

Vitassay qPCR

Bordetella pertussis + B. parapertussis+ B. holmesii

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de los *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y/o *Bordetella holmesii* en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y/o *Bordetella holmesii* in human samples



Uso previsto

Vitassay qPCR Bordetella pertussis + B. parapertussis + B. holmesii, permite la detección y diferenciación de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y/o *Bordetella holmesii* mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y/o *Bordetella holmesii*.

Referencias

Vitassay qPCR Bordetella pertussis + B. parapertussis + B. holmesii 4x8 -well strip, low profile 7041020

Vitassay qPCR Bordetella pertussis + B. parapertussis + B. holmesii 4x8-well strip, high profile 7042020

Materiales/Reactivos suministrados

| Código | Reactivo/Material | Color | Cantidad |
|-----------------------|---|----------|-----------------------|
| 7041S020/ 7042S020 | Bordetella pertussis + B. parapertussis + B. holmesii strips low/high profile | - | 4 tiras de 8 pocillos |
| 7C020 | Bordetella Positive Control | rojo | 1 vial |
| 7001A | PCR grade water | blanco | 1 vial x 1 mL |
| 7002B | Resuspension buffer | verde | 1 vial x 1,8 mL |
| 7003N | Negative control | amarillo | 1 vial x 1 mL |
| 7004O | Tapas ópticas | - | 4 tiras de 8 tapones |

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Las bacterias del género *Bordetella* son bacilos gramnegativos aislados de las vías respiratorias superiores. *Bordetella pertussis* es el principal agente causante de la tos ferina, aunque *Bordetella parapertussis*, también puede producir esta enfermedad con una sintomatología más leve. Adicionalmente, *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella holmesii* se han identificado como causantes de enfermedades del tracto respiratorio con manifestaciones clínicas similares a las del síndrome pertusoide, aunque principalmente se dan en personas inmunodeprimidas.

La incidencia estimada de esta enfermedad en todo el mundo oscila entre 30 y 50 millones de casos causando alrededor de 195.000 muertes al año. La mayoría de estos casos ocurren en países en desarrollo en los que no existen programas de vacunación. En los países desarrollados, a pesar de la espectacular disminución de la incidencia de esta enfermedad a partir de la introducción de la vacunación en los años 50, se está observado un resurgimiento global de la enfermedad en las dos últimas décadas.

El aislamiento de *B. pertussis* en cultivo es definitivo para el diagnóstico, y aunque poco sensible (50%) sigue siendo el método diagnóstico de referencia. La PCR permite un diagnóstico rápido y mejora la sensibilidad del cultivo.

Principio del test

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región conservada de la secuencia de inserción IS481 para *Bordetella pertussis/holmesii*, hIS1001 para *Bordetella holmesii* y pIS1001 para *Bordetella parapertussis*. Tras la extracción de DNA, la presencia de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y/o *Bordetella holmesii* se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii*, se trata de un test *listo para usar* que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la

secuencia diana es detectada en el canal FAM (*Bordetella pertussis/holmesii*), ROX (*Bordetella holmesii*) y Cy5 (*Bordetella parapertussis*) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en los laboratorios.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA.

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega).

EZ1 Virus Mini Kit (Qiagen).

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Bordetella Positive Control (tubo rojo) con 100 μL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C .

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 μL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 μL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

| Etapa | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|--|-------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95°C | 2 min | 1 |
| Desnaturalización | 95°C | 10 seg | 45 |
| Hibridación/Elongación (Recogida de datos*) | 60°C | 50 seg | |

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (*Bordetella pertussis/holmesii*), ROX (*Bordetella holmesii*), Cy5 (*Bordetella paraptussis*) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales de *Bordetella pertussis/holmesii* (FAM), *Bordetella holmesii* (ROX) y *Bordetella parapertussis* (Cy5).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM, ROX y Cy5.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

