



EurobioPlex

Bordetella Pertussis and Parapertussis REAL-TIME PCR

For **qualitative** real-time PCR

EBX-001-UN

REF **EBX-001-48**
EBX-001-24



24/48/96 reactions



Version 6.03 of 13/11/2024

Validated on:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Biorad) with analysis on CFX Manager v 3.1 (Biorad)
- T-COR 8®-IVD (Tetcore Inc.) with T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software

Reagents compatible with the following real-time PCR systems:

Applied Biosystems Prism® 7500; qTOWER 2.2; Cepheid Smart Cyclor II®;
Qiagen Rotor-Gene 3000/6000; Stratagene MX3005P*; Biorad Chromo4/CFX 96; Roche LightCycler 480...

* ongoing

Storage conditions: keep all reagents between -15°C and -22°C until use
and after first use



Instructions for use

Available on request from info@eurobio-scientific.com

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH.....	1
FRANÇAIS.....	23
DEUTSCH.....	46

INTENDED USE.....	3
INTRODUCTION	3
PRINCIPLE OF DETECTION	4
DESCRIPTION AND CONTENT OF THE KIT.....	4
STORAGE.....	6
CAUTIONS AND NOTES.....	6
COLLECTION OF SAMPLES, TRANSPORT AND STORAGE	6
PROCEDURE.....	7
VALIDATION OF THE EXPERIMENT**	10
DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION	10
PERFORMANCES ANALYSIS.....	11
SPECIFICITIES OF THE REAL-TIME PCR T-COR 8®-IVD INSTRUMENT	14
BIBLIOGRAPHY.....	21
WASTE ELIMINATION	21
SYMBOLS	22

INTENDED USE

The *Bordetella pertussis/parapertussis* test uses real-time polymerase chain reaction (PCR) amplification and is designed for the qualitative detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* from a nucleic acid extract. This test is indicated to diagnose the occurrence of an infection by *Bordetella pertussis* or by *Bordetella parapertussis* in humans. Extracted DNA is the starting material for the Eurobioplex *Bordetella* kit.

The Eurobioplex *Bordetella pertussis/parapertussis* has been validated on the following type of samples:

- Nasopharyngeal aspirations

This amplification system has been validated on 107 nasopharyngeal aspiration samples and 6 quality control samples from a French National Reference Center.

INTRODUCTION

Whooping cough is a very contagious disease of the respiratory system caused by Gram negative bacteria, *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. The clinical symptoms are a chronic cough, which can be very strong and can be followed by whistling breezing and throwing up. For the most severe cases, most often in newborns, this can lead to hypoxia, irreversible lesions and death. In older children and adults, particularly the ones that have been vaccinated or contracted the disease, it is not as severe and is characterized by a chronic cough.

On the first part of the XXth century, the prevalence was very high with 1% of the population suffering each year, and in most cases affecting young children. In the 1940s, vaccination considerably decreased prevalence, but nevertheless the disease remained. Since the end of the 1990s, there was a dramatic increase in the number of cases in developed countries performing vaccination. In 2004, 25 827 cases were reported in the USA, the highest number since 1959. Similar observations were made in Canada and Europe. The World Health organization estimates 50 million cases each year in the world, with 350 000 deaths, with a prevalence in all group ages. In most cases, *Bordetella pertussis* is the causing agent. 3% to 35% are caused by *Bordetella parapertussis*, which is responsible of a mild form of the disease similar to whooping cough. Although the causes of the reappearance of *Bordetella pertussis* infections is not clear, experts agree overall that the immunity conferred by the vaccine declines after 7 to 10 years, explaining disease during teenage years. These individuals could transmit the disease to newborn within the family.

Different techniques, including cultures, serology, and PCR are available for diagnosis. Culture is the technical reference with a specificity of 100%, but with a lower sensitivity. Culture can have 56% sensitivity at the beginning of the disease but decreases with time and is lower for patients that had an antimicrobial treatment or prior vaccination. *B. pertussis* culture requires a specific medium and the growth takes 7 to 14 days, much too long for acute cases. Serology uses a comparison between serum of the patient in the acute phase and recovery and requires at least 4 weeks interval, preventing initial diagnosis.

Specific serology for IgG antitoxins have been developed but samples must be taken 2 weeks after start of the symptoms. Other serology tests exist on the market but have not been validated and cannot discriminate between a recent infection, old infection or vaccination.

PRINCIPLE OF DETECTION

The *Bordetella pertussis/parapertussis* Eurobioplex test uses real time polymerase chain reaction (PCR) amplification, that simultaneously in one reaction, detects *Bordetella pertussis* (target region IS481) and *Bordetella parapertussis* (target region IS1001) from a nucleic acid extract as well as a human cellular control (b actin). The specific probe for *B. pertussis* is labelled with the FAM fluorophore. The specific probe for *B. parapertussis* is labeled with the HEX fluorophore. The specific probe for the cellular control is labeled with the Cy5 fluorophore. All emit fluorescence when hydrolyzed during the elongation of the amplification product of the internal control. Fluorescence measurements over time is correlated to accumulation of amplified products.

DESCRIPTION AND CONTENT OF THE KIT

The Real time PCR Eurobioplex *Bordetella* kit is ready for use for the specific detection of *B. pertussis* and *B. parapertussis* and human cellular control. Fluorescence is emitted and individually recorded through optical measurements during the PCR. The detection of the amplified fragment is performed by a fluorimeter using the channels shown in Table 1 below.

The kit contains reagents and enzyme for the amplification of *B. pertussis* and *B. parapertussis* DNA and human cellular control (Table 1).

Table 1:

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
<i>B. pertussis</i>	FAM	495 nm	515 nm
<i>B. parapertussis</i>	HEX	535 nm	555 nm
Human Cellular Control	Cy5	647 nm	667 nm

Equivalent channels on different PCR instruments:

- Channel **FAM** (ABI Systems, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systems Mx, T-COR8®-IVD), Channel 530 (LC 480), Channel Green (RotorGene)
- Channel **HEX** (Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), Channel VIC (ABI Systems), Channel Alexa532 (SmartCycler II), Channel 580 (LC 480), Channel Yellow (RotorGene),
- Channel **Cy5** (ABI Systems, Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), Channel 660 (LC 480), Channel Alexa647 (SmartCyclerII), Channel Red (RotorGene)

Note: On LC480 instrument II, apply color compensation for the following channels: FAM-HEX/VIC- (465-510, 533-580).

Table 2:

Cap color	Components	24 reactions	48 reactions	96 reactions
-----------	------------	--------------	--------------	--------------

Red	ENZYME	4 x 100µL	2 x 375µL	4 x 375µL
Transparent	OLIGOMIX	4 x 60µL	2 x 210µL	4 x 210µL
Yellow	Positive control (<i>Bordetella</i> +human) (CP)	4 x 40µL	2 x 40µL	4 x 40µL
Blue	Water=negative control(CN-H ₂ O)	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

Required material not provided:

- ◇ Biological Hood
- ◇ Real time PCR instrument
- ◇ Micro centrifuge
- ◇ Vortex
- ◇ Plates / tubes for Real time PCR
- ◇ Micropipettes
- ◇ DNase-free RNase free filter tips for micropipettes
- ◇ Sterile microtubes
- ◇ Powder-free gloves

STORAGE

All reagents must be stored between -15°C and -20°C.

All reagents can be used until the expiration date indicated on the kit.

Many freezing/thawing cycles (> 3x) must be avoided, and could lead to decrease in sensitivity.

CAUTIONS AND NOTES

Read carefully instructions before starting.

- ◇ The experiment must be performed by competent staff.
- ◇ Instruments must have been properly installed, calibrated and maintained according to the manufacturer's recommendations.
- ◇ Clinical samples are potentially infectious and must be processed under a laminar flow hood.
- ◇ The experiment must be performed according to good laboratory practices.
- ◇ Do not use this kit after expiration date.
- ◇ The kit is shipped with dry ice, and the components of the kits must arrive frozen. If one or more components are defrosted, or if the tubes have been damaged, contact Eurobio-Scientific.
- ◇ Once defrosted, spin down briefly the tubes before use.
- ◇ It is recommended to define three distinct working areas: 1) Isolation of DNA, 2) Preparation of the reaction mix and 3) Amplification / Detection of amplified products.
- ◇ Pipettes, reagents and other materials must not cross each area.
- ◇ Specific caution is required to preserve the purity of the reagents and reaction mixtures. The use of powder-free gloves is mandatory.
- ◇ Appropriate methods of preparation/extraction of DNA to produce high quality DNA and to be followed by a real-time PCR application should be used, particularly avoiding all sources of DNase contamination.
- ◇ Always use filtered tips for micropipettes.
- ◇ Use specific lab coat and powder-free gloves in each working area.
- ◇ Do not pipette with mouth and do not eat, drink or smoke in the area.
- ◇ Avoid sprays.

COLLECTION OF SAMPLES, TRANSPORT AND STORAGE

- ◇ Collect samples in sterile tubes.
- ◇ Do not use calcium alginate swabs, as they may contain substances that inhibit PCR testing.
- ◇ It is the responsibility of the user to master its own conditions of collection, transport and storage of samples, and extraction of DNA by suitable systems to produce DNA of good quality.
- ◇ The samples should be extracted immediately or stored following the recommendations in the table below (Table 3).

Table 3 :

Recommendations of maximum storage of samples before extraction	
Room temperature	2 h
4°C	16h
-20°C	Long term storage

- ◇ The user can refer to the World Health Organization or High Health Authority for storing samples.
- ◇ Transport of clinical samples must follow local regulations for this type of infectious agents

PROCEDURE

I- DNA extraction

It is the user's responsibility that the extraction system used be compatible with downstream real time PCR technology. For this kit, we recommend to use extraction methods of bacterial DNA from nasopharyngeal aspirations, and refer to manufacturer's instructions of the extraction kit.

Note: It is not necessary to add the human cellular control at the extraction step. The human cellular control on the Cy5 channel ensures that a negative result is not due to a bad DNA extraction resulting from no extraction or the presence of PCR inhibitors and to check the quality of samples collection.

Note: Acceptable specimen types include nasopharyngeal swabs (NPS) in liquid media (e.g. UTM®, eSwabs® ...).

II- REAL-TIME PCR

General comment:

The *Bordetella* positive control contains a very high concentration of DNA. Manipulations must be performed with caution to avoid contamination.

II-1/ CONTROLS OF THE REAL-TIME PCR

To control the steps of extraction and real-time PCR amplification, it is necessary to test a positive control (CP) and a negative control (PCR water: CN-H₂O). See II-2/ Real Time PCR protocol for details.

II-2/ REAL-TIME PCR PROTOCOL

Diagram of the procedure

1 - PREPARATION OF THE MASTERMIX

Number of reaction(s)	N+3*
Enzyme	(N+3)x12.5 µl
Oligomix	(N+3)x7.5 µl
Total Volume Mastermix	(N+3)x20 µl

* N+1 on T-COR 8®-IVD



2 - PREPARATION OF THE CONTROLS AND REACTIONS

Sample

20 µl Mastermix
+
5µl DNA sample

Positive Control

20 µl Mastermix
+
5µl CP

Negative Control

20 µl Mastermix
+
5µl water supplied (CN-H2O)



3 – REAL TIME PCR INSTRUMENT (except T-COR 8®-IVD - automatic program using Barcodes- see page 37-43)

Program	Temperature	Duration	Cycle(s)	
Denaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Acquisition de fluorescence

Detailed Procedure

- 1) Homogenize the enzyme tube and vortex Oligomix and CP and centrifuge briefly.
- 2) Prepare Mastermix as below, N= number of reaction(s). Prepare Mastermix amount for a minimum of N+3 reactions (see part 1) of scheme above).

Number of reaction(s)	N+3*
Enzyme	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix	(N+3) x 7.5 µl
Total Volume Mastermix	(N+3) x 20 µl

* For use on T-COR 8®-IVD, we recommend a Master Mix for N + 1 reactions for one-shot use of the kit

- 3) Mix mastermix prepared in 2) and centrifuge briefly
- 4) Distribute 20 µL Master mix using a micropipette and filtered sterile tips in each tube/well of microplate for real time PCR.
- 5) Add 5 µL of extracted DNA.
- 6) In parallel, test the following controls:
 - Positive control:
 - 20µL of mastermix + 5µL of CP
 - Negative control:
 - 20 µL mastermix + 5 µL water supplied (CN-H2O)
- 7) Close immediately with an adhesive film or transparent caps to avoid all contamination.
- 8) Centrifuge briefly to collect all the PCR reaction mix at the bottom of the tubes or plate.
- 9) Program the Real time PCR instrument as follows (except T-COR 8®-IVD - automatic program using Barcodes- see page 37-43)
Approximate duration is 1h:

Program	Temperature	Duration	Cycle(s)	
Denaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Acquisition of fluorescence

Note 1: On Light Cycler ® 480 systems (Roche), two optical systems are available: only "System II" is compliant with use of the kit. Apply color compensation for the FAM and HEX/VIC wavelengths (465-510, 533-580).

