FR6062	-	-	-	-	-
	Bordetella hinzii	CIP104527T	-	-	-	-	-
		FR5948	-	-	-	-	-
	Bordetella trematum	CIP105351T	-	-	-	-	-
		FR5853	-	-	-	-	-

Kryssreaktivitet

Et panel med 76 DNA-prøver og 38 RNA-prøver fra en biobank som er oppført i følgende tabeller, ble testet med BIOSYNEXAMPLIQUICK ® Bordetella-settet. For alle disse prøvene ble det ikke observert noen forsterkning av målene av interesse.

DNA		
Acanthamoeba castellanii	*Escherichia coli (ETEC)*	*Meningokokk Sg A*
Adenovirus	*Escherichia coli (VTEC)*	*Meningokokk Sg B*
Adenovirus 41	*Francisella tularensis*	*Meningokokk Sg C*
Aspergillus fumigatus	*Gardnerella vaginalis*	*Papillomavirus type 16*
Bacillus cereus	*Giardia intestinalis*	*Papillomavirus type 18*
Bartonella henselae	*Haemophilus ducreyi*	*Parvovirus B19 (Plasmid)*
Bartonella Quintana	*Haemophilus bakterie*	*Rickettsia conorii (Pfeiffers bakterie)*
Bk Virus	*Helicobacter pylori*	*Salmonella enteritidis*
Borrelia afzelii	*Herpes simplex 1*	*Salmonella typhi*
Borrelia burgdorferi	*Herpes simplex 2*	*Staphylococcus aureus (MecA-)*
Brucella abortus	*Hhv-6*	*Staphylococcus aureus (MecA+)*
Campylobacter jejuni	*Hhv-8*	*Streptococcus agalactiae (Gruppe B-streptokokker)*
Trøskegjær	*Klebsiella pneumoniae (NDM-1)*	*Toxoplasma gondii*
Candida auris	*Legionella pneumophila*	*Treponema pallidum*
Chlamydia trachomatis	*Leishmania chagasi*	*Trichomonas vaginalis*
Chlamydophila pneumoniae	*Leishmania infantum*	*Trypanosoma cruzi*
Chlamydophila psittaci	*Listeria monocytogenes*	*Ureaplasma parvum*
Clostridium difficile	*Moraxella catarrhalis*	*Ureaplasma urealyticum*

Coccidioides immitis	*Mycobacterium avium*	*Varicella Zoster-Virus*
Coxiella burnetii	*Mycobacterium intracellulare*	*Vibrio cholerae*
Cryptosporidium parvum	*Mycobacterium kansasii*	*Yersinia enterocolitica*
Enterococcus faecalis (VanB)	*Mycobacterium tuberculosis (Tuberkelbakterien)*	*Borrelia garinii*
Enterococcus faecium (VanA)	*Mycobacterium ulcerans*	*Cytomegalovirus*
Epstein-Barr Virus	*Mycoplasma genitalium*	*Pneumokokkerr*
Escherichia coli (EAEC)	*Mycoplasma hominis*	
Escherichia coli (EIEC)	*Neisseria gonorrhoeae (gonokokk)*	

RNA		
Koronavirus Oc43	*Humant parabakterie 1*	*Parainfluensavirus 4 A*
Chikungunya Virus	*Influensa A H1*	*Respiratorisk-syncytialt virus (undertype A)*
Koronavirus	*Influensa A H3*	*Respiratorisk-syncytialt virus (undertype B)*
Koronavirus SARS (2003)	*Influensa A H5*	*Rhinovirus*
Coxsackie A6	*Influensa*	*Rotavirus*
Coxsackie B1	*Meslinger*	*Røde hunder*
Coxsackie B5	*MERS Koronavirus*	*SARS-CoV-2*
Dengue 1-virus	*Kusma*	*Flåttbåret encefalittvirus*
Dengue 2-virus	*Norovirus*	*West Nile-virus*
Dengue 3-virus	*Ny influensa A H1n1*	*Gulfebervirus*
Dengue 4-virus	*Prabakterie 1*	*Zikairus*
Echovirus 5	*Prabakterie 2*	*Zikavirus (asiatisk avstamning)*
Enterovirus 68	*Prabakterie 3*	

- **Interferensstudie**

Tilstedeværelsen av PCR-hemmere i prøven kan indusere en positiv eller negativ interferens på testresultatene. Tilstedeværelsen av forskjellige hemmere i prøver ble testet.

