

## **Mode d'emploi**

**RealStar<sup>®</sup>**

**Bordetella PCR Kit 1.0**

01/2017 FR

# RealStar<sup>®</sup>

## Bordetella PCR Kit 1.0

Pour utilisation avec

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)  
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)  
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)  
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)  
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)  
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)  
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)  
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)  
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



531013



96



01 2017



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

## Sommaire

<b>1. Usage prévu</b>	<b>6</b>
<b>2. Composants du kit</b>	<b>6</b>
<b>3. Conservation</b>	<b>6</b>
<b>4. Matériel requis non fourni</b>	<b>7</b>
<b>5. Informations générales</b>	<b>8</b>
<b>6. Description du produit</b>	<b>10</b>
6.1 Instruments de PCR en temps réel	12
<b>7. Mises en garde et précautions</b>	<b>12</b>
<b>8. Mode d'emploi</b>	<b>14</b>
8.1 Préparation du prélèvement	14
8.2 Préparation du Mastermix	15
8.3 Préparation de la réaction	17
<b>9. Programmation des instruments de PCR en temps réel</b>	<b>18</b>
9.1 Paramètres	18
9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)	19
9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore	19
<b>10. Analyse des données</b>	<b>20</b>
10.1 Validation des tests de diagnostic	20
10.1.1 Validité des tests de diagnostic	20
10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic	20
10.2 Interprétation des résultats	21
10.2.1 Analyse qualitative	21

<b>11. Evaluation des performances</b>	<b>22</b>
11.1 Sensibilité analytique	22
11.2 Spécificité analytique	24
11.3 Précision	25
<b>12. Limites</b>	<b>26</b>
<b>13. Contrôle qualité</b>	<b>27</b>
<b>14. Assistance technique</b>	<b>27</b>
<b>15. Bibliographie</b>	<b>27</b>
<b>16. Marques déposées et responsabilité</b>	<b>28</b>
<b>17. Explications des symboles</b>	<b>29</b>

## 1. Usage prévu

Le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative et la différenciation de l'ADN spécifique de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella parapertussis*.

## 2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [ $\mu$ L/tube]
Bleu	Master A	8	60
Violet	Master B	8	180
Vert	Internal Control	1	1000
Rouge	Positive Control	1	250
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Contrôle interne

Positive Control (IC) = Contrôle positif

Water (PCR grade) = Eau ultra-pure pour biologie moléculaire

## 3. Conservation

- Le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 est expédié sous glace carbonique. Les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés à réception, ou si l'un des tubes a été endommagé pendant le transport, merci de contacter altona Diagnostics GmbH pour assistance.
- Tous les composants doivent être conservés entre  $-25^{\circ}\text{C}$  et  $-15^{\circ}\text{C}$  dès leur livraison.
- Il convient d'éviter des cycles répétés de congélation-décongélation (plus de deux) car cela peut affecter les performances du test. Les réactifs doivent être congelés en aliquots en cas d'utilisation occasionnelle.
- La conservation entre  $+2^{\circ}\text{C}$  et  $+8^{\circ}\text{C}$  ne doit pas excéder une période de deux heures.
- Le Master A et le Master B doivent être conservés à l'abri de la lumière.

## 4. Matériel requis non fourni

- Instrument adapté à la PCR en temps réel (Chapitre 6.1 Instruments de PCR en temps réel)
- Système ou kit approprié à l'extraction des acides nucléiques
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour des tubes réactionnels de 2 mL
- Centrifugeuse avec rotor pour microplaques, si des plaques de 96 puits sont utilisées
- Vortex
- Plaques de 96 puits ou tubes réactionnels avec le matériel de fermeture correspondant (optique)
- Pipettes (réglables)
- Cônes avec filtres (jetables)
- Gants non talqués (jetables)

### NOTE



*Merci de vous assurer que les instruments ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus selon les instructions et les recommandations du fabricant.*



*Il est fortement recommandé d'utiliser le rotor de 72 puits avec les tubes réactionnels de 0,1 ml correspondants, si le Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou le Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN) est utilisé.*

## 5. Informations générales

*Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis* sont les agents pathogènes de la coqueluche, une maladie avec une toux aiguë et fortement contagieuse chez l'homme [1, 2]. D'autres espèces du genre *Bordetella* peuvent aussi causer cette maladie respiratoire chez les hommes. *Bordetella holmesii* a été plus récemment associé à une maladie semblable à la coqueluche [3, 4] et *Bordetella bronchiseptica* infecte un grand nombre de mammifères, y compris les humains, causant de temps en temps des maladies avec une toux. Des infections sévères peuvent arriver chez les personnes immunodéprimées [5].