Note 2: For the Applied Biosystems systems, select "ROX" in "PASSIVE REFERENCE".

Note 3: On Rotorgene™, please calibrate the signal by clicking on "GAIN optimization".

VALIDATION OF THE EXPERIMENT**

If a signal appears in the negative control at the end of the cycle, the threshold must be positioned just above the negative signal's maximum signal. For the assay to be valid, the Ct values for the controls must be the following (Table 4). Outside of these values, the experiment is not valid. On T-COR 8®-IVD, we recommend that the positive and negative controls be tested when a new kit is being opened.

Table 4:

Controls	NC	CP
FAM	Ct >38 or not determined	Ct ≤ 30
HEX	Ct >38 or not determined	Ct ≤ 30
Cy5	Ct not determined or determined*	Ct <35

* Note: Ct could be determined in Cy5 channel in the negative control and it does not invalidate the run. The presence of human cellular gene in negative control could be operator dependent.

** On T-COR 8®-IVD, interpretation is automatically generated with Barcodes.

DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION

1/ A signal (< 38 Ct) detected on channel FAM -> **The result is positive: the sample contains DNA from *Bordetella pertussis*.** For competition reasons, the signal of the internal human control on channel Cy5 can be strongly decreased (even undetectable) in presence of large amounts of *Bordetella pertussis* DNA.

2/ A signal (< 38 Ct) detected on channel HEX -> **The result is positive: the sample contains DNA from *Bordetella parapertussis*.** For competition reasons, the signal of the internal human control on channel Cy5 can be strongly decreased (even undetectable) in presence of large amounts of *Bordetella parapertussis* DNA.

3/ No signal on channels FAM or HEX (or signal > 38 Ct) and, at the same time, a positive signal on channel Cy5 -> **The sample does not contain DNA from *Bordetella pertussis* nor DNA from *Bordetella parapertussis*. The sample can be considered negative.**

4/ No signal on channels FAM or HEX or Cy5 (or signal > 38 Ct) -> **No diagnosis can be given.** DNA extraction was inhibited. It is recommended to dilute the DNA or redo a DNA extraction of the sample.

PERFORMANCES ANALYSIS

➤ Detection threshold:

Bordetella Pertussis: 100 copies/μL on positive control

Bordetella Parapertussis: 100 copies/μL on positive control

➤ Reproducibility (coefficient of variation):

Reproducibility of Ct within experiment:

B.Pertussis: 1.65%; ***B.Parapertussis***:1.61%

Reproducibility of Ct between batch:

B.Pertussis: 5.586%; ***B.Parapertussis***: 5.396%

Example:

The table below indicates mean Ct values for the IS481 plasmid:

dilutions	Ct parapertussis	SD	Coefficient of variation (%)
dilution 1	25,50	0,59	2,31
dilution 2	25,76	0,60	2,32
dilution 3	26,46	0,28	1,06

The table below indicates mean Ct values for the IS1001 plasmid:

dilutions	Ct parapertussis	SD	Coefficient of variation (%)
dilution 1	25,65	0,55	2,15
dilution 2	25,88	0,26	1,00
dilution 3	28,80	0,18	0,63

➤ **Sensitivity and specificity for *Bordetella Pertussis* and *Bordetella Parapertussis*:**

Study 1: In total 87 pretested samples were used to determine the performance of the kit including: 60 pretested positive for *B.Pertussis*, 2 pretested positive for *Bordetella Holmesii*, 26 pretested positive for *B.Parapertussis*. Samples pretested positive for *B.Pertussis* were negative for *B.Parapertussis* and conversely, except one sample co infected.

<i>Bordetella Pertussis</i>		EBX-001	
		POS	NEG
Pre-tested	POS	58	2
	NEG	0	22
<i>Bordetella Parapertussis</i>		EBX-001	
		POS	NEG
Pre-tested	POS	22	1
	NEG	0	59

Specificity: 100%.

No cross reactivity was observed between *B. Pertussis* and *B.Parapertussis*.

This test does not distinguish between infection by Bordetella pertussis and Bordetella holmesii. Both germs contain the IS481 gene. The incidence of Bordetella holmesii in clinical specimens has been reported to be very low (<0.5%), and it is still unclear whether Bordetella holmesii can cause respiratory disease in otherwise in good health.

Thereby the two positive sample for B. Holmesii were positive on the Bordetella Pertussis target.

Sensitivity:

96.7% samples pretested for *Bordetella Pertussis* were detected, 91.7% with a Ct less than 38.

95.6% samples pretested for *Bordetella Parapertussis* were detected.

Study 2: Comparison between Focus *Bordetella* Simplexa and Eurobioplex PCR:

Tests were performed on 20 clinical samples from respiratory swabs previously tested by the laboratory routine test (Focus *Bordetella* Simplexa), with the EurobioPlex *Bordetella pertussis/Bordetella parapertussis* on Smartcycler II ® (Cepheid).

Reference PCR	Eurobioplex PCR			
		Positive	Negative	Total
	Positive	11	0	11
	Negative	0	9	9
	Total	11	9	20

Sensitivity and Specificity between the 2 techniques are 100%.

Study 3: Quality control report from Reference Center Pasteur Institute CQBORD-2012:

The quality controls from Reference Center are composed of 6 tubes. Tests are performed on LC480® (Roche).

CQ-2012	Ct IS481	Ct IS1001
CQ1	24,1	-
CQ2	-	33,7
CQ3	27,1	-
CQ4	33	-
CQ5	-	-
CQ6	22,7	-

The results are consistent with expected results from Reference Center.

SPECIFICITIES OF THE REAL-TIME PCR T-COR 8®-IVD INSTRUMENT

T-COR 8®-IVD is a real-time PCR instrument with 8 independent wells, which can be programmed independently, patient by patient, regarding thermic protocol, assays, and time of start of the run.

The 8 wells can also be used simultaneously with the same assay.

Note: Mix the sample by pipetting up and down, and avoiding to make bubbles

Controls

On T-COR 8®-IVD, we recommend that the positive and negative controls be tested when a new kit is being opened.

After this initial control, the cellular control/Human DNA allows to check that the PCR is working properly, without PCR inhibition and that sample extraction work well.

Patients' Tests

<i>With validation of positive and negative controls once, during first use of the kit.</i>	24 reactions
Number of possible patients tests, patient by patient, with a maximum of 12 freezing/thawing cycles (3 times per tube/4 tubes per reagent)	12 patients

Fluorophores

Four combinations of fluorophores are available on T-COR 8®-IVD.

For all EBX, such as EBX-001, FAM/HEX/Texas Red/Cy5 combination is used. If some channels are not used, do not consider this channel for results analysis.

Use of Barcodes (available on page 41 to 43)

- 1- Select Menu > New Run
- 2- Select Barcode
- 3- Scan the appropriate Barcode on the right side of the instrument:
 - For the positive control (Barcode EBX-001 Pos Ctrl),
 - For the negative control (Barcode EBX-001 Neg Ctrl),
 - For a patient sample (Barcode Assay: EBX-001)

The instrument randomly selects one of the 8 available wells. Follow the instructions

on the instrument.

4- Lift up the lid of the selected well (well x), check that the blue LED light is on, and select "Yes"

5- Place the tube in the corresponding well and select "Next".

6- If you wish to name the sample (optional), select "sample x", name it and select "Accept".

7- Select "Next"

8- To add/test another control or sample, select « Add well » and go back to point 3-.

9- Select "Start run".

Note: The name of a sample or of a run cannot be modified or added after the run is finished. It must be done before or during the run.

Presentation and Interpretation of results

Ct values and amplification curves are available in the SmartCT™ Table (Ct values on each channel), and "Ct versus PCR cycles" graphs, both being available in real-time while the run is ongoing.

An automatic analysis for positive and negative controls as well as patients' samples is available in "Interpretations", at the end of the run, in the "View" window.

For positive and negative controls, the following results are possible:

« Neg Ctrl Fail »: Not valid

« Neg Ctrl Valid »: Valid

« Pos Ctrl Fail »: Non valid

« Pos Ctrl Valid »: Valid

For patients status:

"Detected": Positive for at least one target * → green box

"Not detected": Negative → red box

* The results for the specific bacteria are specified.

CAUTION !

When the box is green, it is important to read the status for each target as some targets may be negative.

« Invalid »: Invalid result -> retest → orange box

Example of automatic interpretation of results on T-COR 8®-IVD instrument screen and associated report:

- For valid positive and negative controls, « Detected » for its corresponding targets, for an invalid positive control to retest, for four negative samples for the two targets mentioned as “Not Detected” (samples 1 to 4) and for one positive samples for only one target indicated “Detected B.pertussis and B.parapertussis: not detected” (samples 871):

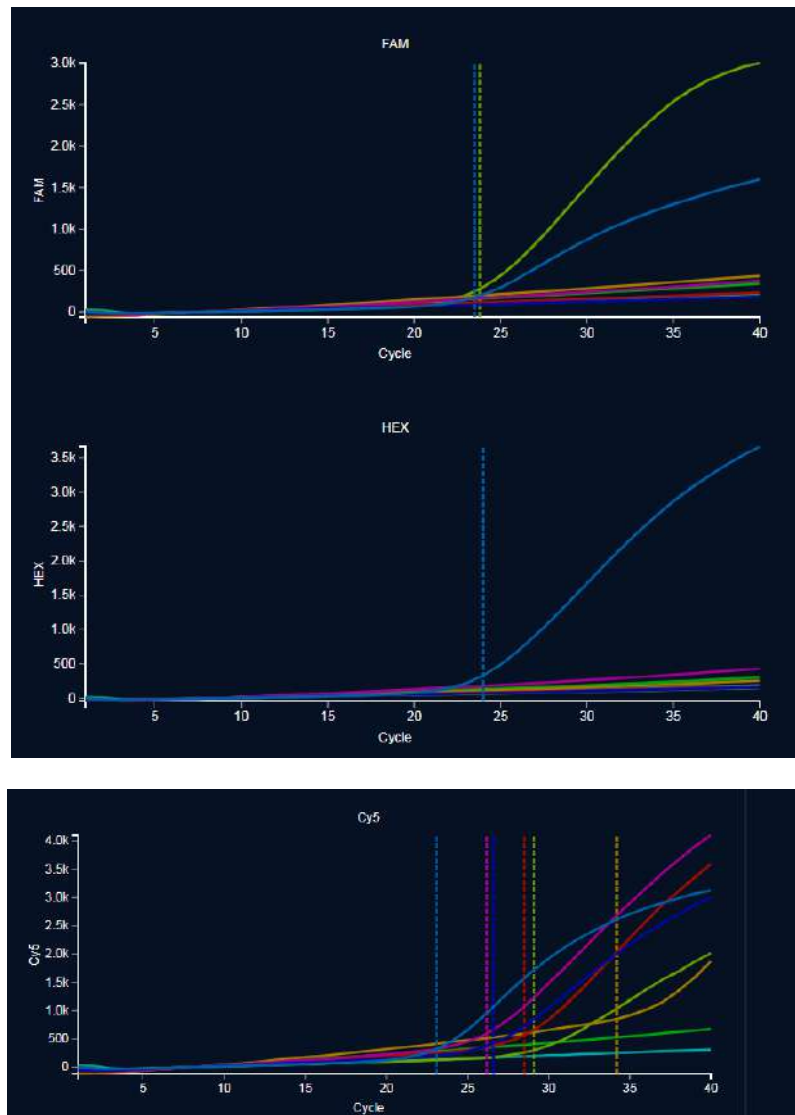
❖ On the instrument screen:

		Interpretations	
1	CP	EBX-001 Pos Ctrl	
		Invalid - Pos Ctrl Fail	
2	NTC	EBX-001 Neg Ctrl	
		Detected: Neg Ctrl Valid	
3	871	EBX-001	
		Detected: B. pertussis - B. parapertussis not detected	
4	Ech 1	EBX-001	
		Not Detected - B. parapertussis, B. pertussis	
5	ECH 2	EBX-001	
		Not Detected - B. parapertussis, B. pertussis	
6	ECH 3	EBX-001	
		Not Detected - B. parapertussis, B. pertussis	
7	ECH 4	EBX-001	
		Not Detected - B. parapertussis, B. pertussis	
8	CP	EBX-001 Pos Ctrl	
		Detected: Pos Ctrl Valid	

❖ On the report:

Résumé							
	Puits	Échantillon	Dosage	FAM	HEX	TxR	Cy5
1	CP	EBX-001 Pos Ctrl					
2	NTC	EBX-001 Neg Ctrl					
3	871	EBX-001	23.8			29.1	
4	Ech 1	EBX-001				34.2	
5	ECH 2	EBX-001				28.5	
6	ECH 3	EBX-001				26.2	
7	ECH 4	EBX-001				26.6	
8	CP	EBX-001 Pos Ctrl	23.5	24.0		23.1	

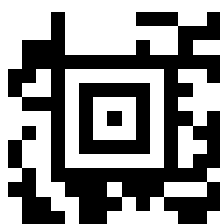
Example of amplification curves:



Barcodes for EBX-001 for use on T-COR8®-IVD

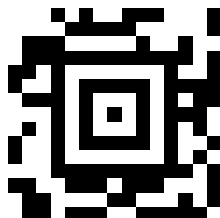
EBX-001 Pos Ctrl

Positive Control CP

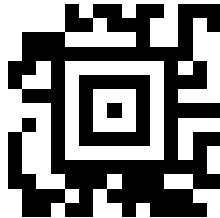


EBX-001 Neg Ctrl

Water = Negative Control (CN-H2O)



Assay: EBX-001



BIBLIOGRAPHY

Fry N.K., Duncan J., Wagner K., Tzivra O., Doshi N., Litt D.J., Crowcroft N., Miller E., George R.C., Harrison T.G. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. *J. of Medic. Microbiol.* 2009, 58, 1023-1029.