Nesesprayer

Ingen positiv eller negativ interferens ble funnet ved lasting av opptil 10 % i BIOSYNEX AMPLIQUICK ® transportmedium for prøvetaking fra en matrise av nasofaryngeale sekreter behandlet med BIOSYNEXAMPLIQUICK ® LYSIS-settet, med følgende stoffer:

Produkt	Aktiv substans
Nasacort	Triamcinolonacetonid
Aturgyl	Oksymetazolin
Béconase	Beclometasone dipropionate
Budésonide	Budesonide
Mométasone	Mometasone
Avamys	Fluticasone furoate
Fixorinox	Fluticasone propionate

Blod

Tilstedeværelsen av blod i prøven kan indusere en positiv eller negativ interferens på testresultatene. Studien vår viser at blodkonsentrasjoner på opptil 1 % ikke forstyrrer PCR-reaksjonen når BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-settet brukes sammen med BIOSYNEX AMPLIQUICK prøvetakings- og BIOSYNEX AMPLIQUICK LYSIS-settene. For blodkonsentrasjoner fra 2% og oppover, er det en reduksjon i følsomhet. Derfor bør blodkonsentrasjonen i prøven ikke overstige 1 %.

- **Klinisk ytelse**

De kliniske resultatene ble bestemt på 146 prøver fra 4 forskjellige laboratorier som var kvalifisert positive eller negative for *B. pertussis* eller *B. parapertussis* ved hjelp av CE-merkede PCR-tester referert av det franske helsedepartementet.
Disse testene gjør det mulig å identifisere disse to stammene gjennom en forsterkning av genene IS481 og IS1001, som også finnes i stammene *B. holmesii* og *B. bronchiseptica.*
Prøvene ble kvalifisert med BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-settet på rensede DNA-ekstrakter eller etter behandling med BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis-settet.

	Antall prøver	*B. pertussis*		*B. parapertussis*		*Samtidig infeksjon*	*Negativ for Bordetella*
		+	-	+	-		
Laboratorium 1	63	58	1	8	51	8*	5
Laboratorium 2	12	12	0	2	10	2	0
Laboratorium 3	31	0	0	0	0	0	31
Laboratorium 4	40	0	0	0	0	0	40

*Blant de åtte prøvene som kvalifiserte som positive for *B. pertussis* og *B. parapertussis* fra laboratorium 1, ble ingen koinfeksjon bekreftet ved bruk av BIOSYNEX AMPLIQUICK ® Bordetella-settet samt et annet CE-merket sett på markedet.

Beredskapstabellen nedenfor viser ytelsen til BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-sett på prøver etter DNA-ekstraksjon/rensing med et kommersielt sett:

		Referanse PCR	
		Positiv	Negativ
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positiv	69	0
	Negativ	1	76

Sensitivitet: 98,57 % (95 % CI: 92,30 % til 99,96 %) **Spesifisitet: 100%** (95 % CI: 95,26 % til 100 %)

Beredskapstabellen nedenfor viser ytelsen til BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella-sett på prøver som er behandlet med BIOSYNEX AMPLIQUICK Lysis-sett

		Referanse PCR	
		Positiv	Negativ
BIOSYNEX AMPLIQUICK Bordetella	Positiv	66	0
	Negativ	4	76

Sensitivitet: 94,29 % (95 % CI: 86,01 % til 98,42 %) **Spesifisitet: 100%** (95 % CI: 95,26 % til 100 %)

For denne studien hadde vi ikke tilgang til kliniske prøver fra pasienter positive for *B. bronchiseptica* og *B. holmessi* (sjeldne prøver). Ytelsen til settet for disse to artene ble validert ved hjelp av stammer levert av det franske nasjonale referansesenteret for kikhoste og annen Bordetellose.

- **Presisjon**

Presisjonsdataene i sammenheng med BIOSYNEX AMPLIQUICK ®Bordetella-settet ble bestemt basert på fire betingelser:

- Intra-analysevariabilitet (intradag, innenfor samme eksperiment)
- Variasjon mellom dager
- Variasjon mellom operatører
- Variasjon mellom partier

Variasjonsdataene uttrykkes ved gjennomsnittsverdi, standardavvik og variasjonskoeffisient, basert på terskelverdier for kvantifiseringssyklus (Cq) for Bordetella DNA.