Con la ayuda de la siguiente tabla, analizar los resultados:

| <i>Bordetella pertussis</i> / <i>Bordetella holmesii</i> | <i>Bordetella holmesii</i> | <i>Bordetella parapertussis</i> | Control Interno | Control Negativo | Control Positivo | Interpretación |
|---|----------------------------|---------------------------------|-----------------|------------------|------------------|--|
| + | - | - | +/- | - | + | <i>Bordetella pertussis</i> Positiva, <i>B. holmesii</i> y <i>B. parapertussis</i> Negativas |
| + | + | - | +/- | - | + | <i>Bordetella holmesii</i> Positiva, <i>B. pertussis</i> y <i>B. parapertussis</i> Negativas |
| - | - | + | +/- | - | + | <i>Bordetella parapertussis</i> Positiva, <i>B. holmesii</i> y <i>B. pertussis</i> Negativa |
| - | - | - | + | - | + | <i>Bordetella pertussis</i> , <i>B. holmesii</i> y <i>B. parapertussis</i> Negativa |
| + | + | + | + | + | + | Inválido |
| - | - | - | - | - | - | Inválido |

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todas las bacterias no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* se evaluó con diferentes paneles QCMD de *Bordetella pertussis*. Los paneles de estos programas consistían en un total de 30 muestras clínicas disueltas en un medio de transporte salino o amies. Los resultados se compararon con los resultados de los informes finales del programa *Bordetella pertussis* EQA. Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* detectó correctamente todas las muestras (16 *Bordetella pertussis* positivas, 3 *B. parapertussis* positivas y 3 *B. holmesii* positivas).

Además, Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* se evaluó con 187 muestras respiratorias en una Evaluación Multicentros a través de la colaboración con diferentes entidades. Los resultados se compararon con los obtenidos por tres kits de PCR a tiempo real comerciales: *Bordetella pertussis* & *parapertussis* primer/probes sets (Cepheid), RIDA®GENE *Bordetella* real-time PCR (R-biopharm) y *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* and *B. holmesii* (BioGx, USA).

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* y los otros tres kits comerciales detectaron 50 muestras positivas para *Bordetella pertussis*.

Para *B. parapertussis*, 3 muestras fueron detectadas por Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* mientras que los otros tres kits solo detectaron 1 muestra positiva. El kit Vitassay detecta *B. pertussis* y *B. parapertussis* en 2 muestras clínicas diagnosticadas como *B. pertussis* por el ensayo de Cepheid. Esta co-infección no puede ser descartada.

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* y los otros tres kits comerciales detectaron 3 muestras positivas para *Bordetella holmesii*.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii* utilizando Vitassay qPCR Bordetella pertussis + B. parapertussis + B. holmesii kit.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de las diferentes bacterias (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii* fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

| Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada | | |
|---|---|---------------------------------------|
| <i>Legionella bozemanii</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> | Influenza B/Phuket/3073/2013 |
| <i>Legionella micdadei</i> | <i>Moraxella catarrhalis</i> | Virus Respiratorio Sincitial (RSV) |
| <i>Legionella dumoffii</i> | Influenza A/California/7/2009(H1N1) | Metapneumovirus humano A y B |
| <i>Legionella longbeachae</i> | Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) | Virus parainfluenza 1, 2, 3, 4 humano |
| <i>Legionella pneumophila</i> | Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus | Coronavirus 229E humano |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | Influenza A/Switzerland/9715293/2013 | Rhinovirus humano |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 | Adenovirus humano 2 cepa Adenoid 6 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | Influenza B/Brisbane/60/2008 | Adenovirus humano 5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina | Influenza B/Florida/04/06 | <i>Bordetella bronchiseptica</i> |

Reactividad analítica

Vitassay qPCR Bordetella pertussis + B. parapertussis + B. holmesii Real Time PCR ha sido evaluado frente a diferentes cepas clínicas de cada una de las especies, para *Bordetella pertussis* (cepa *Bordetella pertussis* (Bergey et al. 1923) Moreno-Lopez 1952 CECT 7974), *Bordetella parapertussis* (aislado clínico positivo para *B. parapertussis*, que fue confirmado por dos métodos de diagnóstico molecular (ensayo SmartCycler *Bordetella pertussis/parapertussis* (Cepheid) y RIDA®GENE Bordetella (r-Biopharm)) y *Bordetella holmesii* (cepa *Bordetella holmesii* Weyant et al. 1995 DSM 13416), obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Bordetella pertussis + B. parapertussis + B. holmesii, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii*. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras de aspirados nasofaríngeos y frotis pernasales. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los diferentes bacterias, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