Walsh P., Overmeyer C., Kimmel L., Feola M., Pusavat J., Nguyen T.A., Kuan S., Emery K., Rosengreen M., Mordechai E., Adelson M.E. Prevalence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in Samples Submitted for RSV Screening. 2008, Vol IX, No 3, 135-140.

Watanabe M., Connelly B., Weiss A.A. Characterization of Serological Responses to Pertussis. *Clin. And Vacc. Imm.* 2006, Vol 13, No 3, 341-348.

Guiso N., Bassine L., Reinert P. Coqueluche du nourrisson, de l'enfant et de l'adulte. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 4-355-A-05 (2004).

Grimprel E. La coqueluche en pratique en 2007. *Archives de pédiatrie* 14 (2007) 306–309.

Pinquié D., Dumesnil C., Galène-Gomez S., Marret S., Marpeau L. Who is it necessary to vaccinate against whooping-cough? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 35 (2007) 1064–1068.

Roorda L., Buitenwerf J., Osseward J.M., Van der Zee A. A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant *Bordetella* species by the presence and distribution of three Insertion Sequence elements. *BMC Research Notes* 2011, 4:11.

Bidet P., Liguori S., De Lauzanne A., Caro V., Lorrot M., Carol A., Faye A., Guiso N., Bingen E., Bonacorsi S. Real-Time PCR Measurement of Persistence of *Bordetella pertussis* DNA in Nasopharyngeal Secretions during Antibiotic Treatment of Young Children with Pertussis. *J. of Clin. Microbiol.* 2008, Vol 46, No 11, 3636-3638.

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

WASTE ELIMINATION

Be in accordance with the law on the elimination of waste of clinical infectious material.

SYMBOLS

	Reference
	Batch number
	Highest storage temperature
	Expiration Date
	Content sufficient for « N » reactions
	Keep protected from light
	Manufacturer
	CE labeled product
	In Vitro Diagnostic
	Instructions for use




SCIENTIFIC
 7 avenue de Scandinavie
 ZA de Courtabœuf
 91940 Les Ulis
 FRANCE

EurobioPlex

Bordetella Pertussis et Parapertussis PCR EN TEMPS REEL

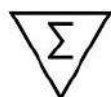
Pour la PCR **qualitative** en temps réel

REF

EBX-001-UN

EBX-001-48

EBX-001-24



24/48/96 réactions



Version 6.03 du 13/11/2024

Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Biorad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Biorad)
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) avec T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software

Réactifs compatibles avec les systèmes de PCR en temps réel suivants :

Applied Biosystems Prism® 7500; qTOWER 2.2; Cepheid Smart Cyclyer II®;
Qiagen Rotor-Gene 3000/6000; Stratagene MX3005P*; Bio-rad Chromo4;
Roche LightCycler 480.

* en cours

Conditions de stockage:

Conserver tous les réactifs entre -15°C et -22°C jusqu'à utilisation et après première utilisation



Mode d'emploi

Disponible sur demande à l'adresse suivante : info@eurobio-scientific.com

SOMMAIRE

ENGLISH.....	1
FRANÇAIS.....	23
DEUTSCH.....	46
UTILISATION	25
INTRODUCTION	25
PRINCIPE DE LA DETECTION	26
DESCRIPTION ET CONTENU DU KIT	26
CONSERVATION.....	27
PRECAUTIONS ET NOTES	28
COLLECTE DES ECHANTILLONS, TRANSPORT ET CONSERVATION.....	28
PROCEDURE.....	29
VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION**	33
ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION	33
ANALYSE DES PERFORMANCES	34
PARTICULARITES LIEES A L'INSTRUMENT DE PCR en temps reel T-COR 8®-IVD	37
BIBLIOGRAPHIE.....	44
ELIMINATION DES DECHETS	44
SYMBOLES	45

UTILISATION

Le test *Bordetella pertussis/parapertussis* est un test d'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel conçu pour la détection qualitative de la présence ou l'absence de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella parapertussis* dans un extrait d'acides nucléiques ADN. Le test est indiqué pour poser un diagnostic de présomption d'infection par *Bordetella pertussis* ou par *Bordetella parapertussis* chez l'homme. L'extrait d'ADN est le matériel de départ pour le kit Eurobioplex *Bordetella pertussis/parapertussis*

L'Eurobioplex *Bordetella pertussis/parapertussis* a été validé sur le type de prélèvement suivant :

- Aspiration nasopharyngée

Ce système d'amplification a été validé sur 107 prélèvements d'aspirations nasopharyngées et 6 contrôles de qualité d'un Centre National de Référence.

INTRODUCTION

La coqueluche est une maladie très contagieuse de l'appareil respiratoire provoquée par de petites bactéries Gram négatif, *Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis*. Cliniquement, elle se présente comme une toux persistante, et les patients ayant la forme habituelle de la maladie ont souvent des épisodes de toux violente qui peuvent être suivis d'une reprise inspiratoire sifflante et bruyante (« chant du coq ») et de vomissements. Dans les cas graves, observés le plus souvent chez les nourrissons, ces symptômes peuvent entraîner une hypoxie, des lésions permanentes du cerveau ou le décès. Chez des enfants plus âgés et des adultes, en particulier ceux qui ont déjà été vaccinés ou ont eu précédemment la maladie, cette dernière peut être moins grave et se présenter comme une toux prolongée.

Durant la première moitié du XX^{ème} siècle, la prévalence de la coqueluche était très élevée, touchant environ 1% de la population chaque année et la majorité des cas décrits survenant chez de jeunes enfants. L'introduction des vaccins cellulaires (vaccins entiers) anticoquelucheux dans les années 1940 a entraîné une diminution impressionnante du nombre de cas. Toutefois, une incidence de bas niveau de la maladie a persisté. Depuis la fin des années 1990, il y a eu une augmentation marquée du nombre de cas de coqueluche déclarés dans les pays développés ayant pourtant des taux de vaccination élevés. En 2004, 25 827 cas ont été décrits aux États-Unis, ce qui en a fait l'année comptant le plus grand nombre de cas déclarés depuis 1959. Des augmentations comparables ont été observées au Canada et en Europe. L'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'il y a 50 millions de cas de coqueluche chaque année dans le monde, responsables de 350 000 décès. La coqueluche peut être détectée à tout âge (nouveau-nés, enfants, adolescents et adultes). Une grande majorité de ces cas est provoquée par *Bordetella pertussis*. Cependant, un petit pourcentage de tous les cas de coqueluche, environ 3 à 35%, est provoqué par *Bordetella parapertussis*, responsable d'une forme mineure d'une maladie semblable à la coqueluche. Bien que la cause exacte de la résurgence des cas de coqueluche provoqués par *Bordetella pertussis* ne soit pas clairement identifiée, les spécialistes estiment dans l'ensemble que l'immunité conférée par le vaccin s'estompe après 7 à

10 ans. Ainsi, les enfants vaccinés pourraient devenir sensibles à la maladie pendant leur adolescence, contracter la maladie et la transmettre à de très jeunes nourrissons au sein du foyer.

Plusieurs techniques de laboratoire, incluant les cultures, la sérologie, et la PCR, sont disponibles pour poser le diagnostic de la coqueluche. La culture est la technique de référence avec une spécificité de 100%; toutefois, sa sensibilité est beaucoup plus faible. La sensibilité de la culture peut atteindre 56% au début de la maladie mais elle diminue au fil du temps et est plus faible chez les patients qui ont reçu un traitement antimicrobien ou une vaccination antérieure. L'isolement de *B. pertussis* en culture nécessite un milieu particulier et la croissance peut nécessiter 7 à 14 jours, ce qui est trop long pour la prise en charge des cas aigus. La sérologie utilise une comparaison par paire du sérum du malade en phase aiguë et en phase de convalescence, et nécessite un intervalle d'au moins 4 semaines entre les deux prélèvements. Elle ne peut donc pas être utilisée pour un diagnostic immédiat.

Des analyses sérologiques sur échantillon unique pour les IgG antitoxines coquelucheuses ont été créées à des fins de recherche mais les échantillons doivent être prélevés au moins deux semaines après l'apparition des symptômes. Des tests sérologiques de la coqueluche, utilisant des réactifs mis sur le marché, sont également disponibles mais ils n'ont pas été validés cliniquement et peuvent ne pas faire la différence entre une infection récente ou ancienne, ou une vaccination.

PRINCIPE DE LA DETECTION

L'Eurobioplex *Bordetella pertussis/parapertussis* est un test d'amplification de l'acide nucléique ADN de *Bordetella pertussis* (région cible IS481) et de *Bordetella parapertussis* (région cible IS1001) simultanément, ainsi que d'un contrôle cellulaire humain, qui utilise l'amplification par PCR en temps réel. Il est réalisé à partir de l'ADN extrait de l'échantillon au moyen d'une réaction unique dans un seul puits/tube.

L'ADN de *B. pertussis* et celui de *B. parapertussis* sont respectivement détectés à l'aide de sondes marquées FAM et HEX. Le contrôle cellulaire humain est détecté à l'aide d'une sonde marquée par le fluorochrome Cy5. Tous émettent une fluorescence spécifique suite à l'hydrolyse de leur sonde respective au cours de l'élongation du produit d'amplification. La mesure des intensités de fluorescence en temps réel est relative à l'accumulation des produits d'amplification spécifiques.

DESCRIPTION ET CONTENU DU KIT

Le kit de PCR en temps réel Eurobioplex *Bordetella* est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de *B. pertussis* et de *B. parapertussis*.

La fluorescence est émise et mesurée de façon individuelle par un système optique au cours de la PCR. La détection des fragments amplifiés est réalisée par un fluorimètre en utilisant les canaux indiqués dans le Tableau 1 ci-dessous.

Le kit contient les réactifs et l'enzyme nécessaires à l'amplification de l'ADN bactérien de *B. pertussis*, de *B. parapertussis*, et du contrôle cellulaire (Tableau 1).

Tableau 1 :

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
B. pertussis	FAM	495 nm	515 nm
B. parapertussis	HEX	535 nm	555 nm
Contrôle cellulaire ADN humain	Cy5	647 nm	667 nm

Canaux équivalents sur divers instruments de PCR :

-Canal **FAM** (Systèmes ABI, Chromo4/CFX96, SmartCycler II, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal 510 (LC 480), Canal Green (RotorGene)

-Canal **HEX** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 580 (LC 480), Canal Yellow (RotorGene),

-Canal **Cy5** (Systèmes ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Note : Sur LC480 instrument II : Appliquer une compensation de couleur recommandée par Roche pour les longueurs d'ondes FAM et HEX/VIC (465-510, 533-580).

Tableau 2 :

Couleur de Bouchon	Composants	24 réactions	48 réactions	96 réactions
Rouge	ENZYME	4 x 100 µL	2 x de 375µL	4 x de 375µL
Transparent	OLIGOMIX	4 x 60 µL	2 x de 210µL	4 x de 210µL
Jaune	Contrôle positif Bordetella / humain (CP)	4 x 40µL	2 x 40µL	4 x 40µL
Bleu	Eau biologie moléculaire = Contrôle négatif (CN-H ₂ O)	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

Matériel nécessaire non fourni:

- ◇ Hotte biologique
- ◇ Appareil de PCR en temps réel
- ◇ Centrifugeuse pour microtubes
- ◇ Vortex
- ◇ Plaques / tubes pour réaction de PCR en temps réel
- ◇ Micropipettes
- ◇ Embouts DNase-free et RNase-free à filtre pour micropipettes
- ◇ Microtubes stériles
- ◇ Gants (sans talc)

CONSERVATION

Tous les réactifs doivent être stockés entre -15°C et -22°C.

Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.

Plusieurs cycles de congélation / décongélation (> 3x) doivent être évités, cela pourrait réduire la sensibilité de l'analyse.

PRECAUTIONS ET NOTES

Lire attentivement ces instructions avant de débiter la procédure.