Variasjonsdata for intra-analyse:
To prøvefortynninger ble testet for hver Bordetella-art detektert av settet: 1 høy (+++) som tilsvarer 1000 kopier/µL og 1 lav (+) som tilsvarer 10 kopier/µL. To forskjellige lave fortynninger ble brukt for *B. pertussis* og *B. parapertussis*, da deres to positive mål har forskjellige følsomheter og IS481- og IS1001-genene er multikopierte og ptxA-Pr- og FLA-genene er monokopierte.
Hver prøve ble testet 30 ganger.

Ekstrahert DNA

			Blanding 1						Blanding 2		
	Prøvefortynning	Mål	Middels Cq	SD	CV %		Prøvefortynning	Mål	Middels Cq	SD	CV %
B. pertussis	+++	IS481	13,3	0,1	0,9	*B. parapertussis*	+++	IS1001	15,8	0,3	1,7
	+ (ptxA-Pr)		27,4	1,1	4,0		+ (FLA1og 2)		29,1	0,1	0,5
	- (IS481)		34,7	0,3	1,0		+(IS1001)		35,1	0,7	1,9
	+++	ptxA-Pr	19,6	0,2	0,8		+++	FLA1	21,5	0,2	0,8
	+ (ptxA-Pr)		34,3	0,7	2,2		+ (FLA1og 2)		35,2	0,4	1,2
							+++	FLA2	21,9	0,2	0,8
							(FLA1og 2)		34,7	0,3	0,9
B holmesii	+++	IS481	21,2	0,1	0,7	*B. bronchiseptic*	+++	FLA 2	21,8	0,1	0,6
	+		36,2	0,5	1,3		+		36,6	0,6	1,7

Forbehandling med BIOSYNEXAMPLIQUICK Lysis-sett

			Blanding 1						Blanding 2		
	Prøvefortynning	Mål	Middels Cq	SD	CV %		Prøvefortynning	Mål	Middels Cq	SD	CV %
B. pertussis	+++	IS481	14,7	0,2	1,0	*B. parapertussis*	+++	IS1001	13,7	0,2	1,2
	+ (ptxA-Pr)		28,8	1,0	3,4		+ (FLA1og 2)		31,3	0,2	0,8
	+ (IS481)		34,4	1,2	3,4		+(IS1001)		34,5	0,8	2,4
	+++	ptxA-Pr	22,4	0,1	0,6		+++	FLA1	19,2	0,2	1,1
	+ (ptxA-Pr)		35,5	1,1	3,0		+ (FLA1og 2)		37,1	0,6	1,7
							+++	FLA2	18,9	0,2	1,1
							(FLA1og 2)		34,9	0,5	1,4
B holmesii	+++	IS481	21,5	0,0	0,2	*B bronchiseptica*	+++	FLA 2	18,6	0,2	0,8
	+		35,4	1,4	4,0		+		34,8	0,3	0,8

Variasjonsdata for inter-anayse

To prøvefortynninger ble testet for hver Bordetella-art detektert av settet: 1 høy (+++) som tilsvarer 1000 kopier/µL og 1 lav (+) som tilsvarer 10 kopier/µL.
Hver prøve testes i duplikat to ganger hver dag, i løpet av fem dager.
Negative prøver gir negative resultater.

	+++			+		
Gen	Gjennomsnittlig Cq-verdi utvalg +++	Standard for avvik	Variasjonskoeffisient %	Gjennomsnittlig Cq-verdi utvalg +	Standard for avvik	Variasjonskoeffisient %
IS481	27,7	0,1	0,4	33,9	0,2	0,6
ptxA-Pr	27,3	0,1	0,3	33,4	0,2	0,5
IS1001	27,6	0,1	0,4	33,6	0,3	0,8
FLA1	29,5	0,2	0,6	35,7	0,1	0,4
FLA2	28,6	0,2	0,8	34,7	0,3	0,7

Variasjonsdata for inter-operatører

To prøvefortynninger ble testet for hver Bordetella-art detektert av settet: 1 høy (+++) som tilsvarer 1000 kopier/µL og 1 lav (+) som tilsvarer 10 kopier/µL.
to ganger daglig av to forskjellige operatører, i løpet av fem dager.
Negative prøver gir negative resultater.

