

Mode d'emploi

RealStar[®]

Bordetella PCR Kit 1.0

09/2022 FR

RealStar®

Bordetella PCR Kit 1.0

Pour utilisation avec

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)



531013



96



09 2022



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

Table des matières

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

11.	Evaluation des performances	22
11.1	Sensibilité analytique	22
11.2	Spécificité analytique	24
11.3	Précision	25
12.	Restrictions	26
13.	Contrôle qualité.....	27
14.	Assistance technique	27
15.	Bibliographie	28
16.	Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	28
17.	Explications des symboles	29

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

Tableau 1: Composants du kit

Couleur du capuchon	Composant	Nombre de fioles	Volume [µl/fiole]
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 = contrôle positif

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

3. Stockage

- Le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 est livré sur de la neige 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 °C et -15 °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 °C et +8 °C ne doit pas excéder une période de 2 heures.
- Le Master A et le Master B doivent être conservés à l'abri de la lumière.

4. Matériel requis non fourni

- Instrument PCR en temps réel approprié (voir le chapitre 6.1 Instruments de PCR en temps réel)
- Système ou kit d'extraction d'acide nucléique approprié (voir le chapitre 8.1 Préparation de l'échantillon)
- Centrifugeuse de bureau avec un rotor pour les tubes de réaction de 2 ml
- Centrifugeuse à rotor pour plaques microtitre en cas d'utilisation avec des plateaux de réaction à 96 puits
- Agitateur vortex
- Plateaux de réaction à 96 puits ou tubes de réaction appropriés avec matériau de fermeture (optique) correspondant
- Pipettes (réglables)
- Pointes de pipette avec filtres (jetables)
- Gants non poudrés (jetables)

REMARQUE



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

REMARQUE



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). Ces séquences d'insertion sont généralement présentes en plusieurs copies par génome (voir le Tableau 2), ce qui permet de concevoir des systèmes PCR présentant une sensibilité élevée.

Tableau 2: Séquences d'insertion de *Bordetella*, l'IS481 et l'IS1001, adaptées de Loeffelholz [6]

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

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

² Isolats de dérivés humains de *B. bronchiseptica* seulement.

³ Un des 73 isolats de dérivés humains a été détecté positif.

⁴ 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].

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, Debruyne 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 [Internal Control (contrôle interne)] afin d'identifier d'éventuelles inhibitions de la PCR et de confirmer l'intégrité des réactifs du kit.

Le technologie de PCR en temps réel utilise la 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 *Bordetella pertussis* (Cible IS481) sont marquées par le fluorophore FAM™, tandis que les sondes spécifiques de l'ADN de *Bordetella parapertussis* (Cible IS1001) sont marquées par un fluorophore qui montrent les mêmes caractéristiques que le Cy5. La sonde spécifique du contrôle interne (IC) 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 *Bordetella pertussis* (Cible IS481), de *Bordetella parapertussis* (Cible IS1001) et de l'Internal Control (contrôle interne) dans les canaux correspondants de l'instrument de PCR en temps réel.

Le test est constitué de deux processus dans un seul tube :

- Amplification par PCR de l'ADN cible et de l'Internal Control (contrôle interne)
- Détection simultanée des amplicons de PCR par des sondes marquées par fluorescence

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

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

Internal Control = contrôle interne

Positive Control = contrôle positif

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

Master A et Master B contiennent tous les composants (tampon de PCR, polymérase d'ADN, sel de magnésium, amorces et sondes) afin de réaliser l'amplification par PCR et la détection spécifiques de l'ADN de *Bordetella pertussis* (Cible IS481) et de l'ADN de *Bordetella 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 :

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

7. Mises en garde et précautions

Lire attentivement le mode d'emploi avant d'utiliser le produit.

- Avant la première 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*.
- Les échantillons doivent toujours être traités comme étant infectieux et / ou présentant un danger biologique conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire.

- Porter des gants jetables non talqués, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.
- Éviter 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. Portez toujours des gants jetables dans chacune des zones de travail et changez-en avant de pénétrer 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. Procédure

8.1 Préparation de l'échantillon

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

La qualité de l'ADN extrait a un impact considérable sur les performances du système de test tout entier. Il est recommandé de vérifier que le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Les kits et systèmes suivants sont adaptés à l'extraction des acides nucléiques :

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (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 le kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 doit être validée par l'utilisateur.