Toutes les espèces de *Bordetella* causant des maladies respiratoires chez l'Homme possèdent des régions d'ADN spécifiques, les dites séquences d'insertions (IS).

**Tableau 1:** Séquences d'insertion de *Bordetella*, l'IS481 et l'IS1001, adaptées de Loeffelholz [6]

Présence/ nb. de copies par génome <sup>1</sup>				
Séquence d'insertion	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. bronchiseptica</i> <sup>2</sup>
IS481	+/>50	-/NA	+/8-10	(+) <sup>3</sup> /ND
IS1001	-/NA	+/~20	-/NA	(+) <sup>4</sup> /1-7

<sup>1</sup> Symboles et abréviations: +, présent chez tous les isolats; (+), présent chez certains isolats; -, absent chez tous les isolats; NA, non applicable; ND, non déterminé.

<sup>2</sup> Isolats de dérivés humains de *B. bronchiseptica* seulement.

<sup>3</sup> Un des 73 isolats de dérivés humains a été détecté positif.

<sup>4</sup> Quatre des 73 isolats de dérivés humains ont été détectés positifs.

Avec plus de 50 copies par génome [7], la séquence d'insertion IS481 est la cible idéale pour la détection de *Bordetella pertussis*. Cette cible est aussi présente chez *Bordetella holmesii*, avec un nombre de copies de 8 à 10 copies par génome [7] et elle est trouvée rarement chez les souches de *Bordetella bronchiseptica* [8].

Le génome de *Bordetella parapertussis* porte environ 20 copies de la séquence d'insertion IS1001, qui favorise une détection PCR très sensible, mais elle est aussi présente chez certaines souches de *Bordetella bronchiseptica* avec des nombres de copies de 1 à 7 copies par génome [7].

Les méthodes de détection n'ont pas pour objectif de répondre aux mêmes besoins en diagnostic clinique et en santé publique. Au niveau clinique, le but est d'en optimiser la sensibilité (pour ne pas manquer de cas) en fournissant des résultats rapides. Ceci assure un traitement approprié et empêche une nouvelle transmission. Au niveau de la santé publique, un fort degré de spécificité (dans la plupart des pays, une infection à *B. pertussis* est rapportable, mais ce n'est pas le cas pour une infection avec les autres espèces de *Bordetella*) est nécessaire pour éviter des interventions de santé publique inutiles et inefficaces [9].

Le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 s'inscrit dans une logique de diagnostic. Aussi une très forte sensibilité a été recherchée, aux dépens d'une très forte spécificité : le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 cible l'IS481 pour la détection de *Bordetella pertussis* et l'IS1001 pour la détection de *Bordetella parapertussis*.

[1] Zhang X, Weyrich LS, Lavine JS, Karanikas AT, Harvill ET. Lack of cross-protection against *Bordetella holmesii* after pertussis vaccination. *Emerg Infect Dis.* 2012 Nov;18(11):1771-9.

[2] He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, Mertsola J. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA.* 1998 Aug 19;280(7):635-7.

[3] Rodgers L, Martin SW, Cohn A, Budd J, Marcon M, Terranella A, Mandal S, Salamon D, Leber A, Tondella M-L, Tatti K, Spicer K, Emanuel A, Koch E, McGlone L, Pawloski L, LeMaile-Williams M, Tucker N, Iyer R, Clark TA, DiOrio M. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis*—Ohio, 2010-2011. *Clin. Infect. Dis.* 2013 Feb; 56:322–331.

[4] Njamkepo E, Bonacorsi S, Debryne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol.* 2011 Dec;49(12):4347-8.

