



**Pertussis
DNA Amplification Assay**

DNA Amplification Assay for the Detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swab samples

REF 280750

IVD In vitro diagnostic medical device

INTENDED USE

The *illumigene* Pertussis DNA Amplification Assay, performed on the *illumipro-10™*, is a qualitative in vitro diagnostic test for the direct detection of *Bordetella pertussis* in human nasopharyngeal swab samples taken from patients suspected of having respiratory tract infection attributable to *Bordetella pertussis*.

The *illumigene* Pertussis assay utilizes loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP) technology to detect *Bordetella pertussis* by targeting the IS481 insertional element of the *Bordetella pertussis* genome. The IS481 insertional element can also be found in *Bordetella holmesii* and some *Bordetella bronchiseptica* strains. While respiratory illness caused by *B. bronchiseptica* is infrequent in humans, mixed outbreaks involving *B. holmesii* and *B. pertussis* have been reported. Positive results reported for DNA amplification assays targeting IS481 may be consistent with the presence of either *B. holmesii* or *B. pertussis*. When clinical factors suggest that *B. pertussis* may not be the cause of respiratory infection, other clinically appropriate investigation(s) should be carried out in accordance with published guidelines.

Results from the *illumigene* Pertussis assay should be used in conjunction with information obtained during the patient's clinical evaluation as an aid in diagnosis of respiratory infection.

illumigene Pertussis is intended for use in hospital, reference or state laboratory settings. The device is not intended for point-of-care use.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The *illumigene* Pertussis DNA Amplification Assay is based on loop-mediated amplification (LAMP)^{1,2} technology. The assay targets a 198 base pair (bp) sequence of the *Bordetella pertussis* genome residing in a region of the IS481 insertional element sequence.

Loop-mediated amplification uses specially designed primers to provide for specific and continuous isothermal DNA amplification. A by-product of this amplification is the formation of magnesium pyrophosphate, which forms a white precipitate leading to a turbid reaction solution. Reaction solution absorbance characteristics are monitored by the Meridian *illumipro-10* Incubator/Reader. Changes in reaction solution absorbance characteristics created by precipitation of magnesium pyrophosphate indicate the presence of target DNA. The absence of target DNA results in no significant change in sample absorbance.

The *illumigene* Pertussis kit includes *illumigene* Pertussis Assay Control/Negative Control Reagent, *illumigene* Pertussis Test Devices, *illumigene* Pertussis Sample Buffer and Mineral Oil. The *illumigene* Assay Control/Negative Control, used for specimen dilution and preparation, is a Tris-buffered solution containing formalin-treated *E. coli* harboring *Staphylococcus aureus* DNA. The *illumigene* Pertussis Test Device contains one lyophilized amplification bead in each of two chambers: a TEST chamber with IS481-specific primers and a CONTROL chamber with *S. aureus*-specific primers. The *S. aureus* DNA in the Assay Control/Negative Control Reagent and the *S. aureus*-specific primers in the CONTROL chamber function as the Internal Control for the assay. During specimen preparation, each patient specimen is added to the Assay Control/Negative Control Reagent and combined with the *S. aureus* DNA prior to amplification. Addition of *S. aureus* DNA to the patient sample allows for parallel processing of target DNA and Control DNA through amplification and detection. The Internal Control monitors amplification inhibition, assay reagent performance and sample processing effectiveness. The Control *S. aureus* target must be amplified and detected in the final reaction or the test is considered invalid and patient results are not reported.

The *illumipro-10* monitors changes in absorbance characteristics by measuring transmission of light through the Test and Control reaction solutions. Light transmission is checked at the assay Run Start (Signal_{initial}, S_i) and at the assay Run End (Signal_{final}, S_f). The *illumipro-10* calculates the change in light transmission between Run End and Run Start (S_f:S_i) and compares the ratio to a fixed cut-off value.

Fixed cut-off values for the TEST chamber are used to report sample results. TEST chamber S_f:S_i ratios less than 82% are reported as 'POSITIVE'; TEST chamber S_f:S_i ratios greater than or equal to 82% are reported as 'NEGATIVE'. Numerical values are not reported.

Fixed cut-off values for the CONTROL chamber are used to determine validity. CONTROL chamber S_f:S_i ratios less than 90% are considered valid and allow for reporting of TEST chamber results (POSITIVE, NEGATIVE). CONTROL chamber S_f:S_i ratios greater than or equal to 90% are considered invalid and prevent reporting of TEST chamber results. Invalid CONTROL chamber reactions are reported as 'INVALID'. Numerical values are not reported.