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par du personnel compétent.
- ◇ S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant
- ◇ Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux et doivent être préparés sous une hotte à flux laminaire.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée.
- ◇ Le kit est expédié sous carboglace, et les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plus des composants arrive décongelé, ou si les tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter Eurobio Scientific.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation de l'ADN, 2) Préparation du mélange réactionnel et 3) Amplification / Détection des produits amplifiés.
- ◇ Porter des blouses et des gants (sans talc) distincts dans chaque zone de travail.
- ◇ Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces zones.
- ◇ Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels. L'utilisation de gants (sans talc) est obligatoire.
- ◇ Des méthodes appropriées de préparation/extraction d'ADN pour une production d'ADN de qualité et une application de PCR en temps réel doivent être utilisées, notamment afin d'éviter tout risque de contamination avec les DNases.
- ◇ Utiliser toujours des embouts stériles à filtre DNase et RNase-free pour micropipettes.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Eviter les aérosols.

COLLECTE DES ECHANTILLONS, TRANSPORT ET CONSERVATION

- ◇ Collecter les échantillons dans des tubes stériles.
- ◇ Ne pas utiliser les écouvillons calcium alginate qui peuvent contenir des inhibiteurs de PCR.

- ◇ Il revient à l'utilisateur de maîtriser ses propres conditions de collecte, transport, conservation et extraction des échantillons pour que l'extraction d'ADN par des systèmes adaptés produise des ADN de qualité.
- ◇ Il est recommandé que les échantillons soient extraits immédiatement, ou conservés selon les recommandations de stockage des échantillons avant extraction (Tableau 3).

Tableau 3 :

Recommandations de stockage maximum des échantillons avant extraction	
Température ambiante	2 h
4°C	16h
-20°C	Stockage à long terme

- ◇ L'utilisateur peut se référer aux recommandations émises par l'Organisation Mondiale de la Santé ou par la Haute Autorité de Santé pour la bonne conservation des échantillons.
- ◇ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.

PROCEDURE

I- Extraction d'ADN

Il revient aux utilisateurs de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Pour le présent coffret, nous recommandons d'utiliser des méthodes d'extraction d'ADN de bactéries à partir d'échantillons d'aspirations nasopharyngées, et de se référer aux instructions du fournisseur du kit d'extraction utilisé.

Note : Il n'est pas nécessaire d'ajouter le contrôle cellulaire à l'extraction. Le contrôle cellulaire humain est marqué par le fluorochrome Cy5.

Il permet de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à une mauvaise préparation d'ADN et de vérifier la qualité du prélèvement.

Il n'est pas nécessaire de l'ajouter avant l'extraction, le contrôle humain amplifie le gène cellulaire de l'actine présent dans l'échantillon. Le Mastermix permet d'amplifier *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* et le contrôle cellulaire.

Note: Le kit est validé sur les écouvillons nasopharyngés en milieu liquide de type UTM®, eSwabs®, ...

II- Réalisation de la PCR temps réel

Remarque générale:

Le contrôle positif *Bordetella* contient une concentration élevée de matrice ADN. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination.

II-1/ CONTROLES DE LA PCR TEMPS REEL

Pour contrôler les étapes d'extraction et d'amplification de PCR en temps réel, il est nécessaire de tester un contrôle positif CP et un contrôle négatif (eau PCR-CN-H₂O) (voir II-2) du protocole de PCR temps réel).

II-2/ PROTOCOLE DE PCR TEMPS REEL

Schéma de la procédure

1 - PREPARATION MELANGE REACTIONNEL/MASTERMIX

Nombre de réactions	N+3*
Enzyme	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix	(N+3) x 7.5 µl
Volume total Mastermix	(N+3) x 20 µl

* N+1 sur T-COR 8®-IVD



2 - PREPARATION DES CONTROLES ET REACTIONS

Echantillon

20 µl de Mastermix
+
5µl échantillon ADN

Contrôle positif

20 µl de Mastermix
+
5µl CP

Contrôle Négatif

20 µl de Mastermix
+
5µl Eau biologie moléculaire (CN-H2O)



3 – INSTRUMENT PCR EN TEMPS REEL (sauf T-COR 8®-IVD- programmation automatique avec Codes-Barres- voir p.15 à 21)

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Dénaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Acquisition de fluorescence

Procédure détaillée

- 1) Homogénéiser le tube Enzyme et vortexer Oligomix et CP puis centrifuger.
- 2) Préparer le Mastermix comme ci-dessous, N étant le nombre de réaction(s), prévoir la quantité de Mastermix pour N+3 réactions minimum (se référer à la partie 1 du schéma précédent).

Nombre de réaction(s)	1	N+3*
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl
Volume total Mastermix	20 µl	(N+3) x 20 µl

* Pour une utilisation sur T-COR 8®-IVD, nous recommandons de faire un Master Mix pour N+1 réactions pour une utilisation au coup par coup du kit.

- 3) Homogénéiser le Mastermix préparé en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 20 µL du Mastermix à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre stériles dans chaque tube/puits de microplaque pour PCR en temps réel.
- 5) Ajouter 5 µL d'échantillon d'ADN extrait
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants :
 - Contrôle positif :
 - 20 µL de Mastermix + 5 µL de contrôle positif CP
 - Contrôle négatif :
 - 20µL de Mastermix + 5µL d'eau fournie (CN-H2O)
- 7) Fermer immédiatement avec un film adhésif ou bouchons transparents pour éviter toute contamination.
- 8) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.
- 9) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de PCR en temps réel. (sur T-COR 8®-IVD aucune programmation manuelle n'est nécessaire grâce aux Codes-Barres- voir page 15 à 21).
Durée approximative : 1h.

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Dénaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Acquisition de fluorescence

Note 1 : Sur LightCycler® 480 (Roche), deux systèmes optiques existent : seul le « System II » est compatible avec l'utilisation du kit. Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs d'ondes FAM et HEX/VIC (465-510, 533-580).

Note 2 : Pour les appareils de la gamme Applied Biosystems, sélectionner « ROX » dans « PASSIVE REFERENCE ».

Note 3 : Sur Rotorgene™, calibrer le signal en cliquant sur « GAIN OPTIMISATION ».

VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION**

Si un signal apparaît dans le contrôle négatif en fin de cycle, le seuil doit être positionné juste au-dessus du maximum de signal du contrôle négatif.

Pour que le dosage soit valide, les valeurs de Ct pour les contrôles doivent être les suivantes (Tableau 4). En dehors de ces valeurs, l'expérimentation ne peut être validée. Sur T-COR 8®-IVD, nous recommandons que ces contrôles soient réalisés lors de la première utilisation d'un nouveau kit.

Tableau 4 :

Contrôles	CN	CP
FAM	Ct >38 ou indéterminé	Ct ≤ 30
HEX	Ct >38 ou indéterminé	Ct ≤ 30
Cy5	Ct non déterminé ou déterminé*	Ct <35

*Remarque : Un Ct peut être déterminé en Cy5 dans le témoin négatif et il n'invalide pas la série. La présence du gène cellulaire dans le témoin négatif peut être manipulateur dépendant.

**Sur T-COR 8®-IVD, l'interprétation est automatiquement générée avec les codes-barres.

ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

1) Un signal (< à 38 Ct) est détecté sur le canal FAM -> **Le résultat est positif : l'échantillon contient de l'ADN de *Bordetella pertussis*.** Pour des raisons de compétition, le signal du contrôle interne détecté sur le canal Cy5 peut être fortement affecté (voire indétectable) en présence de fortes quantité d'ADN de *Bordetella pertussis*.

2) Un signal (< à 38 Ct) est détecté sur le canal HEX -> **Le résultat est positif : l'échantillon contient de l'ADN de *Bordetella parapertussis*.** Pour des raisons de compétition, le signal du contrôle interne détecté sur le canal Cy5 peut être fortement affecté (voire indétectable) en présence de fortes quantité d'ADN de *Bordetella parapertussis*.

3) Aucun signal sur le canal FAM ou HEX (ou signal > à 38 Ct) et, dans le même temps, un signal positif du contrôle cellulaire sur le canal Cy5 -> **L'échantillon ne**

contient ni ADN de *Bordetella pertussis* ni de *Bordetella parapertussis*. L'échantillon peut être considéré comme négatif.

4) Aucun signal sur les canaux FAM ou HEX ou Cy5 (ou signal > 38 Ct) -> **Aucun diagnostic ne peut être donné**. L'extraction de l'ADN a été inhibée. Il est recommandé de diluer l'échantillon ou de refaire une extraction de l'ADN.

ANALYSE DES PERFORMANCES

➤ Limite de détection:

Bordetella Pertussis: 100 copies/μL de contrôle positif

Bordetella Parapertussis : 100 copies/μL de contrôle positif

➤ Reproductibilité (coefficient de variation) :

La reproductibilité des Ct INTRA-expérience:

B.Pertussis : 1.65% ; ***B.Parapertussis*** :1.61%

La reproductibilité des Ct INTER-lots:

B.Pertussis : 5.586% ; ***B.Parapertussis*** :5.396%

Exemple :

Le tableau ci-dessous indique les Ct obtenus en moyenne pour le plasmide IS481

dilutions	Ct pertussis	Ecart type	Coefficient de variation (%)
dilution 1	25,65	0,59	2,31
dilution 2	25,76	0,60	2,32
dilution 3	26,46	0,28	1,06

Le tableau ci-dessous indique les Ct obtenus en moyenne pour le plasmide IS1001

dilutions	Ct parapertussis	Ecart type	Coefficient de variation (%)
dilution 1	25,65	0,55	2,15
dilution 2	25,88	0,26	1,00
dilution 3	28,80	0,18	0,63

➤ **Sensibilité et spécificité pour *Bordetella Pertussis* et *Parapertussis* :**

Etude 1 : Au total 87 échantillons prétestés ont été utilisés pour déterminer les performances du kit dont 60 échantillons prétestés positifs pour *B. Pertussis*, 2 échantillons prétestés positifs pour *Bordetella Holmesii*, 26 prétestés positifs pour *B.Parapertussis*. Les échantillons positifs pour *Bordetella Pertussis* étaient négatifs pour *Bordetella Parapertussis* et inversement sauf pour un échantillon co-infecté.

<i>Bordetella Pertussis</i>		EBX-001	
		POS	NEG
Pretestés	POS	58	2
	NEG	0	22
<i>Bordetella Parapertussis</i>		EBX-001	
		POS	NEG
Pretestés	POS	22	1
	NEG	0	59

Spécificité : 100%.

Aucune cross-réactivité n'a été observée entre *Bordetella Pertussis* et *Bordetella Parapertussis*.

Ce test ne fait pas la distinction entre une infection par *Bordetella pertussis* et par *Bordetella holmesii*. Les deux germes contiennent le gène IS481. L'incidence de *Bordetella holmesii* dans les échantillons cliniques a été décrite comme étant très faible (< 0,5 %), et on ne sait toujours pas avec certitude si *Bordetella holmesii* peut provoquer une maladie de l'appareil respiratoire chez des sujets par ailleurs en bonne santé.

De ce fait, les deux échantillons positifs en *Bordetella Holmesii* sont sortis positifs sur la cible *Bordetella Pertussis*.

Sensibilité :

96.7% des échantillons *Bordetella Pertussis* ont été détectés, 91.7% ayant un Ct inférieur à 38.

95.6% des échantillons *Bordetella Parapertussis* ont été détectés.

Etude 2: Comparaison de la PCR Focus *Bordetella* Simplexa et la PCR Eurobio

Les tests ont été réalisés sur 20 échantillons issus de prélèvements respiratoires, préalablement testés par la technique de routine du laboratoire (Focus *Bordetella* Simplexa). Ils ont été ensuite testés avec le kit EurobioPlex *Bordetella pertussis/Bordetella parapertussis* sur le Smartcycler II ® (Cepheid) et comparés à la PCR de référence.

PCR Référence		PCR Eurobio		
		Positif	Négatif	Total
	Positif	11	0	11
	Négatif	0	9	9
	Total	11	9	20

La sensibilité, spécificité et concordance entre les 2 techniques est de 100%.

Etude 3 : Rapport d'essai du contrôle de qualité du CNR: l'institut Pasteur CQBORD-2012 :

Le panel du contrôle de qualité du CNR est composé de 6 tubes. Les essais ont été réalisés sur LC480® (Roche).

CQ-2012	Ct IS481	Ct IS1001
CQ1	24,1	-
CQ2	-	33,7
CQ3	27,1	-
CQ4	33	-
CQ5	-	-
CQ6	22,7	-

Les résultats concordent avec les résultats attendus par le CNR.

PARTICULARITES LIEES A L'INSTRUMENT DE PCR en temps reel T-COR 8®-IVD

T-COR 8®-IVD est un instrument de PCR en temps réel avec 8 puits programmables de façon indépendante qui peuvent être utilisés, patient par patient, indépendamment les uns des autres, du point de vue des tests / « Dosage/Assay » réalisés, des programmes thermiques, et du moment du lancement de la PCR.