| Termocicladores con bloque de bajo perfil | Termocicladores con bloque de alto perfil |
|--|---|
| Agilent Technologies | Abbott |
| AriaMx Real-Time PCR System | Abbott m2000 RealTime System |
| Applied Biosystems | Applied Biosystems |
| 7500 Fast Real-Time PCR System | 7300 Real-Time PCR System |
| 7500 Fast Dx Real-Time PCR System | 7500 Real-Time PCR System |
| QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast | 7900 HT Real-Time PCR System |
| QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast | ABI PRISM 7000 |
| QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast | ABI PRISM 7700 |
| QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System | QuantStudio™ 12K Flex 96-well |
| QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System | QuantStudio™ 6 Flex 96-well |
| StepOne Plus™ Real-Time PCR System | QuantStudio™ 7 Flex 96-well |
| StepOne™ Real-Time PCR System | QuantStudio™ 5 Real-Time PCR |
| ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System | QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System |
| BIONEER | ViiA™ 7 Real-Time PCR |
| Exicycler™ 96 | Analytik Jena Biometra |
| Bio-Rad | TOptical |
| CFX96™ Real-Time PCR Detection System | qTOWER 2.0 |
| Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System | BIONEER |
| Cepheid | Exicycler™ 96 |
| SmartCycler® | Bio-Rad |
| Qiagen | CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection |
| Rotor-Gene® Q | iCycler iQ™ Real-Time PCR |
| Roche | iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR |
| LightCycler® 480 Real-Time PCR System | MyiQ™ Real-Time PCR Detection System |
| LightCycler® 96 Real-Time PCR System | MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System |
| Cobas z480 Analyzer | Cepheid |
| | SmartCycler® |
| | DNA-Technology |
| | DTlite Real-Time PCR System* |
| | DTprime Real-time Detection Thermal Cycler* |
| | Eppendorf |
| | Mastercycler™ ep <i>realplex</i> |
| | Qiagen |
| | Rotor-Gene® Q |
| | Stratagene / Agilent Technologies |
| | Mx3000P™ Real Time PCR System |
| | Mx3005P™ Real Time PCR System |

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

| Termociclador | Canal Vitassay | Canal de Detección | Observaciones |
|--------------------------------------|----------------|--------------------|--|
| Bio-Rad CFX96™ | FAM | FAM | |
| | HEX | HEX | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| ABI 7500 Applied Biosystems | FAM | FAM | Opción del control pasivo ROX desactivada |
| | HEX | VIC | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| Roche Lightcycler®480II | FAM | 465/510 | Se requiere compensación de color |
| | HEX | 533/580 | |
| | ROX | 533/610 | |
| | Cy5 | 618/660 | |
| Smartcycler® Cepheid | FAM | Channel 1 | |
| | HEX | Channel 2 | |
| | ROX | Channel 3 | |
| | Cy5 | Channel 4 | |
| Abbott m2000rt | FAM | FAM | |
| | HEX | VIC | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene | FAM | FAM | Opción del control pasivo ROX desactivada |
| | HEX | VIC | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| AriaMx Agilent | FAM | FAM | |
| | HEX | HEX | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| Rotor-Gene® Q Qiagen | FAM | Green | Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition". |
| | HEX | Yellow | |
| | ROX | Orange | |
| | Cy5 | Red | |
| Exicycler™ 96 BIONEER | FAM | FAM | |
| | HEX | JOE | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

| Termociclador | Canal Vitassay | Valor de exposición |
|--|----------------|---------------------|
| DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) | FAM | 500 |
| | HEX | 500 |
| | ROX | 500 |
| | Cy5 | 500 |
| DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) | FAM | 500 |
| | HEX | 1000 |
| | ROX | 1000 |
| | Cy5 | 1000 |

Intended use

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* allows the detection and differentiation of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y/o *Bordetella holmesii* by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y/o *Bordetella holmesii* infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* 4x8 -well strip, low profile 7041020