More stringent cut-off criteria are applied to the CONTROL chamber reaction to ensure amplification is not inhibited, reagents are performing as intended and that sample processing was performed appropriately.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

Bordetella pertussis is a human pathogen exclusively responsible for the endemic respiratory disease whooping cough (pertussis); a publically reportable disease that impacted over 200,000 people worldwide in 2012. Whooping cough is currently the only disease in the US that displays an increasing trend of reportable cases and substantial morbidity despite the availability of a vaccine.³ The US Centers for Disease Control (CDC) reported approximately 48,300 cases of pertussis in 2012, an average of 15.4 cases per 100,000 people in the United States.⁴ Recent pertussis outbreaks have indicated waning immunity in children after receiving the final booster acellular vaccine dose, allowing for susceptibility of pertussis infection in both vaccinated and unvaccinated populations of children ages 7-11.^{5,6}

Pertussis outbreaks are particularly challenging to control as the early stages of disease resemble other respiratory infections and patients can remain highly infectious for up to 5 weeks after onset of symptoms.³ In addition, pertussis is not officially diagnosed until the presence of the characteristic "whooping" cough that is displayed almost 2 weeks post-symptom onset.³ Clinical diagnosis of pertussis can be performed using culture, serology, or nucleic acid amplification tests (NAAT). While culture is highly specific, sensitivity is low, results can take up to 7 days, and the viable cells required for culture decrease with disease progression (after 2 weeks of symptom onset).⁷ Unlike culture, NAAT assays can provide rapid test results and do not require viable bacteria. However, bacterial DNA must still be present in the nasopharynx (up to 4 weeks after cough onset) in order to prevent falsely-negative results.⁸ In addition, only symptomatic patients with cough should be tested by NAAT in order to prevent false positive results by asymptomatic close contacts.⁹ Serology can only be used for diagnosis in late stages of disease, approximately 2-8 weeks after cough onset.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.

1. ***illumigene* Pertussis Assay Control/Negative Control Reagent:** Tris-buffered solution containing formalin-treated *E. coli* harboring plasmid containing a segment of the *S. aureus* genome and sodium azide (0.09%) as a preservative.
2. ***illumigene* Pertussis Test Device:** Two-chambered device containing lyophilized amplification reagents (DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates), and either IS481-specific primers (TEST Chamber) or control primers (CONTROL Chamber).
3. ***illumigene* Pertussis Sample Buffer:** Tris-EDTA solution containing sodium azide (0.09%) as a preservative.
4. **Mineral Oil**

MATERIALS PROVIDED SEPARATELY

illumigene Pertussis External Control Kit, Catalog Number: 279930

MATERIALS NOT PROVIDED

1. Disposable latex gloves, powder free
 2. DNase/RNase-free, aerosol resistant pipette tips
 3. Specimen Collection and transport system
- Nasopharyngeal Swabs:** Polyester (Minimum Capacity 18µL, e.g. Puritan Medical Products Catalog 25-801-D50); Flocked nylon (Minimum Capacity 31 µL, e.g. Puritan Medical Products Catalog 25-201-R50); or Rayon (Minimum Capacity 69 µL, e.g. Copan 503CS01).
- Non-nutritive Transport Medium:** Liquid Amies, without charcoal; or Liquid Stuart (Maximum Volume: 1.2 mL)

EQUIPMENT NOT PROVIDED

1. Dry-bath with 12 mm heat block capable of 95 C
2. Digital thermometer with Max/Min Temperature Memory (eg, Traceable® Lollipop™ Waterproof/Shockproof Thermometer)
3. Vortex mixer
4. Interval timer
5. Micropipette capable of dispensing 50 µL
6. *illumipro-10*, Meridian Bioscience, Inc. Catalog Number: 610172

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Do not interchange Assay Control/Negative Control Reagent or Test Devices between lots. Sample Buffer and Mineral Oil are interchangeable provided they are within assigned expiration dates when used.
3. Follow Biosafety Level 2 and Good Laboratory practices during testing.⁹ Treat all specimens and used Test Devices as capable of transmitting infectious agents. Do not eat, drink or smoke in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. Wear disposable gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards.
5. Quality Control Programs for Molecular Testing Laboratories, including proper use and care of equipment, should be employed.¹⁰
6. The *illumigene* Pertussis Test Device contains lyophilized reagents. The protective pouch should not be opened until ready to perform the assay.
7. The *illumigene* Pertussis Test Device includes a latch feature that is designed to prevent contamination of the test area with amplification product. Do NOT use Test Devices with broken latches.
8. Dispose of used *illumigene* Test Devices immediately after processing, leaving the device latch securely in place. Do NOT open the Test Device after processing. Opening the device after amplification may result in contamination of the test area with amplification product.

RISK AND SAFETY PHRASES

There are no known hazards associated with this product.

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-30 C.

REAGENT PREPARATION

Ensure kit reagents are at room temperature (21-30 C) before use. Incorrect results may be obtained if reagents are not brought to room temperature prior to use.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Sample type: Nasopharyngeal swabs

Sample Collection: Nasopharyngeal swab specimen collection should be performed in accordance with institutional procedures for collection of clinical specimens for *Bordetella pertussis* infection. Nasopharyngeal swab samples should be collected with suitable swab types (e.g. Polyester, Flocked Nylon or Rayon).