Les 8 puits peuvent également être utilisés simultanément avec le même « Dosage/Assay ».

Note : Bien mélanger après dépôt de l'échantillon dans le tube avec allers-retours de pipetage, en évitant la formation de bulles.

Contrôles

Sur T-COR 8®-IVD, nous recommandons que le contrôle positif et le contrôle négatif soient testés lors de la première utilisation d'un nouveau kit.

Par la suite, le contrôle cellulaire/ADN humain permet de s'assurer qu'au sein de l'échantillon testé, il n'y a pas d'inhibition de la PCR, que l'extraction se soit bien déroulé et que la PCR fonctionne correctement.

Tests patients

<i>Avec validation des contrôles positif et négatif une seule fois lors de la première utilisation</i>	24 réactions
Nombre de tests patients possible patient par patient avec décongélation/congélation 12 fois maximum (3 fois par tubes/4 tubes par réactifs)	12 patients

Fluorophores

Il existe 4 combinaisons de fluorophores disponibles sur le T-COR 8®-IVD.

Pour tous les EBX, dont EBX-001, la combinaison FAM/HEX/Texas Red/Cy5 est celle choisie. Si certains canaux ne sont pas utilisés dans certains kits, ne pas en tenir compte lors de l'analyse des résultats.

Utilisation des Codes-Barres (disponibles en pages 19 à 21)

- 1- Sélectionner Menu > Nouvelle Analyse/New Run
- 2- Sélectionner Code-barres/Barcode
- 3- Scanner sur la droite de l'appareil le Code-Barre désiré :
 - soit pour le contrôle positif (Code-barre EBX-001 Pos Ctrl),
 - soit pour le contrôle négatif (Code-barre EBX-001 Neg Ctrl),
 - soit pour un échantillon (Code-Barre Assay : EBX-001)

L'instrument sélectionne automatiquement un des 8 puits disponibles. Suivre les instructions données par l'instrument.

- 4- Soulever le clapet du puits x sélectionné par l'appareil, et vérifier que la lumière LED bleue est allumée, puis sélectionner « Oui/Yes ».
- 5- Positionner le tube dans le puits correspondant et rabattre le clapet puis sélectionner « Suivant/Next ».
- 6- Si vous souhaitez le nommer (optionnel), sélectionner « échantillon x/sample x », et le nommer. Sélectionner « Accept ».
- 7- Sélectionner « Suivant/Next »
- 8- Pour ajouter/tester un autre contrôle ou échantillon, sélectionner « Ajouter un puits/Add well » et recommencer au point 3-
- 9- Sélectionner « Démarrer l'analyse/Start run »

Note : la nomination d'un échantillon ou du run ne peut être modifiée ou ajoutée après la fin du run. Elle doit être réalisée avant ou pendant que le run se déroule.

Présentation et Interprétation des résultats

Les résultats de Ct et les courbes d'amplification sont disponibles, à partir du Tableau Valeurs SmartCT™/SmartCT™ Table (valeurs de Ct attribuées sur chaque canal), et des graphes de Ct en fonction des cycles sur chaque canal, les 2 étant visualisables en temps réel sur la machine.

Une analyse pour les contrôles négatif et positif, ainsi que pour les échantillons est générée de façon automatique. Celle-ci est disponible dans « Interprétations/Interpretations », à la fin du run, dans la fenêtre « Vue/View ».

Pour le contrôle positif et le contrôle négatif, les résultats suivants sont possibles:

- « Neg Ctrl Fail » : Non valide
- « Neg Ctrl Valid » : Valide
- « Pos Ctrl Fail » : Non valide
- « Pos Ctrl Valid » : Valide

Détermination du statut pour les échantillons :

« Détecté(e-s)/Detected »: Positif pour au moins une cible * → **encadré vert**

« Non détecté/Not detected »: Négatif → **encadré rouge**

* Les bactéries détectés ou non détectés sont spécifiés.

ATTENTION !

Lorsque l'encadré est vert, il est important de lire le statut pour chaque cible dans la mesure où certaines cibles peuvent être négatives.

« Non valide/Invalid »: Résultat non valide -> retester → **encadré Orange**

Exemple de présentation d'interprétation automatique des résultats sur l'instrument et dans le rapport:

- Pour les contrôles négatif et positif valides indiqués « Detected /Détecté(e-s)», pour un CP Invalid/Non valide à retester, pour quatre échantillons négatifs pour les deux cibles, indiqués « Not Detected/Non Détecté » (échantillon 1 à 4) et pour un échantillon détecté pour l'une des cibles indiqués (Detected/Détecté(e-s) B.parapertussis/ B.parapertussis not detected/non détecté (e-s) (échantillon 871):

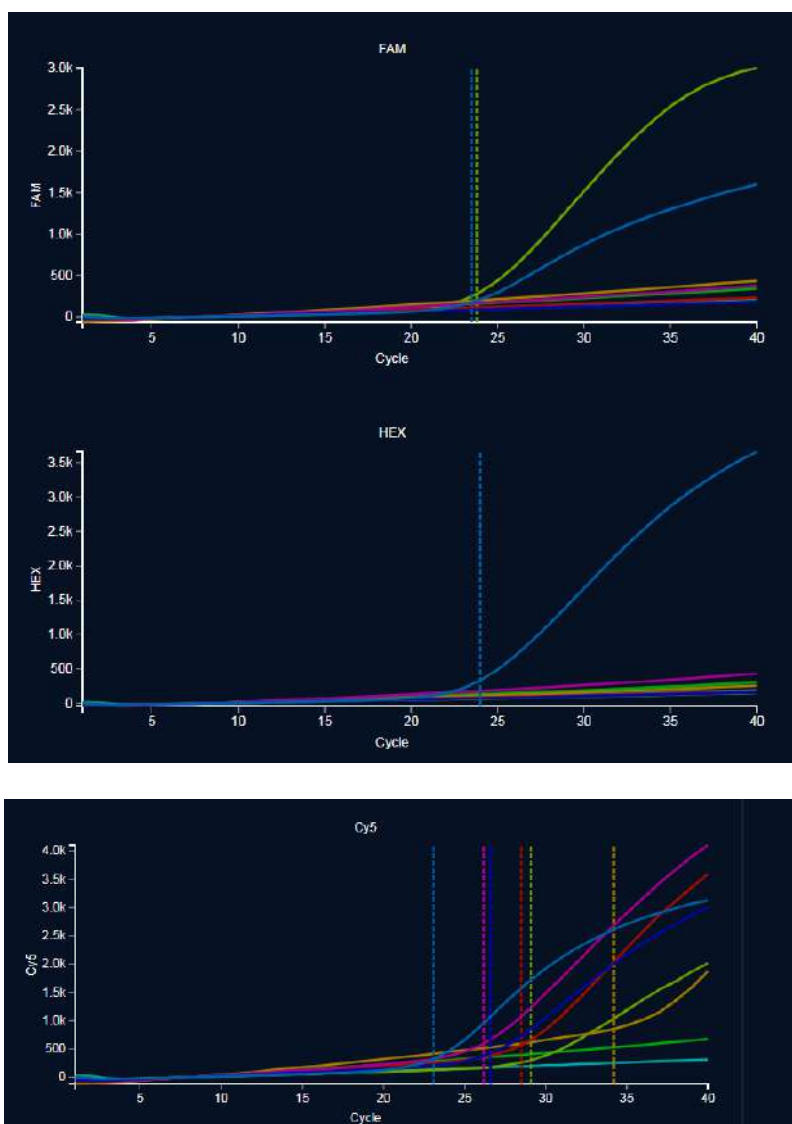
❖ Sur l'écran de l'instrument :

Interprétations		
1	CP	EBX-001 Pos Ctrl
	Non valide - Pos Ctrl Fail	
2	NTC	EBX-001 Neg Ctrl
	Détecté(e-s): Neg Ctrl Valid	
3	871	EBX-001
	Détecté(e-s): B. pertussis - B. parapertussis not detected	
4	Ech 1	EBX-001
	Non détecté - B. parapertussis, B. pertussis	
5	ECH 2	EBX-001
	Non détecté - B. parapertussis, B. pertussis	
6	ECH 3	EBX-001
	Non détecté - B. parapertussis, B. pertussis	
7	ECH 4	EBX-001
	Non détecté - B. parapertussis, B. pertussis	
8	CP	EBX-001 Pos Ctrl
	Détecté(e-s): Pos Ctrl Valid	

❖ Dans le rapport :

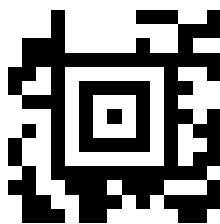
Résumé									
	Puits	Échantillon	Dosage	FAM	HEX	TxR	Cy5	Appeler	Remarque
	1	CP	EBX-001 Pos Ctrl					Invalid	Pos Ctrl Fail
	2	NTC	EBX-001 Neg Ctrl					Detected • Neg Ctrl Valid	
	3	871	EBX-001	23.8			29.1	Detected • B. pertussis	B. paraptussis not detected
	4	Ech 1	EBX-001				34.2	Not Detected	B. paraptussis, B. pertussis
	5	ECH 2	EBX-001				28.5	Not Detected	B. paraptussis, B. pertussis
	6	ECH 3	EBX-001				26.2	Not Detected	B. paraptussis, B. pertussis
	7	ECH 4	EBX-001				26.6	Not Detected	B. paraptussis, B. pertussis
	8	CP	EBX-001 Pos Ctrl	23.5	24.0		23.1	Detected • Pos Ctrl Valid	

Exemple de courbes d'amplification

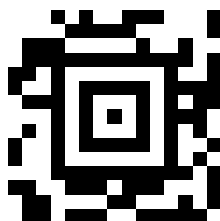


Codes-Barres sur T-COR8®-IVD pour EBX-001

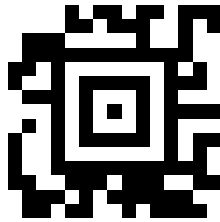
EBX-001 Pos Ctrl
Contrôle Positif CP



EBX-001 Neg Ctrl
Eau = contrôle négatif (CN-H2O)



Assay: EBX-001



BIBLIOGRAPHIE

Fry N.K., Duncan J., Wagner K., Tzivra O., Doshi N., Litt D.J., Crowcroft N., Miller E., George R.C., Harrison T.G. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. *J. of Medic. Microbiol.* 2009, 58, 1023-1029.

Walsh P., Overmeyer C., Kimmel L., Feola M., Pusavat J., Nguyen T.A., Kuan S., Emery K., Rosengreen M., Mordechai E., Adelson M.E. Prevalence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in Samples Submitted for RSV Screening. 2008, Vol IX, No 3, 135-140.

Watanabe M., Connelly B., Weiss A.A. Characterization of Serological Responses to Pertussis. *Clin. And Vacc. Imm.* 2006, Vol 13, No 3, 341-348.

Guiso N., Bassine L., Reinert P. Coqueluche du nourrisson, de l'enfant et de l'adulte. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 4-355-A-05 (2004).

Grimpel E. La coqueluche en pratique en 2007. *Archives de pédiatrie* 14 (2007)306–309.

Pinquier D., Dumesnil C., Galène-Gomez S., Marret S., Marpeau L. Who is it necessary to vaccinate against whooping-cough? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 35 (2007) 1064–1068.

Roorda L., Buitenwerf J., Osseward J.M., Van der Zee A. A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant *Bordetella* species by the presence and distribution of three Insertion Sequence elements. *BMC Research Notes* 2011, 4:11.

Bidet P., Liguori S., De Lauzanne A., Caro V., Lorrot M., Carol A., Faye A., Guiso N., Bingen E., Bonacorsi S. Real-Time PCR Measurement of Persistence of *Bordetella pertussis* DNA in Nasopharyngeal Secretions during Antibiotic Treatment of Young Children with Pertussis. *J. of Clin. Microbiol.* 2008, Vol 46, No 11, 3636-3638.

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

ELIMINATION DES DECHETS

Éliminer tous les déchets conformément à la législation sur les DASRI.

SYMBOLES

	Référence
	Numéro de lot
	Limite supérieure de température de conservation
	Date d'expiration
	Contenu suffisant pour « N » réactions
	Conserver à l'abri de la lumière
	Fabricant
	Produit marqué CE
	Diagnostic In Vitro
	Mode d'emploi



7 avenue de Scandinavie
ZA de Courtabœuf
91940 Les Ulis
FRANCE



EurobioPlex

Bordetella pertussis und parapertussis

REAL-TIME-PCR

Für **qualitative** Real-Time-PCR

EBX-001-UN

REF

EBX-001-48

EBX-001-24



24/48/96 Reaktionen



Version 6.03 vom 13.11.2024

Validiert für:

- CFX96TM Real-Time-PCR-Detektionssystem (Biorad) mit Auswertung mittels CFX Manager v 3.1 (Biorad)
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) mit T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) Software

Reagenzien sind kompatibel mit den folgenden Real-Time-PCR-Systemen:

Applied Biosystems Prism® 7500; qTOWER 2.2; Cepheid Smart Cyclor II®;
Qiagen Rotor-Gene 3000/6000; Stratagene MX3005P*; Biorad Chromo4/CFX 96; Roche LightCycler 480...