- [5] Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella subspecies*. Clin Microbiol Rev. 2005 Apr;18(2):326-82.
- [6] Loeffelholz M. Towards Improved Accuracy of *Bordetella pertussis* Nucleic Acid Amplification Tests. J Clin Microbiol. 2012 Jul, 50(7):2186-2190.
- [7] Reischl U, Lehn N, Sanden GN, Loeffelholz MJ. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. J Clin Microbiol. 2001 May;39(5):1963-6.
- [8] Tatti KM, Sparks KN, Boney KO, Tondella ML. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens. J Clin Microbiol. 2011 Dec;49(12).
- [9] <http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/index.html>

## 6. Description du produit

Le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative et la différenciation de l'ADN spécifique de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella parapertussis*.

Le kit comprend un système d'amplification hétérologue (contrôle interne) afin d'identifier d'éventuelles inhibitions de la PCR et de confirmer l'intégrité des réactifs du kit.

Le test repose sur la technologie de PCR en temps réel, utilisant une réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences cibles spécifiques et de sondes cibles spécifiques pour la détection de l'ADN amplifié. Les sondes sont marquées avec un marqueur fluorescent (reporter) et un désactivateur (quencher).

Les sondes spécifiques de l'ADN de *B. pertussis* (Cible IS481) sont marquées par le fluorophore FAM™, tandis que les sondes spécifiques de l'ADN de *B. parapertussis* (Cible IS1001) sont marquées par un fluorophore qui montrent les mêmes caractéristiques que le Cy®5. La sonde spécifique du contrôle interne est marquée par le fluorophore JOE™.

L'utilisation de sondes associées à des fluorophores différents permet la détection en parallèle de l'ADN spécifique de *B. pertussis* (Cible IS481), de *B. parapertussis* (Cible IS1001) et du contrôle interne dans les canaux correspondants de l'instrument de PCR en temps réel.

Le test consiste en deux processus réalisés dans un même tube réactionnel:

- l'amplification par PCR de l'ADN, et du contrôle interne
- la détection simultanée des amplicons de PCR par des sondes marquées par un fluorophore

Le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 est composé de:

- Deux Masters (Master A et Master B)
- Un contrôle interne
- Un Contrôle positif [*Bordetella pertussis* + *Bordetella parapertussis*]
- De l'eau ultra-pure (pour biologie moléculaire)

Les réactifs du Master A et du Master B contiennent tous les composants nécessaires (tampon PCR, ADN Polymérase, sel de magnésium, amorces et sondes) afin de réaliser l'amplification par PCR et la détection spécifiques de l'ADN de *B. pertussis* (Cible IS481) et de l'ADN de *B. parapertussis* (Cible IS1001) ainsi que du contrôle interne en une seule étape de réaction.

## 6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

## 7. Mises en garde et précautions

*Lire attentivement le manuel d'utilisation avant d'utiliser le produit.*

- Avant toute utilisation, veuillez vérifier que le produit et ses composants:
  - Ne sont pas endommagés,
  - Sont complets : nombre, type et volume (voir le chapitre 2. Composants du kit)
  - Sont correctement étiquetés,
  - Sont congelés à la réception
- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et/ou dangereux, en accord avec les procédures de sécurité en vigueur dans le laboratoire.
- Porter des gants jetables non talqués, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.

- Eviter les contaminations microbiennes et nucléaires (par ADNase/ARNase) de l'échantillon et des composants du kit.
- Toujours utiliser des pipettes à cônes jetables avec filtre, non contaminées par de l'ADNase et de l'ARNase.
- Toujours porter des gants de protection non talqués lors de la manipulation des composants du kit.
- Utiliser des zones de travail séparées les unes des autres pour les différentes activités de (i) préparation des échantillons, (ii) préparation de la réaction et (iii) les étapes d'amplification/détection. Le sens de travail dans le laboratoire doit être unidirectionnel. Porter des gants dans chaque zone de travail et les changer avant d'entrer dans une zone différente.
- Dédier des fournitures et du matériel pour chaque zone de travail et ne pas les déplacer d'une zone à une autre.
- Conserver le matériel positif et/ou potentiellement positif séparément des autres composants du kit.
- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification afin d'éviter toute contamination par les amplicons.
- Des témoins additionnels peuvent devoir être testés selon les directives des organisations locales/gouvernementales ou des organismes d'accréditation.
- Ne pas autoclaver des tubes réactionnels après une PCR, car ceci ne dégrade pas les acides nucléiques amplifiés et risque de contaminer le laboratoire.
- Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.
- Eliminer les échantillons et les déchets de l'essai conformément aux règles de sécurité locales.