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* 4x8-well strip, high profile 7042020

Materials/reagents provided

| Reference | Reagent/Material | Colour | Amount |
|-----------------------|--|--------|------------------|
| 7041S020/ 7042S020 | <i>Bordetella pertussis</i> + <i>B. parapertussis</i> + <i>B. holmesii</i> strips low/high profile | - | 4 x 8-well strip |
| 7C020 | <i>Bordetella</i> Positive Control | red | 1 vial |
| 7001A | PCR grade water | white | 1 vial x 1 mL |
| 7002B | Resuspension Buffer | green | 1 vial x 1,8 mL |
| 7003N | Negative control | yellow | 1 vial x 1 mL |
| 7004O | Optical caps | - | 4 x 8 cap strip |

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

The genus *Bordetella* bacteria are gram negative bacilli which are isolated from the upper respiratory tract. *Bordetella pertussis* is the main causative agent of whooping cough, although *Bordetella parapertussis*, can also produce the disease, but with a milder symptomatology. Additionally, *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella holmesii* have been identified as causing respiratory tract diseases with clinical manifestations similar to that of the pertussis syndrome but mainly in immunocompromised individuals

The estimated incidence of this disease worldwide ranges from 30 to 50 million cases causing about 195,000 deaths a year. Most cases occur in developing countries where vaccination programs do not exist. In developed countries, despite the dramatic decrease in the incidence of this disease since the introduction of vaccination in the 1950s, a global resurgence of the disease has been observed in the last two decades.

Isolation of *B. pertussis* in culture is definitive for diagnosis, and although the low sensitivity (50%) remains the diagnostic reference method. PCR allows rapid diagnosis and enhances culture sensitivity.

Principle of the test

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* test is based on the real-time amplification of a conserved region of the insertion sequence *IS481* for the identification of *Bordetella pertussis*/*Bordetella holmesii*, *Bordetella holmesii* for the insertion sequence *hIS1001* and *Bordetella parapertussis* for the insertion sequence *pIS1001*. After DNA isolation, the presence of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella holmesii* is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the *Bordetella pertussis*/*Bordetella holmesii* DNA target sequence is detected through the FAM channel, *Bordetella holmesii* DNA target

in ROX channel and *Bordetella parapertussis* DNA in Cy5 channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Attached II).

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, processing and DNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega)

EZ1 Virus Mini Kit (Qiagen)

RIDA® Xtract (r-Biopharm)

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Bordetella Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

| Step | Temperature | Time | Cycles |
|---|-------------|--------|--------|
| Initial denaturation | 95°C | 2 min | 1 |
| Denaturation | 95°C | 10 sec | 45 |
| Annealing/Extension (Data collection*) | 60°C | 50 sec | |

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (*Bordetella pertussis/Bordetella holmesii*), ROX (*Bordetella holmesii*), Cy5 (*Bordetella parapertussis*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II)

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (*Bordetella pertussis/Bordetella holmesii*), ROX (*Bordetella holmesii*) and Cy5 (*Bordetella parapertussis*), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, ROX and Cy5 which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table:

| <i>Bordetella pertussis/Bordetella holmesii</i> | <i>Bordetella holmesii</i> | <i>Bordetella parapertussis</i> | Internal control | Negative control | Positive control | Interpretation |
|---|----------------------------|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|--|
| + | - | - | +/- | - | + | <i>Bordetella pertussis</i> Positive, <i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> Negatives |
| + | + | - | +/- | - | + | <i>Bordetella holmesii</i> Positive, <i>B. pertussis</i> and <i>B. parapertussis</i> Negatives |
| - | - | + | +/- | - | + | <i>Bordetella parapertussis</i> Positive, <i>B. holmesii</i> and <i>B. pertussis</i> Negatives |
| - | - | - | + | - | + | <i>B. pertussis</i> , <i>B. holmesii</i> and <i>B. parapertussis</i> Negatives |
| + | + | + | + | + | + | Experiment fail |
| - | - | - | - | - | - | Experiment fail |

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

If the negative samples do not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* was evaluated with the different QCMD panels from *Bordetella pertussis*. These panels consist of a total of 30 clinical specimens dissolved in saline or amies transport medium. The results were compared with those of EQA programme final report. Vitassay qPCR correctly detected all the samples (16 *Bordetella pertussis* positives, 3 *B. parapertussis* positives and 3 *B. holmesii* positives).