* im Gange

Lagerbedingungen: Bis zu ihrer Verwendung und nach der ersten Anwendung alle Reagenzien im Bereich zwischen -15°C und -22°C lagern



Gebrauchsanweisung

Auf Anfrage erhältlich unter: info@eurobio-scientific.com

INHALTSVERZEICHNIS

ENGLISH.....	1
FRANÇAIS.....	23
DEUTSCH.....	46

VERWENDUNGSZWECK.....	48
EINLEITUNG	48
NACHWEISPRINZIP	49
BESCHREIBUNG UND LIEFERUMFANG DES KITS	49
LAGERUNG.....	50
VORSICHTSHINWEISE UND ERLÄUTERUNGEN	51
PROBENENTNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG	51
VERFAHREN	52
VALIDIERUNG DES TESTS.....	55
DATENANALYSE UND AUSWERTUNG.....	55
LEISTUNGSBEWERTUNG.....	56
BESONDERHEITEN DES REAL-TIME-PCR-GERÄTS T-COR 8®-IVD	59
LITERATUR	66
ABFALLENTSORGUNG.....	66
SYMBOLE	67

VERWENDUNGSZWECK

Der *Bordetella pertussis/parapertussis* Test beruht auf Amplifikation mittels Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ist für den qualitativen Nachweis von *Bordetella pertussis* und *Bordetella parapertussis* aus einem Nukleinsäureextrakt bestimmt. Dieser Test ist indiziert, um das Auftreten einer Infektion mit *Bordetella pertussis* oder *Bordetella parapertussis* beim Menschen zu diagnostizieren. Extrahierte DNA ist das Ausgangsmaterial für das EurobioPlex Bordetella Kit.

Der EurobioPlex *Bordetella pertussis/parapertussis* Test wurde an folgenden Probenotypen validiert:

- Nasopharyngeal-Aspirate

Dieses Amplifikationssystem wurde an 107 Nasopharyngeal-Aspirat-Proben und 6 Qualitätskontrollproben, die von einem französischen Nationalen Referenzzentrum zur Verfügung gestellt wurden, validiert.

EINLEITUNG

Keuchhusten ist eine sehr kontagiöse Erkrankung des Atmungssystems, die durch gramnegative Bakterien, *Bordetella pertussis* und *Bordetella parapertussis*, verursacht wird. Die klinischen Symptome sind ein chronischer Husten, der sehr stark sein kann und auf den pfeifende Atemgeräusche und Erbrechen folgen können. In den schwersten Fällen, meist bei Neugeborenen, kann dies zu Hypoxie, irreversiblen Läsionen und Tod führen. Bei älteren Kindern und Erwachsenen, insbesondere bei denen, die bereits geimpft wurden oder zuvor an Keuchhusten erkrankt waren, kann er weniger schwerwiegend verlaufen und als länger andauernder Husten auftreten.

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts war die Prävalenz von Keuchhusten sehr hoch und betraf jedes Jahr etwa 1% der Bevölkerung, wobei die meisten beschriebenen Fälle bei Kleinkindern auftraten. Die Einführung von zellbasierten Impfstoffen gegen Keuchhusten in den 1940er Jahren führte zu einem erheblichen Rückgang der Fallzahlen, dennoch wurde weiterhin eine geringe Inzidenzrate beobachtet. Seit Ende der 1990er Jahre ist die Zahl der Fälle in den entwickelten Ländern, die Impfungen durchführen, dramatisch gestiegen. 2004 wurden in den USA 25.827 Fälle registriert, die höchste Anzahl seit 1959. Ähnliche Beobachtungen wurden in Kanada und Europa gemacht. Die Weltgesundheitsorganisation schätzt, dass es jedes Jahr weltweit 50 Millionen Fälle gibt, mit 350.000 Todesfällen und einer Prävalenz in allen Altersgruppen. In den meisten Fällen ist *Bordetella pertussis* der Auslöser. 3% bis 35% werden durch *Bordetella parapertussis* verursacht, welches für eine leichte Form einer Erkrankung ähnlich dem Keuchhusten verantwortlich ist. Obwohl die Ursachen für das Wiederauftreten von *Bordetella pertussis*-Infektionen nicht klar sind, stimmen Experten überein, dass die Immunität, die durch den Impfstoff verliehen wird, nach 7 bis 10 Jahren abnimmt, was die Erkrankung im Jugendalter erklärt. Diese Individuen könnten die Krankheit auf Neugeborene innerhalb der Familie übertragen.

Es stehen verschiedene Methoden wie Kultur, Serologie und PCR für die Diagnose zur Verfügung. Die Kultur ist die Referenzmethode mit einer Spezifität von 100%,

jedoch ist ihre Sensitivität geringer. Die Sensitivität der Kulturen kann zu Beginn der Erkrankung 56% erreichen, nimmt aber mit der Zeit ab und ist bei Patienten, die eine antimikrobielle Behandlung oder eine vorherige Impfung erhalten haben, geringer. Für die Kultivierung von *B. pertussis* wird ein spezielles Medium benötigt und das Wachstum kann 7 bis 14 Tage dauern, was bei akuten Fällen zu lang ist. Die Serologie verwendet einen paarweisen Vergleich des Patientenserums in der Akutphase und der Rekonvaleszenzphase und benötigt ein Intervall von mindestens 4 Wochen zwischen den beiden Proben. Sie kann daher nicht zur Erstdiagnose verwendet werden.

Spezifische serologische Analysen auf Keuchhusten-Antitoxin IgG wurden entwickelt, Proben müssen aber 2 Wochen nach Auftreten der Symptome entnommen werden. Weitere serologische Tests sind erhältlich, wurden aber nicht klinisch validiert und können nicht zwischen einer kürzlich erfolgten Infektion, einer alten Infektion oder einer Impfung unterscheiden.

NACHWEISPRINZIP

Der *Bordetella pertussis/parapertussis* EurobioPlex Test verwendet Amplifikation mittels Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum simultanen Nachweis von *Bordetella pertussis* (Zielregion IS481) und *Bordetella parapertussis* (Zielregion IS1001) aus einem Nukleinsäureextrakt sowie einer zellulären Kontrolle (human) in einer einzigen Reaktion. Die spezifische Sonde für *B. pertussis* ist mit dem FAM-Fluorophor, die spezifische Sonde für *B. parapertussis* mit dem HEX-Fluorophor markiert. Die spezifische Sonde für die zelluläre Kontrolle ist mit Cy5-Fluorophor markiert. Alle emittieren nach ihrer Hydrolyse während der Elongation des Amplifikationsprodukts Fluoreszenz. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten in Echtzeit korreliert mit der Akkumulation amplifizierter Produkte.

BESCHREIBUNG UND LIEFERUMFANG DES KITS

Das Real-Time-PCR EurobioPlex *Bordetella* Kit ist gebrauchsfertig für den spezifischen Nachweis von *B. pertussis* und *B. parapertussis* und die zelluläre Kontrolle. Fluoreszenz wird emittiert und einzeln durch optische Messungen während der PCR dokumentiert. Der Nachweis der amplifizierten Fragmente erfolgt durch ein Fluorimeter unter Verwendung der Kanäle, die nachfolgend in Tabelle 1 aufgeführt sind.

Das Kit enthält Reagenzien und Enzym für die Amplifikation von *B. pertussis*- und *B. parapertussis*-DNA sowie die zelluläre Kontrolle (Tabelle 1).

Tabelle 1:

Target	Fluorophor	Anregung	Emission
<i>B. pertussis</i>	FAM	495 nm	515 nm
<i>B. parapertussis</i>	HEX	535 nm	555 nm
Zelluläre Kontrolle humane DNA	Cy5	647 nm	667 nm

Entsprechende Kanäle bei unterschiedlichen PCR-Geräten:

- Kanal **FAM** (ABI Systems, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systems Mx, T-COR8®-IVD), Kanal 530 (LC 480), Kanal Green (RotorGene)
- Kanal **HEX** (Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), Kanal VIC (ABI Systems), Kanal Alexa532 (SmartCycler II), Kanal 580 (LC 480), Kanal Yellow (RotorGene),
- Kanal **Cy5** (ABI Systems, Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), Kanal 660 (LC 480), Kanal Alexa647 (SmartCyclerII), Kanal Red (RotorGene)

Bitte beachten: Bei einem LC480-System II Farbkompensation für folgende Kanäle anwenden: FAM und HEX/VIC (465-510, 533-580).

Tabelle 2:

Farbe des Verschlusses	Komponenten	24 Reaktionen	48 Reaktionen	96 Reaktionen
Rot	ENZYM	4 x 100 µl	2 x 375 µl	4 x 375 µl
Transparent	OLIGOMIX	4 x 60 µl	2 x 210 µl	4 x 210 µl
Gelb	Positivkontrolle (<i>Bordetella</i> +human) (CP)	4 x 40 µl	2 x 40 µl	4 x 40 µl
Blau	Wasser für Molekularbiologie = Negativkontrolle (CN-H ₂ O)	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

Erforderliches Material, nicht im Lieferumfang enthalten:

- ◇ Biologische Sicherheitswerkbank
- ◇ Real-Time-PCR-Gerät
- ◇ Mikrozentrifuge
- ◇ Vortex-Mischer
- ◇ Platten / Röhrchen für Real-Time-PCR
- ◇ Mikropipetten
- ◇ DNase-freie, RNase-freie Filterspitzen für Mikropipetten
- ◇ Sterile Mikroröhrchen
- ◇ Puderfreie Handschuhe

LAGERUNG

Alle Reagenzien sind zwischen -15°C und -20°C aufzubewahren.

Alle Reagenzien können bis zu dem auf dem Kit angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Mehrere Gefrier-/Auftau-Zyklen (> 3x) sind zu vermeiden und könnten zu einer Abnahme der Sensitivität führen.

VORSICHTSHINWEISE UND ERLÄUTERUNGEN

Die Anweisungen vor Gebrauch sorgfältig lesen.

- ◇ Der Test ist von geschultem Fachpersonal durchzuführen.
- ◇ Geräte müssen gemäß den Empfehlungen des Herstellers ordnungsgemäß installiert, kalibriert und gewartet werden.
- ◇ Klinische Proben sind potenziell infektiös und müssen unter einem Laminar-Flow-Abzug verarbeitet werden.
- ◇ Der Test muss nach den Grundsätzen der guten Laborpraxis durchgeführt werden.
- ◇ Das Kit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- ◇ Das Kit wird mit Trockeneis geliefert und die Komponenten des Kits müssen gefroren ankommen. Wenn eine oder mehrere Komponenten aufgetaut sind oder Röhrchen beschädigt wurden, wenden Sie sich bitte an Eurobio-Scientific.
- ◇ Nach dem Auftauen die Röhrchen vor Gebrauch kurz zentrifugieren.
- ◇ Die Verwendung von Eis oder einem Kühlblock ist freigestellt, wird aber empfohlen im Falle längerer Wartezeiten bei Zubereitung und Plattenbeladung (durch große Anzahl an zu verarbeitenden Proben) oder im Falle hoher Temperaturen.
- ◇ Es wird empfohlen, drei getrennte Arbeitsbereiche festzulegen: 1) Isolierung der DNA, 2) Zubereitung des Reaktionsgemischs und 3) Amplifikation/ Nachweis der amplifizierten Produkte.
- ◇ Pipetten, Reagenzien und andere Materialien nur jeweils in einem Bereich verwenden.
- ◇ Besondere Vorsicht ist erforderlich, um die Reinheit der Reagenzien und der Reaktionsgemische zu erhalten. Die Verwendung von puderfreien Handschuhen ist zwingend notwendig.
- ◇ Zur Herstellung qualitativ hochwertiger DNA und zur Durchführung einer Real-Time-PCR sollten geeignete Methoden angewendet werden, wobei insbesondere alle Quellen der DNase-Kontamination zu vermeiden sind.
- ◇ Immer Filterspitzen für Mikropipetten verwenden.
- ◇ In jedem Arbeitsbereich einen eigenen Labormantel und puderfreie Handschuhe tragen.
- ◇ Nicht mit dem Mund pipettieren und in den Arbeitsbereichen nicht essen, trinken oder rauchen.
- ◇ Aerosole vermeiden.

PROBENENTNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG

- ◇ Für die Probengewinnung sterile Röhrchen verwenden.
- ◇ Keine Calciumalginat-Abstrichtupfer verwenden, da sie Substanzen enthalten können, die die PCR-Testung hemmen.
- ◇ Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Gewinnung, den Transport und die Lagerung von Proben sowie die Extraktion von DNA durch geeignete Maßnahmen so zu gestalten, dass DNA von guter Qualität hergestellt werden kann.

- ◇ Die Proben sollten sofort extrahiert werden oder gemäß den Empfehlungen in nachfolgender Tabelle gelagert werden (Tabelle 3).