## 8. Mode d'emploi

### 8.1 Préparation du prélèvement

L'ADN extrait constitue le matériel de départ pour le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0.

La qualité de l'ADN extrait a un impact significatif sur la performance de l'ensemble du test. Il est important de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Les kits et systèmes suivants sont compatibles pour l'extraction des acides nucléiques:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAasymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

D'autres kits ou systèmes d'extraction des acides nucléiques peuvent être appropriés. L'aptitude de la procédure d'extraction des acides nucléiques à utiliser avec RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 doit être validé par l'utilisateur.

Si la préparation des échantillons s'effectue sur une colonne comportant des tampons de lavage à l'éthanol, une étape de centrifugation supplémentaire de 10 minutes à environ 17000 x g (~ 13000 tr/min), dans un nouveau tube à essai, est vivement recommandée avant l'élution des acides nucléiques.

#### ATTENTION



**L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel. Si votre système de préparation des échantillons utilise des tampons de lavage à l'éthanol, assurez-vous d'éliminer toute trace d'éthanol avant de procéder à l'élution des acides nucléiques.**



**L'utilisation d'ARN porteur (carrier) est crucial pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité des acides nucléiques extraits.**

Pour toute information complémentaire ou assistance technique sur le prétraitement et la préparation des échantillons, merci de contacter notre support technique (Chapitre 14. Assistance technique).

### 8.2 Préparation du Mastermix

Tous les réactifs doivent être complètement décongelés, homogénéisés (par pipetage ou léger vortexage) et brièvement centrifugés avant utilisation.

Le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 contient un contrôle interne hétérologue pouvant être utilisé soit comme contrôle d'inhibition de la PCR soit comme contrôle de la préparation de l'échantillon (extraction des acides nucléiques) et de l'inhibition de la PCR.

- Si le contrôle interne est utilisé comme un contrôle d'inhibition de la PCR, mais non comme contrôle de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit être préparé comme décrit par le schéma de pipetage ci-dessous:

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µL	60 µL
Master B	15 µL	180 µL
Internal Control (contrôle interne)	1 µL	12 µL
<b>Volume de Mastermix</b>	<b>21 µL</b>	<b>252 µL</b>



- ▶ Si le contrôle interne est utilisé comme contrôle de préparation de l'échantillon, et d'inhibition de la PCR, le contrôle interne doit être ajouté au moment de la procédure d'extraction des acides nucléiques.
- ▶ Quelque soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, le contrôle interne ne doit **jamais** être ajouté directement à l'échantillon. Le contrôle interne doit toujours être ajouté au mélange échantillon/ tampon de lyse. Le volume du contrôle interne à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'élution, dont il représente 10%. Par exemple si les acides nucléiques doivent être élués dans 60 µL de tampon d'élution ou d'eau, 6 µL de contrôle interne par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/tampon de lyse.
- ▶ Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit être préparé selon le schéma de pipetage suivant:

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µL	60 µL
Master B	15 µL	180 µL
<b>Volume de Mastermix</b>	<b>20 µL</b>	<b>240 µL</b>

**ATTENTION**

*Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, au moins le contrôle négatif doit inclure le contrôle interne.*



*Ne jamais ajouter le contrôle interne directement à l'échantillon.*

**8.3 Préparation de la réaction**

- ▶ Pipeter 20 µL de Mastermix dans chacun des puits nécessaires de la plaque 96 puits ou d'un tube à essai permettant les réactions optiques.
- ▶ Ajouter 10 µL de l'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µL des contrôles (contrôles positifs ou négatifs).

Préparation de la réaction	
Mastermix	20 µL
Echantillon ou contrôle	10 µL
<b>Volume total</b>	<b>30 µL</b>

- ▶ S'assurer que chaque contrôle positif et au moins un contrôle négatif sont utilisés par essai.
- ▶ Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Mastermix par pipetage.
- ▶ Couvrir la plaque 96 puits avec un film adhésif transparent approprié et les tubes réactionnels à l'aide de bouchons appropriés.
- ▶ Centrifuger les plaques de 96 puits à l'aide d'un rotor à microplaques pendant 30 secondes à environ 1000 x g (~ 3000 tr/min).