In addition, Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* was evaluated with 187 respiratory samples in a Multicenter Evaluation through collaboration with different entities. The results were compared with those obtained by three commercial real-time PCR kits: *Bordetella pertussis* & *parapertussis* primer / probes sets (Cepheid), RIDA@GENE *Bordetella* real-time PCR (R-biopharm) and *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* and *B. holmesii* (BioGx, USA).

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* and the other three commercial kits detected 50 positive samples for *Bordetella pertussis*.

For *B. parapertussis*, 3 samples were detected by Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* while the other three kits only detected 1 positive sample. The Vitassay kit detects *B. pertussis* and *B. parapertussis* in 2 clinical samples diagnosed as *B. pertussis* by the Cepheid assay. This co-infection cannot be ruled out.

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* and the other three commercial kits detected 3 positive samples for *Bordetella holmesii*.

The results show high sensitivity and specificity to detect *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella holmesii* using Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* kit.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmesii* and *Bordetella parapertussis* templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmesii* and *Bordetella parapertussis* was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

| Cross-reactivity assay | | |
|--|---|-------------------------------------|
| <i>Legionella bozemanii</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> | Influenza B/Phuket/3073/2013 |
| <i>Legionella micdadei</i> | <i>Moraxella catarrhalis</i> | Respiratory syncytial virus (RSV) |
| <i>Legionella dumoffii</i> | Influenza A/California/7/2009(H1N1) | Human metapneumovirus A and B |
| <i>Legionella longbeachae</i> | Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) | Human parainfluenza 1, 2, 3, 4 |
| <i>Legionella pneumophila</i> | Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus | Human coronavirus 229E |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | Influenza A/Switzerland/9715293/2013 | Human rhinovirus |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 | Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | Influenza B/Brisbane/60/2008 | Human Adenovirus 5 |
| Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> | Influenza B/Florida/04/06 | <i>Bordetella bronchiseptica</i> |

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* was evaluated against specific clinical strains of each species, *Bordetella pertussis* (*Bordetella pertussis* (Bergey et al. 1923) Moreno-Lopez 1952 CECT 7974 strain), *Bordetella parapertussis* (*B. parapertussis* clinical strain isolated which was confirmed by molecular diagnosis assays (SmartCycler *Bordetella pertussis/parapertussis* assay (Cepheid) and RIDA@GENE *Bordetella* (r-Biopharm)) and *Bordetella holmesii* (*Bordetella holmesii* Weyant et al. 1995 DSM 13416 strain), showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR *Bordetella pertussis* + *B. parapertussis* + *B. holmesii* has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96 TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler® tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmesii* and *Bordetella parapertussis* infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with nasopharyngeal aspirates and pernasal swabs samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different bacteria, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

| Low profile Block Thermocyclers | High profile Block Thermocyclers |
|--|--|
| Agilent Technologies | Abbott |
| AriaMx Real-Time PCR System | Abbott m2000 RealTime System |
| Applied Biosystems | Applied Biosystems |
| 7500 Fast Real-Time PCR System | 7300 Real-Time PCR System |
| 7500 Fast Dx Real-Time PCR System | 7500 Real-Time PCR System |
| QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast | 7900 HT Real-Time PCR System |
| QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast | ABI PRISM 7000 |
| QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast | ABI PRISM 7700 |
| QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System | QuantStudio™ 12K Flex 96-well |
| QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System | QuantStudio™ 6 Flex 96-well |
| StepOne Plus™ Real-Time PCR System | QuantStudio™ 7 Flex 96-well |
| StepOne™ Real-Time PCR System | QuantStudio™ 5 Real-Time PCR |
| ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System | QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System |
| BIONEER | ViiA™ 7 Real-Time PCR |
| Exicycler™ 96 | Analytik Jena Biometra |
| Bio-Rad | TOptical |
| CFX96™ Real-Time PCR Detection System | qTOWER 2.0 |
| Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System | BIONEER |
| Cepheid | Exicycler™ 96 |
| SmartCycler® | Bio-Rad |
| Qiagen | CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection |
| Rotor-Gene® Q | iCycler iQ™ Real-Time PCR |
| Roche | iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR |
| LightCycler®480 Real-Time PCR System | MyiQ™ Real-Time PCR Detection System |
| LightCycler®96 Real-Time PCR System | MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System |
| Cobas z480 Analyzer | Cepheid |
| | SmartCycler® |
| | DNA-Technology |
| | DTlite Real-Time PCR System |
| | DTprime Real-time Detection Thermal Cycler |
| | Eppendorf |
| | Mastercycler™ ep <i>realplex</i> |
| | Qiagen |
| | Rotor-Gene® Q |
| | Stratagene / Agilent Technologies |
| | Mx3000P™ Real Time PCR System |
| | Mx3005P™ Real Time PCR System |