En cas d'utilisation d'une procédure de préparation de l'échantillon dans une colonne d'élution comprenant des tampons de lavage contenant de l'éthanol, il est fortement recommandé d'effectuer une étape de centrifugation supplémentaire pendant 1 minute à environ 17 000 x g (~ 13 000 tr/min) à l'aide d'un nouveau tube de collecte avant l'élution des acides nucléiques.

ATTENTION



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'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel.

ATTENTION

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 (voir le chapitre 14. Assistance technique).

8.2 Préparation du master mix

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 Internal Control (contrôle interne, IC) 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 l'IC est utilisé comme un contrôle d'inhibition de la PCR, mais non comme contrôle de préparation de l'échantillon, le master mix 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
Volume de master mix	21 µl	252 µl

- Si l'IC est utilisé comme contrôle de préparation de l'échantillon, et d'inhibition de la PCR, l'IC 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, l'IC ne doit **jamais** être ajouté directement à l'échantillon de prélèvement. L'IC doit toujours être ajouté au mélange échantillon/Lysis Buffer (tampon de lyse). Le volume de l'IC à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'éluion, dont il représente 10 %. Par exemple, si les acides nucléiques doivent être élués dans 60 µl de tampon d'éluion ou d'eau, 6 µl de l'IC par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/Lysis Buffer (tampon de lyse).
- ▶ Si l'IC a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, le master mix 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
Volume de master mix	20 µl	240 µl

ATTENTION

Si l'IC [Internal Control (contrôle interne)] a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, au moins le contrôle négatif doit inclure l'IC.

ATTENTION

Quelle que soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, ne jamais ajouter l'IC directement à l'échantillon.

8.3 Préparation de la réaction

- ▶ Pipeter 20 µl de master mix 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 (contrôle positif ou négatif).

Préparation de la réaction	
Master mix	20 µl
Échantillon ou contrôle	10 µl
Volume total	30 µl

- ▶ S'assurer que chaque contrôle positif et au moins un contrôle négatif sont utilisés par Master Mix et par essai.
- ▶ Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le master mix par pipetage.
- ▶ Couvrir la plaque 96 puits avec un film adhésif transparent approprié et les tubes réactionnels à l'aide de bouchons appropriés.
- ▶ Centrifugez le plateau de réaction à 96 puits dans une centrifugeuse équipée d'un rotor pour microplaques pendant 30 secondes à environ 1 000 x g (~ 3 000 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 (voir le chapitre 14. Assistance technique).

9.1 Paramètres

- Définir les paramètres suivants :

Paramètres	
Volume de réaction	30 µl
Taux de rampe	Par défaut
Référence passive	ROX™

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores) :

Cible	Nom du détecteur	Rapporteur	Extincteur
ADN spécifique du <i>Bordetella pertussis</i> (Cible IS481)	Target IS481	FAM™	(Aucun)
ADN spécifique du <i>Bordetella parapertussis</i> (Cible IS1001)	Target IS1001	Cy5	(Aucun)
Internal Control (contrôle interne)	Internal Control	JOE™	(Aucun)

9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

- Définir le profil de température et l'acquisition de la coloration :

	Étape	Répétitions de cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:s]
Dénaturation	Attente	1	-	95	02:00
Amplification	Cyclage	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 des instruments de PCR en temps réel spécifiques, 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 (voir le chapitre 14. Assistance technique).

10.1 Validation des tests de diagnostic

10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif)

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

ID du contrôle	Canal de détection		
	FAM™	Cy5	JOE™
Contrôle positif [<i>Bordetella pertussis</i> et <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 (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **invalide**, (i) si l'essai n'est pas complet ou (ii) si l'ensemble des conditions de contrôle pour un test de diagnostic **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™	Cy5	JOE™	
+	+	+*	ADN spécifique de <i>Bordetella pertussis</i> et de <i>Bordetella parapertussis</i> détecté. ^{1,2}
+	-	+*	ADN spécifique de <i>Bordetella pertussis</i> détecté. ¹
-	+	+*	ADN spécifique de <i>Bordetella parapertussis</i> détecté. ²
-	-	+	Aucun ADN spécifique de <i>Bordetella pertussis</i> ou de <i>Bordetella parapertussis</i> a été détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables de l'ADN spécifique de <i>Bordetella pertussis</i> ou de <i>Bordetella parapertussis</i> .
-	-	-	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 de l'Internal Control (contrôle interne) dans le canal de détection JOE™ n'est pas requise pour des résultats positifs dans le canal de détection FAM™ ou Cy5. De fortes charges en ADN spécifique de *Bordetella pertussis* (Cible IS481) et/ou de *Bordetella parapertussis* (Cible IS1001) dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

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

² Un signal positif dans le canal Cy5 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) des molécules d'ADN spécifique de *Bordetella pertussis* (Cible IS481) ou *Bordetella 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 *Bordetella pertussis* (Cible IS481) et *Bordetella parapertussis* (Cible IS1001).