## 9. Programmation des instruments de PCR en temps réel

Pour obtenir des informations générales sur la préparation et la programmation des différents instruments de PCR en temps réel, veuillez consulter les manuels d'utilisation des instruments respectifs.

Pour des instructions sur la programmation relative à l'utilisation du kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 avec un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique (Chapitre 14. Assistance technique).

### 9.1 Paramètres

- Définir les paramètres suivants:

Paramètres	
Volume de réaction	30 µL
Vitesse de la rampe	par défaut
Référence passive	ROX™

## 9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores):

Cible	Nom du marqueur	Fluorophore (Reporter)	Désactivateur (Quencher)
ADN spécifique du <i>B. pertussis</i> (Cible IS481)	<i>B. pertussis</i> (Cible IS481)	FAM™	(aucun)
ADN spécifique du <i>B. parapertussis</i> (Cible IS1001)	<i>B. parapertussis</i> (Cible IS1001)	Cy®5	(aucun)
Internal Control (contrôle interne)	IC	JOE™	(aucun)

## 9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

- Définir le profil de température et l'acquisition du fluorophore:

	Etape	Nombre Cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:sec]
Dénaturation	Stationnaire	1	-	95	02:00
Amplification	Cyclique	45	-	95	00:15
			oui	58	00:45
			-	72	00:15

## 10. Analyse des données

Pour des informations de base concernant l'analyse des données sur un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de se référer au manuel de l'instrument concerné.

Pour des informations détaillées concernant l'analyse des données générées avec le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique (Chapitre 14. Assistance technique).

### 10.1 Validation des tests de diagnostic

#### 10.1.1 Validité des tests de diagnostic

Un test de diagnostic est **valide**, si les valeurs suivantes des contrôles sont obtenues:

Nom du Contrôle	Canal de détection		
	FAM™	Cy®5	JOE™
Contrôle positif [ <i>Bordetella pertussis</i> + <i>Bordetella parapertussis</i> ]	+	+	+/-*
Contrôle négatif	-	-	+

\* La présence ou l'absence d'un signal dans le canal JOE™ n'est pas pertinente pour la validité de l'essai.

#### 10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic

Un test de diagnostic est **invalide**, (i) si l'essai n'est pas complet ou (ii) si l'ensemble des conditions de contrôle pour un test de diagnostics valide n'est pas obtenu.

En cas d'**invalidité** du test de diagnostic, répéter le test avec les acides nucléiques purifiés restants ou recommencer depuis l'échantillon de départ.

## 10.2 Interprétation des résultats

### 10.2.1 Analyse qualitative

Canal de détection			Interprétation des résultats
FAM™	Cy®5	JOE™	
+	+	+*	ADN spécifique de <i>B. pertussis</i> (Cible IS481) et de <i>B. parapertussis</i> (Cible IS1001)
+	-	+*	ADN spécifique de <i>B. pertussis</i> (Cible IS481) détecté. <sup>1</sup>
-	+	+*	ADN spécifique de <i>B. parapertussis</i> (Cible IS1001) détecté. <sup>2</sup>
-	-	+	Aucun ADN spécifique de <i>B. pertussis</i> (Cible IS481) ou de <i>B. parapertussis</i> (Cible IS1001) a été détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables de l'ADN spécifique de <i>B. pertussis</i> (Cible IS481) ou de <i>B. parapertussis</i> (Cible IS1001).
-	-	-	Inhibition de la PCR ou défaillance des réactifs. Répéter le test à partir de l'échantillon d'origine ou bien prélever et tester un nouvel échantillon.

\* La détection du contrôle interne dans le canal de détection JOE™ n'est pas requise pour des résultats positifs dans le canal de détection FAM™ ou Cy®5. De fortes charges en ADN spécifique de *B. pertussis* (Cible IS481) et/ou de *B. parapertussis* (Cible IS1001) dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

<sup>1</sup> Un signal positif dans le canal FAM™ peut être aussi dû à la présence d'ADN de *Bordetella holmesii* ou de *B. bronchiseptica* dans l'échantillon.