Tabelle 3 :

Empfehlungen für die maximale Lagerung von Proben vor der Extraktion	
Raumtemperatur	2 h
4°C	16h
-20°C	Langfristige Lagerung

- ◇ Der Anwender kann sich hinsichtlich der Lagerung von Proben auch an die Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation oder der zuständigen Gesundheitsbehörde halten.
- ◇ Der Transport von klinischen Proben muss gemäß den lokalen Vorschriften für diesen Typ von infektiösen Erregern erfolgen.

VERFAHREN

I- DNA-Extraktion

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, dass das verwendete Extraktionssystem mit der nachgeschalteten Real-Time-PCR-Technologie kompatibel ist. Für dieses Kit empfehlen wir die Extraktion von bakterieller DNA aus Nasopharyngeal-Aspirat. Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers des verwendeten Extraktionskits.

Hinweis: Es ist nicht notwendig, die humane zelluläre Kontrolle im Extraktionsschritt hinzuzufügen. Die humane zelluläre Kontrolle im Kanal Cy5 stellt sicher, dass ein negatives Ergebnis nicht auf eine unsachgemäße DNA-Extraktion oder das Vorhandensein einer großen Menge an PCR-Inhibitoren zurückzuführen ist und überprüft die Qualität der Probe.

Hinweis: Zu den geeigneten Probentypen zählen Nasopharyngealabstriche in flüssigen Medien (z. B. UTM®, eSwabs® ...).

II- REAL-TIME-PCR

Allgemeine Anmerkungen:

Die *Bordetella* Positivkontrolle enthält eine hohe Konzentration an DNA. Die Handhabung muss sehr gewissenhaft erfolgen, um Kontaminationen zu vermeiden.

II-1/ KONTROLLEN DER REAL-TIME-PCR

Um die Schritte der Extraktion und der Amplifikation mittels Real-Time-PCR zu überprüfen, ist es notwendig, eine Positivkontrolle (CP) und eine Negativkontrolle (PCR-Wasser: CN-H2O) mitzuführen. Detaillierte Informationen sind dem II-2/ Real-Time-PCR-Protokoll zu entnehmen.

Verfahrensdiagramm

1 – ZUBEREITUNG DES MASTERMIXES

Anzahl der Reaktion(en)	N+3*
Enzym	(N+3)x12,5 µl
Oligomix	(N+3)x7,5 µl
Gesamtvolumen Mastermix	(N+3)x20 µl

* N+1 am T-COR 8®-IVD



2 – ZUBEREITUNG DER KONTROLLEN UND REAKTIONEN

Probe

20 µl Mastermix
+
5 µl DNA-Probe

Positivkontrolle

20 µl Mastermix
+
5 µl CP

Negativkontrolle

20 µl Mastermix
+
5 µl Wasser (mitgeliefert) (CN-H2O)



3 – REAL-TIME-PCR-GERÄT (ausgenommen T-COR 8®-IVD – automatische Programmierung mittels Barcodes – siehe Seiten 59 bis 65)

Programm	Temperatur	Dauer	Zyklus/ Zyklen	
Denaturierung	95°C	3 min	1	-
Amplifikation	95°C	10 sec	40	-
	60°C	30 sec		Fluoreszenz- erfassung

Verfahren im Detail

- 1) Enzym-Röhrchen homogenisieren und Oligomix und CP vortexen und kurz zentrifugieren.
- 2) Mastermix wie unten aufgeführt zubereiten, N= Anzahl der Reaktion(en). Genug Mastermix für mindestens N+3 Reaktionen (siehe dazu Teil 1 des oben aufgeführten Diagramms) zubereiten.

Anzahl der Reaktion(en)	N+3*
Enzym	(N+3) x 12,5 µl
Oligomix	(N+3) x 7,5 µl
Gesamt volumen Mastermix	(N+3) x 20 µl

* Für den T-COR 8®-IVD empfehlen wir einen Mastermix für N + 1 Reaktionen für den einmaligen Gebrauch des Kits vorzubereiten.

- 3) Den unter 2) zubereiteten Mastermix mischen und kurz zentrifugieren.
- 4) 20 µl Mastermix mittels einer Mikropipette und sterilen Filterspitzen in jedes Röhrchen/jede Vertiefung der Mikroplatte für die Real-Time-PCR dispensieren.
- 5) 5 µl extrahierte DNA hinzufügen.
- 6) Parallel dazu folgende Kontrollen testen:
 - Positivkontrolle:
 - 20µl Mastermix + 5µl CP
 - Negativkontrolle:
 - 20 µl Mastermix + 5 µl mitgeliefertes Wasser (CN-H₂O)
- 7) Sofort mit einer Klebefolie oder transparenten Deckeln verschließen, um jedwede Kontamination zu vermeiden.
- 8) Kurz zentrifugieren, um das gesamte PCR-Reaktionsgemisch am Boden der Röhrchen oder der Platte zu sammeln.
- 9) Das Real-Time-PCR-Gerät wie folgt programmieren. Die ungefähre Dauer beträgt 1h:

Programm	Temperatur	Dauer	Zyklus/ Zyklen	
Denaturierung	95°C	3 min	1	-
Amplifikation	95°C	10 sec	40	-
	60°C	30 sec		Fluoreszenzerfassung

Anm. 1: Bei Light Cycler ® 480-Systemen (Roche) stehen zwei optische Systeme zur Verfügung: Nur "System II" ist geeignet für dieses Kit. Farbkompensation für die FAM- und HEX/VIC-Wellenlängen (465-510, 533-580) verwenden.

Anm. 2: Bei Applied Biosystems-Systemen "ROX" bei "PASSIVE REFERENCE" auswählen.

Anm. 3: Am Rotorgene TM bitte das Signal durch Anklicken von "GAIN optimization" kalibrieren.

VALIDIERUNG DES TESTS

Wenn am Ende des Zyklus ein Signal in der Negativkontrolle erscheint, muss der Schwellenwert knapp über dem Maximum des Negativkontrollsignals positioniert werden. Damit der Test gültig ist, müssen die Ct-Werte für die Kontrollen wie folgt sein (Tabelle 4). Außerhalb dieser Werte ist der Test nicht gültig. Wir empfehlen die Positiv- und Negativkontrollen auf dem T-COR 8®-IVD zu testen, sobald ein neues Kit geöffnet wird.

Tabelle 4:

Kontrollen	NC	CP
FAM	Ct >38 oder nicht bestimmt	Ct ≤ 30
HEX	Ct >38 oder nicht bestimmt	Ct ≤ 30
Cy5	Ct nicht bestimmt oder bestimmt*	Ct <35

*Bitte beachten: Es ist möglich, dass ein Ct im Kanal Cy5 in der Negativkontrolle bestimmt werden kann. Dies macht den Lauf nicht ungültig. Das Vorhandensein des zellulären Gens (human) in der Negativkontrolle könnte anwenderbedingt sein.

** Am T-COR 8®-IVD wird die Auswertung automatisch mit Barcodes generiert.

DATENANALYSE UND AUSWERTUNG

1/ Ein Signal (< 38 Ct) im Kanal FAM -> **Das Ergebnis ist positiv: Die Probe enthält DNA von *Bordetella pertussis*.** Aufgrund von Competition kann das Signal der internen humanen Kontrolle in Kanal Cy5 stark vermindert (sogar nicht nachweisbar) sein, wenn große Mengen an *Bordetella pertussis*-DNA vorhanden sind.

2/ Ein Signal (< 38 Ct) im Kanal HEX -> **Das Ergebnis ist positiv: Die Probe enthält DNA von *Bordetella parapertussis*.** Aufgrund von Competition kann das Signal der internen humanen Kontrolle in Kanal Cy5 stark vermindert (sogar nicht nachweisbar) sein, wenn große Mengen an *Bordetella parapertussis*-DNA vorhanden sind.

3/ Kein Signal in den Kanälen FAM oder HEX (oder Signal > 38 Ct) und gleichzeitig ein positives Signal in Kanal Cy5 -> **Die Probe enthält weder DNA von *Bordetella pertussis* noch DNA von *Bordetella parapertussis*. Die Probe kann als negativ betrachtet werden.**

4/ Kein Signal in Kanälen FAM oder HEX oder Cy5 (oder Signal > 38 Ct) -> **Es ist keine Diagnose möglich.** Die DNA-Extraktion wurde gehemmt. Es wird empfohlen, die DNA zu verdünnen oder die DNA-Extraktion der Probe zu wiederholen.

LEISTUNGSBEWERTUNG

➤ **Nachweisgrenze:**

Bordetella pertussis: 100 Kopien/μl Positivkontrolle

Bordetella parapertussis: 100 Kopien/μl Positivkontrolle

➤ **Reproduzierbarkeit (Variationskoeffizient):**

Reproduzierbarkeit des Ct-Werts innerhalb des Tests:

B. pertussis: 1,65%; ***B. parapertussis***: 1,61%

Reproduzierbarkeit des Ct-Werts zwischen Chargen:

B. pertussis: 5,586%; ***B. parapertussis***: 5,396%

Beispiel:

Die folgende Tabelle zeigt die mittleren Ct-Werte für das IS481-Plasmid:

Verdünnungen	Ct parapertussis	SD	Variationskoeffizient (%)
Verdünnung 1	25,50	0,59	2,31
Verdünnung 2	25,76	0,60	2,32
Verdünnung 3	26,46	0,28	1,06

Die nachfolgende Tabelle zeigt die mittleren Ct-Werte für das IS1001-Plasmid:

Verdünnungen	Ct parapertussis	SD	Variationskoeffizient (%)
Verdünnung 1	25,65	0,55	2,15
Verdünnung 2	25,88	0,26	1,00
Verdünnung 3	28,80	0,18	0,63

➤ **Sensitivität und Spezifität für *Bordetella pertussis* und *Bordetella parapertussis*:**

Studie 1: Insgesamt wurden 87 vorgetestete Proben verwendet, um die Leistungsfähigkeit des Kits zu bestimmen, darunter: 60 positiv vorgetestet auf *B. pertussis*, 2 positiv vorgetestet auf *Bordetella holmesii*, 26 positiv vorgetestet auf *B. parapertussis*. Proben, die positiv auf *B. pertussis* vorgetestet waren, waren negativ für *B. parapertussis* und umgekehrt, nur eine Probe zeigte eine Koinfektion.

<i>Bordetella pertussis</i>		EBX-001	
		POS	NEG
Vorgetestet	POS	58	2
	NEG	0	22
<i>Bordetella parapertussis</i>		EBX-001	
		POS	NEG
Vorgetestet	POS	22	1
	NEG	0	59

Spezifität: 100%.

Es wurde keine Kreuzreaktivität zwischen *B. pertussis* und *B. parapertussis* beobachtet.

Dieser Test differenziert nicht zwischen einer Infektion durch Bordetella pertussis und Bordetella holmesii. Beide Krankheitserreger enthalten das IS481-Gen. Die Häufigkeit von Bordetella holmesii in klinischen Proben wird als sehr gering beschrieben (<0,5%), und es ist noch unklar, ob Bordetella holmesii bei ansonsten gesunden Personen Atemwegserkrankungen verursachen kann.

Infolgedessen wurden die beiden positiven B. holmesii-Proben positiv auf das Target Bordetella pertussis getestet.

Sensitivität:

96,7% der auf *Bordetella pertussis* vorgetesteten Proben wurden detektiert, 91,7% mit einem Ct-Wert niedriger als 38.

95,6% der auf *Bordetella parapertussis* vorgetesteten Proben wurden detektiert.

Studie 2: Vergleich zwischen Focus *Bordetella* Simplexa und EurobioPlex PCR:

20 klinische Proben von Nasen-Rachen-Abstrichen, die zuvor mit dem Laborroutine-test (Focus *Bordetella* Simplexa) analysiert worden waren, wurden mit dem EurobioPlex *Bordetella pertussis/Bordetella parapertussis* am Smartcycler II ® (Cepheid) getestet.

Referenz-PCR	EurobioPlex PCR			
		Positiv	Negativ	Total
	Positiv	11	0	11
	Negativ	0	9	9
	Total	11	9	20

Sensitivität und Spezifität zwischen den 2 Methoden liegt bei 100%.

Studie 3: Prüfbericht zu Qualitätskontrollen des Referenzzentrums Institut Pasteur CQBORD-2012:

Die Qualitätskontrollen des Referenzzentrums bestehen aus 6 Röhrchen. Tests wurden am LC480® (Roche) durchgeführt.

CQ-2012	Ct IS481	Ct IS1001
CQ1	24,1	-
CQ2	-	33,7
CQ3	27,1	-
CQ4	33	-
CQ5	-	-
CQ6	22,7	-

Die Ergebnisse stimmen mit den erwarteten Ergebnissen des Referenzzentrums überein.