Tableau 3: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique de *Bordetella pertussis* (Cible IS481)

Conc. d'entrée [copies/μl]	Nombre de répliques	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 4: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique de *Bordetella parapertussis* (Cible IS1001)

Conc. d'entrée [copies/μl]	Nombre de répliques	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 *Bordetella 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 *Bordetella 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 la 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 *Bordetella pertussis* et *Bordetella 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 A2
- Métapneumovirus humain types B2
- 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 diphtheriae*
- *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

La précision du kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 a été déterminée selon sa variabilité intra-essai (variabilité au sein d'une expérience), sa variabilité inter-essai (variabilité entre différentes expériences) et sa variabilité inter-lot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été déterminée en combinant les 3 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 5: Données de précision pour l'ADN spécifique du *Bordetella pertussis* (Cible IS481) et *Bordetella parapertussis* (Cible IS1001)

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

Tableau 6: Données de précision pour le contrôle interne

Contrôle interne	Cycle seuil moyen (C_t)	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. Restrictions

- Un respect strict du mode d'emploi est nécessaire pour obtenir des résultats optimaux.
- L'utilisation de ce produit est réservée au personnel ayant reçu des instructions et une formation spécifiques en techniques de PCR en temps réel et en procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel au bon fonctionnement de cet essai. Il convient de faire preuve de la plus grande vigilance pour préserver la pureté des composants du kit et des configurations de réaction. Tous les réactifs doivent faire l'objet d'une surveillance étroite pour détecter la présence d'impuretés et toute contamination éventuelle. Tout réactif suspect doit être jeté.
- Les procédures de prélèvement des échantillons, de transport, de stockage et de traitement appropriées doivent être respectées pour un fonctionnement optimal de ce test.
- Cet essai ne doit pas être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction des acides nucléiques doivent être appliquées avant d'utiliser cet essai.
- La présence d'inhibiteurs de la PCR (p. ex. l'héparine) peut donner une des résultats faussement négatifs ou non valides.
- De potentielles mutations dans les régions cibles du génome de *Bordetella pertussis* (Cible IS481) et d *Bordetella parapertussis* (Cible IS1001) couvertes par les amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent empêcher de détecter la présence des pathogènes.
- Comme pour tout test de diagnostic, les résultats obtenus avec le RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de 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 gestion de la qualité d'Altona Diagnostics GmbH certifié EN ISO 13485, chaque lot du kit RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 est testé sur la base de spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

14. Assistance technique

Pour bénéficier d'un service après-vente, veuillez contacter notre service d'assistance technique aux coordonnées suivantes :

e-mail : 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. 10^e édition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, 3^e édition. Mosby, 2010.

16. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité

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

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 diagnostic doté du marquage CE conforme à la Directive européenne 98/79/CE relative aux diagnostics *in vitro*.



Produit non autorisé ou approuvé par la FDA.

Ce produit n'est pas disponible dans tous les pays.

© 2022 altona Diagnostics GmbH ; tous droits réservés.

17. Explications des symboles

Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Code du lot
	Couleur du capuchon
	Numéro de catalogue
	Contenu
	Numéro
	Composant
	Code article international
	Consultez le mode d'emploi
	Contenu suffisant pour « n » tests/réactions (rxns)
	Limites de température
	Date de péremption
	Fabricant
	Attention : Attire l'attention sur des instructions ou procédures qui, si elles ne sont pas correctement respectées, peuvent entraîner des blessures corporelles ou nuire au bon fonctionnement du produit. Contactez l'assistance technique d'Altona Diagnostics pour obtenir de l'aide.

Symbole	Explication
	Remarque : Les informations fournies à l'utilisateur sont utiles mais non essentielles à la tâche à accomplir.
	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

www.altona-diagnostics.com