<sup>2</sup> Un signal positif dans le canal Cy®5 peut être aussi dû à la présence d'ADN de *Bordetella bronchiseptica* dans l'échantillon.

## 11. Evaluation des performances

### 11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 est définie comme étant la concentration (copies/μL d'éluat) de molécules d'ADN spécifique de *B. pertussis* (Cible IS481) ou *B. parapertussis* (Cible IS1001) qui peuvent être détectées avec un taux supérieur à 95%. La sensibilité analytique a été déterminée en analysant des dilutions en série d'ADN quantifié de *B. pertussis* (Cible IS481) et *B. parapertussis* (Cible IS1001).

**Tableau 2:** Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique de *B. pertussis* (Cible IS481)

[C] initiale [copies/μL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
31,600	18	18	100
10,000	18	18	100
3,160	18	18	100
1,000	18	18	100
0,316	18	14	78
0,100	18	8	44
0,032	18	8	44
0,010	18	0	0
0,003	18	0	0

**Tableau 3:** Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique de *B. parapertussis* (Cible IS1001)

[C] initiale [copies/μL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
31,600	18	18	100
10,000	18	18	100
3,160	18	18	100
1,000	18	18	100
0,316	18	14	78
0,100	18	9	50
0,032	18	2	11
0,010	18	0	0
0,003	18	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 a été déterminée par analyse Probit.

- Pour la détection de l'ADN spécifique de *B. pertussis* (Cible IS481), la sensibilité analytique est de 0.74 copies/μL d'éluat [Intervalle de confiance à 95% (CI) : 0.39 - 2.08 copies/μL]
- Pour la détection de l'ADN spécifique de *B. parapertussis* (Cible IS1001), la sensibilité analytique est de 0.60 copies/μL d'éluat [Intervalle de confiance à 95% (CI) : 0.35 - 1.54 copies/μL]

### 11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 est assurée par une sélection minutieuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les séquences de ces derniers ont été comparées aux séquences publiques disponibles afin de s'assurer que toutes les souches intéressantes de *Bordetella* seront détectées.

La spécificité analytique du kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 a été évaluée en testant un panel d'ARN/ADN génomique extrait d bactéries liés à *B. pertussis* et *B. parapertussis*, et de pathogènes causant des symptômes similaires.

Le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 n'a présenté aucune réaction croisée avec l'un des pathogènes spécifiés ci-dessous:

- Adénovirus humain de sérotype 1
- Adénovirus humain de sérotype 4
- Entérovirus, virus Coxsackie A3
- Métapneumovirus humain types A
- Métapneumovirus humain types B
- Virus Influenza A
- Virus Influenza B
- Virus Parainfluenza humain de type 1
- Virus Parainfluenza humain de type 2
- Virus Parainfluenza humain de type 3
- Virus Parainfluenza humain de type 4 a/b
- Virus respiratoire syncytial A
- Virus respiratoire syncytial B
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Chlamydomphila psittaci*
- *Corynebacterium diptheriae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Mycobacterium avium*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Neisseria meningitidis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Bordetella petrii*
- *Bordetella trematum*
- *Bordetella hinzii*
- *Bordetella avium*
- *Bordetella bronchiseptica* IS481-

### 11.3 Précision

Les données de précision du kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 ont été déterminées comme étant la variabilité intra-essai (variabilité au sein d'une expérience), la variabilité inter-essai (variabilité entre différentes expériences) et la variabilité inter-lot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été calculée en combinant les trois analyses.

Les données de variabilité sont exprimées en termes de valeur moyenne, écart type et de coefficient de variation, sur la base des valeurs de cycle seuil ( $C_t$ ). Pour déterminer la variabilité intra-essai, la variabilité inter-essai et la variabilité inter-lot, au moins six réplicats par échantillon ont été analysés.