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

| REAL-TIME PCR THERMOCYCLER | Vitassay CHANNEL | DETECTION CHANNEL | OBSERVATIONS |
|--------------------------------------|------------------|-------------------|---|
| Bio-Rad CFX96™ | FAM | FAM | |
| | HEX | HEX | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| ABI 7500 Applied Biosystems | FAM | FAM | Passive reference option ROX is none |
| | HEX | VIC | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| Roche Lightcycler®480II | FAM | 465/510 | Colour Compensation required |
| | HEX | 533/580 | |
| | ROX | 533/610 | |
| | Cy5 | 618/660 | |
| Smartcycler® Cepheid | FAM | Channel 1 | |
| | HEX | Channel 2 | |
| | ROX | Channel 3 | |
| | Cy5 | Channel 4 | |
| Abbott m2000rt | FAM | FAM | |
| | HEX | VIC | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene | FAM | FAM | Passive reference option ROX is none |
| | HEX | VIC | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| AriaMx Agilent | FAM | FAM | |
| | HEX | HEX | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| Rotor-Gene® Q Qiagen | FAM | Green | In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition". |
| | HEX | Yellow | |
| | ROX | Orange | |
| | Cy5 | Red | |
| Exicycler™ 96 BIONEER | FAM | FAM | |
| | HEX | JOE | |
| | ROX | ROX | |
| | Cy5 | Cy5 | |

Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

| Thermocycler | Vitassay channel | Exposure values |
|--|-------------------------|------------------------|
| DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) | FAM | 500 |
| | HEX | 500 |
| | ROX | 500 |
| | Cy5 | 500 |
| DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) | FAM | 500 |
| | HEX | 1000 |
| | ROX | 1000 |
| | Cy5 | 1000 |

Bibliography/Bibliografía

1. Novel Multitarget Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of *Bordetella* Species in Clinical Specimens Kathleen M. Tatti, Kansas N. Sparks, Kathryn O. Boney, Maria Lucia Tondella *J Clin Microbiol.* 2011 Dec; 49(12): 4059–4066.
2. Detection and Differentiation of *Bordetella* spp. by Real-Time PCR. Christoph Koidl, Michael Bozic, Anja Burmeister, Markus Hess, Egon Marth, Harald H. Kessler. *J Clin Microbiol.* 2007 Feb; 45(2): 347–350.
3. Real-Time PCR Assay Targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and Molecular Basis for Detecting *Bordetella holmesii*. Udo Reischl, Norbert Lehn, Gary N. Sanden, Mike J. Loeffelholz *J Clin Microbiol.* 2001 May; 39(5): 1963–1966).

Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.










Mx3000P™ and Mx3029™ are registered trademarks of Agilent Technologies.

Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.

Rotor-Gene® Q is a registered trademark of Qiagen.

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

| | | | |
|---|---|---|---|
|  | Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only |  | Almacenar en lugar seco Keep dry |
|  | Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use |  | Limitación de temperatura Temperature limitation |
|  | Fecha de caducidad Use by |  | Fabricante Manufacturer |
|  | Número de lote Lot number |  | Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test |
| DIL | Diluyente de muestra Buffer (sample diluent) |  | Número de referencia Catalogue number |



VA Vitassay

Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com