BESONDERHEITEN DES REAL-TIME-PCR-GERÄTS T-COR 8®-IVD

Der T-COR 8®-IVD ist ein Real-Time-PCR-Gerät mit 8 unabhängigen Vertiefungen, die unabhängig voneinander, Patient für Patient hinsichtlich des thermischen Protokolls, der Tests und der Startzeit des Laufs programmiert werden können.

Die 8 Vertiefungen können auch simultan mit dem gleichen Test verwendet werden.

Bitte beachten: Mischen Sie die Probe, durch Pipettieren von oben bis unten pipettieren und sich kein bläschen kilden

Kontrollen

Wir empfehlen, die Positiv- und Negativkontrollen auf dem T-COR 8®-IVD zu testen, sobald ein neues Kit geöffnet wird.

Nach dieser ersten Kontrolle ermöglicht die zelluläre Kontrolle/Human-DNA die Überprüfung, ob die PCR ordnungsgemäß funktioniert, keine PCR-Inhibition vorliegt und dass die Extraktion erfolgreich war.

Patienten-Tests

<i>Mit Validierung von Positiv- und Negativkontrollen einmalig bei der ersten Verwendung des Kits</i>	24 Reaktionen
Anzahl der möglichen Patienten-Tests, Patient für Patient, mit maximal 12 Gefrier-/Auftauzyklen (3-mal pro Röhrchen/4 Röhrchen pro Reagenz)	12 Patienten

Fluorophore

Vier Kombinationen von Fluorophoren sind am T-COR 8®-IVD verfügbar.

Für alle EBX, wie beispielsweise EBX-001, wird die FAM/HEX/Texas Red/Cy5 Kombination verwendet. Wenn einer der Kanäle nicht verwendet wird, ist dieser Kanal bei der Auswertung der Ergebnisse nicht zu berücksichtigen.

Verwendung der Barcodes (auf den Seiten 63 bis 65 verfügbar)

- 1- Menü auswählen > Neuer Lauf (« New Run »)
- 2- Barcode auswählen
- 3- Den entsprechenden Barcode auf der rechten Seite des Geräts scannen:
 - Für die Positivkontrolle (Barcode EBX-001 Pos Ctrl),
 - Für die Negativkontrolle (Barcode EBX-001 Neg Ctrl),

- Für eine Patientenprobe (Barcode Assay: EBX-001)

Das Gerät wählt nach dem Zufallsprinzip eine der 8 verfügbaren Vertiefungen aus. Befolgen Sie die Anweisungen am Gerät.

- 4- Den Deckel der ausgewählten Vertiefung (Vertiefung x) hochklappen, überprüfen, ob das blaue LED-Licht aufleuchtet, und « Yes » auswählen
- 5- Das Röhrchen in die entsprechende Vertiefung stellen und « Next » auswählen
- 6- Wenn Sie die Probe mit Namen versehen möchten (optional), « sample x » auswählen, den Namen eingeben und « Accept » auswählen
- 7- « Next » auswählen
- 8- Um eine weitere Kontrolle oder Probe hinzuzufügen/zu testen, « Add well » auswählen und zurück zu Schritt 3- gehen
- 9- « Start run » auswählen

Beachten Sie: Der Name einer Probe oder eines Laufs kann nicht verändert oder hinzugefügt werden, nachdem der Lauf beendet ist. Diese Eingabe muss vor oder während des Laufs erfolgen.

Darstellung und Auswertung der Ergebnisse

Ct-Werte und Amplifikationskurven sind über die SmartCT™-Tabelle (Ct-Werte auf jedem Kanal) und « Ct versus PCR cycles »-Diagramme verfügbar, beide können während des Laufs in Echtzeit angezeigt werden.

Eine automatische Analyse der Positiv- und Negativkontrollen sowie der Patientenproben steht unter « Interpretations » zur Verfügung, am Ende des Laufs ist sie im « View »-Fenster sichtbar.

Bei Positiv- und Negativkontrollen sind folgende Ergebnisse möglich:

- « Neg Ctrl Fail »: Nicht gültig
- « Neg Ctrl Valid »: Gültig
- « Pos Ctrl Fail »: Nicht gültig
- « Pos Ctrl Valid »: Gültig

Statusbestimmung der Patienten-Proben:

- « Detected »: Positiv auf mindestens ein Target getestet * → **grüne Box**
- « Not detected »: Negativ → **rote Box**

* Die Ergebnisse werden für die einzelnen Bakterien angegeben.

ACHTUNG !

Wenn die Box grün ist, ist es wichtig, den Status für jedes Target abzulesen, da manche Targets negativ sein können.

« Invalid »: Ungültiges Ergebnis -> erneut testen → **orangene Box**

Beispiel für die Darstellung der automatischen Auswertung der Ergebnisse am T-COR 8®-IVD-Gerätebildschirm und im Bericht:

- Für gültige Positiv- und Negativkontrollen, die mit « Detected » angezeigt werden; für eine ungültige Positivkontrolle, die erneut getestet werden muss; für vier Proben, die negativ auf beide Targets getestet wurden und als « Not Detected » (Proben 1 bis 4) angezeigt werden; und für eine Probe, die positiv auf eines der Targets getestet wurde und mit « Detected: B. pertussis - B. parapertussis not detected » angezeigt wird (Probe 871):

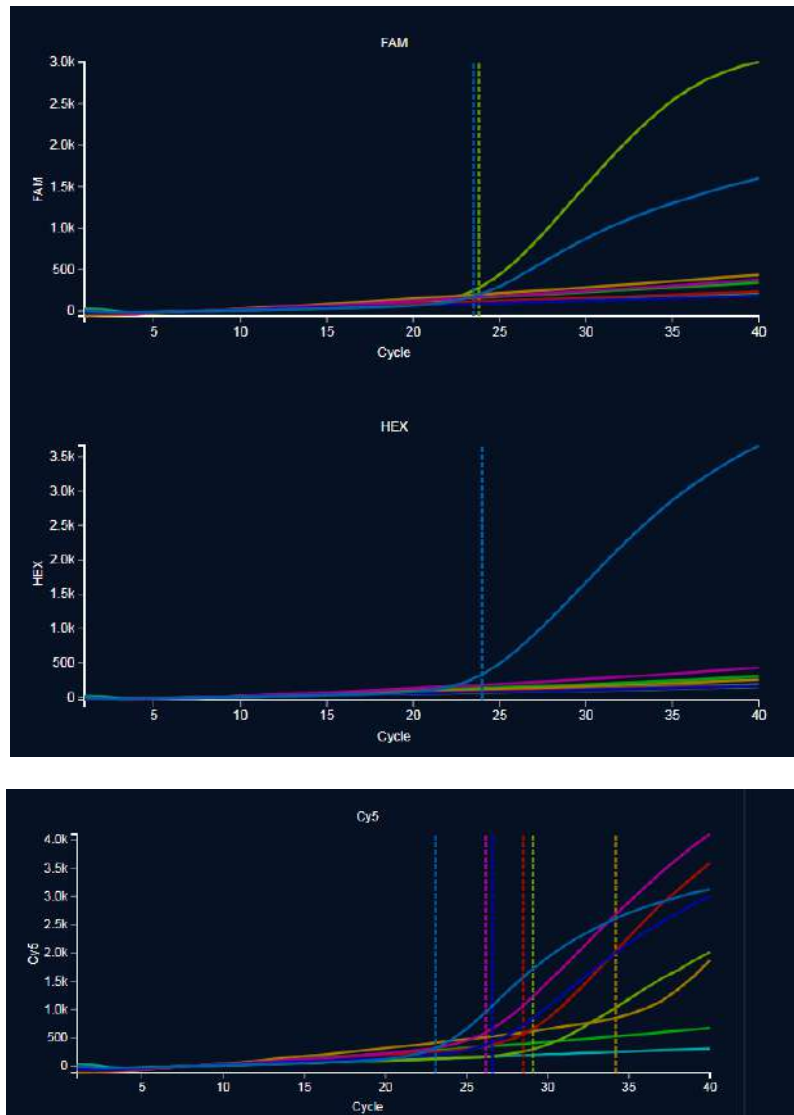
❖ Am Gerätebildschirm:

		Interpretations	
1	CP	EBX-001 Pos Ctrl	
	Invalid - Pos Ctrl Fail		
2	NTC	EBX-001 Neg Ctrl	
	Detected: Neg Ctrl Valid		
3	871	EBX-001	
	Detected: B. pertussis - B. parapertussis not detected		
4	Ech 1	EBX-001	
	Not Detected - B. parapertussis, B. pertussis		
5	ECH 2	EBX-001	
	Not Detected - B. parapertussis, B. pertussis		
6	ECH 3	EBX-001	
	Not Detected - B. parapertussis, B. pertussis		
7	ECH 4	EBX-001	
	Not Detected - B. parapertussis, B. pertussis		
8	CP	EBX-001 Pos Ctrl	
	Detected: Pos Ctrl Valid		

❖ Im Bericht:

Résumé							
Puits	Échantillon	Dosage	FAM	HEX	TxR	Cy5	Appeler
1	CP	EBX-001 Pos Ctrl					Invalid
2	NTC	EBX-001 Neg Ctrl					Detected • Neg Ctrl Valid
3	871	EBX-001	23.8			29.1	Detected • B. pertussis
4	Ech 1	EBX-001				34.2	Not Detected
5	ECH 2	EBX-001				28.5	Not Detected
6	ECH 3	EBX-001				26.2	Not Detected
7	ECH 4	EBX-001				26.6	Not Detected
8	CP	EBX-001 Pos Ctrl	23.5	24.0		23.1	Detected • Pos Ctrl Valid
							Remarque
							Pos Ctrl Fail
							B. parapertussis not detected
							B. parapertussis, B. pertussis
							B. parapertussis, B. pertussis
							B. parapertussis, B. pertussis
							B. parapertussis, B. pertussis

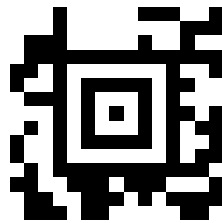
Beispiel für Amplifikationskurven:



Barcodes für EBX-001 zur Verwendung am T-COR8®-IVD

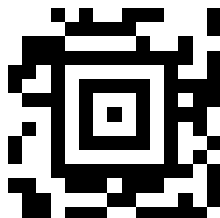
EBX-001 Pos Ctrl

Positivkontrolle CP

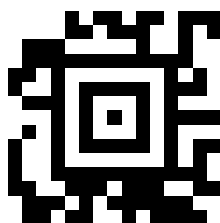


EBX-001 Neg Ctrl

Wasser = Negativkontrolle (CN-H2O)



Assay: EBX-001



LITERATUR

Fry N.K., Duncan J., Wagner K., Tzivra O., Doshi N., Litt D.J., Crowcroft N., Miller E., George R.C., Harrison T.G. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. *J. of Medic. Microbiol.* 2009, 58, 1023-1029.

Walsh P., Overmeyer C., Kimmel L., Feola M., Pusavat J., Nguyen T.A., Kuan S., Emery K., Rosengreen M., Mordechai E., Adelson M.E. Prevalence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in Samples Submitted for RSV Screening. 2008, Vol IX, No 3, 135-140.

Watanabe M., Connelly B., Weiss A.A. Characterization of Serological Responses to Pertussis. *Clin. And Vacc. Imm.* 2006, Vol 13, No 3, 341-348.

Guiso N., Bassine L., Reinert P. Coqueluche du nourrisson, de l'enfant et de l'adulte. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 4-355-A-05 (2004).

Grimprel E. La coqueluche en pratique en 2007. *Archives de pédiatrie* 14 (2007) 306–309.

Pinquié D., Dumesnil C., Galène-Gomez S., Marret S., Marpeau L. Who is it necessary to vaccinate against whooping-cough? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 35 (2007) 1064–1068.

Roorda L., Buitenwerf J., Osseward J.M., Van der Zee A. A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant *Bordetella* species by the presence and distribution of three Insertion Sequence elements. *BMC Research Notes* 2011, 4:11.

Bidet P., Liguori S., De Lauzanne A., Caro V., Lorrot M., Carol A., Faye A., Guiso N., Bingen E., Bonacorsi S. Real-Time PCR Measurement of Persistence of *Bordetella pertussis* DNA in Nasopharyngeal Secretions during Antibiotic Treatment of Young Children with Pertussis. *J. of Clin. Microbiol.* 2008, Vol 46, No 11, 3636-3638.

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

ABFALLENTSORGUNG

Die Gesetze in Bezug auf die Entsorgung von klinischem infektiösen Material müssen eingehalten werden.

SYMBOLE

	Referenz
	Chargennummer
	Höchste Lagertemperatur
	Verfallsdatum
	Inhalt ausreichend für « N » Reaktionen
	Vor Lichteinstrahlung schützen
	Hersteller
	CE-gezeichnetes Produkt
	In-vitro-Diagnostika
	Gebrauchsanweisung




eurobio
 SCIENTIFIC
 7 avenue de Scandinavie
 ZA de Courtabœuf
 91940 Les Ulis
 FRANKREICH