	+++			+		
Gen	Gjennomsnittlig Cq-verdi utvalg +++	Standard for avvik	Variasjonskoeffisient %	Gjennomsnittlig Cq-verdi utvalg +	Standard for avvik	Variasjonskoeffisient %
IS481	27,6	0,1	0,4	33,9	0,0	0,1
ptxA-Pr	27,2	0,1	0,4	33,4	0,0	0,1
IS1001	27,5	0,1	0,2	33,6	0,0	0,1
FLA1	29,4	0,1	0,4	35,6	0,0	0,1
FLA2	28,6	0,0	0,0	34,8	0,0	0,1

Variasjonsdata for inter-partier

To prøvefortynninger ble testet for hver Bordetella-art detektert av settet: 1 høy (+++) som tilsvarer 1000 kopier/µL og 1 lav (+) som tilsvarer 10 kopier/µL.
Hver prøve ble testet i triplikat eller duplikat på to forskjellige partier.
Negative prøver gir negative resultater.

	+++			+		
Gen	Gjennomsnittlig Cq-verdi utvalg +++	Standard for avvik	Variasjonskoeffisient %	Gjennomsnittlig Cq-verdi utvalg +	Standard for avvik	Variasjonskoeffisient %
IS481	26,9	0,2	0,6	33,4	0,4	1,1
ptxA-Pr	27,4	0,1	0,5	33,7	0,7	2,0
IS1001	26,9	0,0	0,0	33,0	0,3	0,9
FLA1	29,1	0,1	0,5	35,1	0,0	0,0
FLA2	28,5	0,0	0,1	34,6	0,1	0,3

12 I BEGRENSNINGER

1. Hvis man ikke følger instruksjonene i denne bruksanvisningen kan det påvirke testytelsen negativt og ha skadelige konsekvenser.
2. Som med alle diagnostiske tester, må resultatene vurderes sammen med annen klinisk informasjon som er tilgjengelig for legen. Et negativt resultat kan aldri utelukke tilstedeværelsen av Bordetella i prøven (f.eks. kan gener være til stede i en konsentrasjon under testens minste deteksjonsgrense, interferens), og et positivt resultat kan aldri sikre tilstedeværelsen av Bordetella i prøven (f.eks. forurensning). En endelig diagnose kan bare stilles av legen etter evaluering av alle kliniske data og laboratoriedata.

3. Prøver med mer enn 1% blod kan forstyrre testresultatet. Ved blod i prøven, vurder resultatet med forsiktighet.

13 I BIBLIOGRAFI

- Pittet LF, Emonet S, Schrenzel J, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Bordetella holmesii : an under-recognized Bordetella species. The Lancet Infectious Diseases. 2014; 14(6):510-9.
- Pittet LF, Emonet S, François P, Bonetti EJ, Schrenzel J, Hug M, Altwegg M, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Diagnosis of whooping cough in Switzerland: Differentiating Bordetella pertussis from Bordetella holmesii by polymerase chain reaction. PLoS One. 2014; 9(2): e88936
- Sanz JC, Abad R, Sanz C, Miguel A. Diagnóstico diferencial de Bordetella bronchiseptica por RT-PCR en un ní no con tos paroxística sin antecedentes patológicos previos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.09.016

14 I SYMBOLER

	Se bruksanvisning eller den elektroniske instruksen for bruk		Inneholder tilstrekkelig til <n> tester	REF	Katalognummer
IVD	*In vitro*-diagnostisk medisinsk utstyr		Temperaturgrense		Må ikke gjenbrukes
	Produsent	LOT	Lotnummer		Utløpsdato
	Må ikke utsettes for sollys	Mmix	Master mix		Mikroplate
CONTROL -	Negativ kontroll	CONTROL +	Positiv kontroll	UDI	Unik utstyrs-ID
	Pose med lokkstrimler		Skal ikke brukes hvis emballasjen er skadet. Se bruksanvisningen.	CH REP	Autorisert representant i Sveits
	Importør	+/-	Kvalitativ påvisning ved hjelp av PCR		

15 I INFORMASJON OM PRODUSENTEN

BIOSYNEX S.A.
22 boulevard Sébastien Brant
67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN – France
Standard:
Tel.: +33 3 88 78 78 87
www.biosynex.com
Kontakter Frankrike :
Tel.: +33 3 88 77 57 00
service.clients@biosynex.com
Kontakter i andre land :
Tel. : +33 3 88 77 57 52
sales@biosynex.com
Service etter salg :
Tel. : +33 3 88 77 57 25
Tech.support@biosynex.com

CH REP
BIOSYNEX SWISS S.A.
Route de Rossemaison 100
2800 DELEMONT - Switzerland
France

Siste endringer:
Oppdatering av tabellen med symboler og produsentens kontaktinformasjon.
§7: rettelse vedrørende prøvetaking av sug.