**Tableau 4:** Données de précision pour l'ADN spécifique du *B. pertussis* (Cible IS481) et *B. parapertussis* (Cible IS1001)

<i>B. pertussis</i> (Cible IS481) et <i>B. parapertussis</i> (Cible IS1001)		Valeurs $C_t$ moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	<i>B. pertussis</i> (Cible IS481)	30,84	0,12	0,40
	<i>B. parapertussis</i> (Cible IS1001)	30,44	0,14	0,46
Variabilité inter-essai	<i>B. pertussis</i> (Cible IS481)	30,83	0,12	0,37
	<i>B. parapertussis</i> (Cible IS1001)	30,63	0,20	0,65
Variabilité inter-lot	<i>B. pertussis</i> (Cible IS481)	30,76	0,12	0,38
	<i>B. parapertussis</i> (Cible IS1001)	30,45	0,10	0,34
Variabilité totale	<i>B. pertussis</i> (Cible IS481)	30,79	0,12	0,40
	<i>B. parapertussis</i> (Cible IS1001)	30,56	0,20	0,65

**Tableau 5:** Données de précision pour le contrôle interne

Contrôle interne	Valeurs $C_t$ moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	27,05	0,15	0,55
Variabilité inter-essai	26,71	0,16	0,61
Variabilité inter-lot	26,94	0,17	0,63
Variabilité totale	26,82	0,23	0,84

## 12. Limites

- Une stricte conformité aux instructions d'utilisation est nécessaire afin d'obtenir les meilleurs résultats.
- L'utilisation de ces produits est limitée au personnel compétent et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel pour garantir le bon fonctionnement de ce test. Une attention particulière doit être apportée à la préparation des échantillons afin de préserver la pureté des composants du kit. Tous les réactifs doivent faire l'objet d'une surveillance étroite afin d'éviter des impuretés et des contaminations. Tout réactif suspect doit être éliminé.
- Il est nécessaire de respecter les procédures de prélèvement, de transport, de conservation et de traitement des échantillons afin d'assurer les performances optimales du test.
- Ce test n'est pas destiné à être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction des acides nucléiques doivent être employées avant son utilisation.
- La présence d'inhibiteurs de PCR (p.ex. héparine) est susceptible d'entraîner des résultats faussement négatifs ou erronés.
- De potentielles mutations dans les zones cibles du génome du virus couvertes par l'amorce et/ou les sondes du test peuvent empêcher la détection de pathogènes.
- Le RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic. En conséquence, ses résultats doivent être interprétés en prenant en considération l'ensemble des symptômes cliniques et des résultats obtenus en laboratoire.
- De nombreuses espèces de *Bordetella* portent des éléments d'ADN transposables, nommés séquences d'insertion (IS). En particulier, la séquence IS481 est présente en grand nombre de copies dans le génome de *Bordetella pertussis* et la séquence IS1001 apparaît dans celui de *Bordetella parapertussis*. L'élément transposable IS481 est également trouvé en nombre modéré de copies dans le génome de *Bordetella holmesii* et avec une très faible incidence dans le génome de certaines souches de

*Bordetella bronchiseptica*. L'élément transposable IS1001 peut également être trouvé en faible nombre de copies dans le génome de *Bordetella bronchiseptica*.

## 13. Contrôle qualité

Conformément au système de management de la qualité d'Altona Diagnostics GmbH, certifié ISO EN 13485, chaque lot du RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 est testé selon des spécifications prédéfinies afin de garantir une qualité constante des produits.

## 14. Assistance technique

Pour obtenir une assistance sur nos produits, merci de contacter notre support technique:

**e-mail:** [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)  
**téléphone:** +49-(0)40-5480676-0

## 15. Bibliographie

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

## 16. Marques déposées et responsabilité

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Les noms et marques déposés cités dans ce document, même si non mentionnés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

















Le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 est un kit de diagnostic *in vitro*, marqué CE conformément à la Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs de diagnostic *in vitro*.

Produit non homologué pour la vente par Santé Canada et n'ayant pas fait l'objet d'une notification (510(k)) ou d'une approbation (PMA) de pré-commercialisation par la FDA.

Produit distribué dans certains pays uniquement.

© 2017 altona Diagnostics GmbH; tous droits réservés.

## 17. Explications des symboles

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Numéro de lot
	Couleur du bouchon
	Référence produit
	Contenu
	Nombre
	Composant
	Code article international
	Lire les instructions d'utilisation
	Contient la quantité suffisante pour réaliser "n" tests (rxns)
	Limites de température
	À utiliser avant
	Fabricant
	Attention
	Note
	Version

**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