Place swab(s) in non-nutritive transport medium (eg, Liquid Amies, without charcoal or Liquid Stuart) or store unpreserved in a sterile tube without medium.

Unpreserved samples or samples stored in transport media should be tested as soon as possible, but may be held at room temperature (21–30 C) for up to 5 days or refrigerated (2–8 C) for up to 7 days prior to testing. Do not freeze samples.

SPECIMEN PREPARATION:

NOTE: Ensure that the *illumipro-10* is powered on and required performance verifications have been completed prior to initiation of SPECIMEN PREPARATION. Refer to the *illumipro-10* Operator's Manual for further information regarding instrument set-up and operation.

1. Place the swab specimen in a labeled Sample Buffer tube. Cut the swab shaft to ensure sample fits in the tube. Elute the sample by vortexing for 45-60 seconds. Remove and discard the swab. **Eluted samples may be held at room temperature (21-30 C) for up to 48 hours or refrigerated (2-8 C) for up to 7 days prior to testing.**
2. Add 50 µL of eluted sample to a labeled Assay Control/Negative Control Tube and cap.
3. Repeat Specimen Preparation Steps for all samples to be processed.
4. Vortex each Assay Control/Negative Control Tube containing eluted sample for approximately 10 seconds.
5. Heat each Sample/Control mixture in a dry-bath/heat block at 95 ± 5 C for 10 ± 2 minutes. Monitor heat-treatment step with digital thermometer and interval timer.
6. Remove each Sample/Control tube from the dry-bath/heat block. Heat treated samples may be held at room temperature (21-30 C) for up to 15 minutes prior to testing.
7. Vortex for approximately 10 seconds.

TEST PROCEDURE

NOTE: A maximum of 10 samples can be processed in a single *illumipro-10* run.

1. Remove 1 *illumigene* Pertussis Test Device from its protective pouch per sample. Carefully open the device, holding the chambers such that the lyophilized reagent will not fall out upon opening.
2. Transfer 50 µL of the heat-treated sample to the TEST chamber (White Bead) of the *illumigene* Test Device. Take care not to introduce air to the reaction mixture. Using a new pipette tip, transfer 50 µL of the heat-treated sample to the CONTROL chamber (Yellow Bead) of the *illumigene* Test Device. Take care not to introduce air to the reaction mixture.
3. Add 1 drop of Mineral Oil to both the TEST chamber and CONTROL chamber. Close the *illumigene* Test Device and fasten the latch securely.
4. Tap device on the bench top or mix to remove air bubbles. Carefully examine the Test Device for rehydration of the Control/Test Bead, for air bubbles left in the chamber and liquid in the top of the device. If undissolved beads, air bubbles or liquid in the top of the device are noted, tap the device on the bench top and repeat visual inspection. Amplification and detection should be initiated within 15 minutes.
5. Insert the *illumigene* Test Device into the *illumipro-10* and initiate amplification reaction and detection. Results will be displayed at the conclusion of the run.

INTERPRETATION OF RESULTS

| Sample ID | Reported Result | Interpretation |
|------------------|-----------------|---|
| Patient Specimen | POSITIVE | Sample contains <i>Bordetella pertussis</i> target DNA. |
| | NEGATIVE | No <i>Bordetella pertussis</i> DNA detected. |
| | INVALID | No reportable result. Repeat the test using the original sample. Inhibitory patient specimen, improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure. |
| Positive Control | POSITIVE | Valid positive control result. Reagents active at time of use, <i>illumipro-10</i> performing correctly. |
| | NEGATIVE | Incorrect control result. Repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor. |
| | INVALID | No reportable result. Repeat entire assay run using original samples. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure. |
| Negative Control | POSITIVE | Incorrect control result. Repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor. |
| | NEGATIVE | Valid negative control result. Reagents active at time of use, <i>illumipro-10</i> performing correctly. |
| | INVALID | No reportable result. Repeat entire assay run using original samples. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure. |
| EMPTY WELL | NONE | No <i>illumigene</i> Test Device in the <i>illumipro-10</i> Well. OR The <i>illumigene</i> Test Device present is compromised due to sample preparation failure, dirty device or improperly seated device. Repeat the test using original sample. |

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

1. Each device contains an internal control chamber that controls for amplification inhibition, assay reagents and sample processing effectiveness.
2. The heat-treatment step is monitored with an external thermometer and interval timer. Use the max/min temperature memory of the thermometer to ensure that a temperature of 95 ± 5 C is maintained. Use the interval timer to ensure that heat-treatment duration is 10 ± 2 minutes.
3. Good laboratory practice recommends the use of control materials. Users should follow the appropriate federal, state and local guidelines concerning the running of external quality controls.
4. *illumigene* Pertussis External Control Reagents are supplied separately (Catalog 279930). It is recommended that reactivity of each new lot and each new shipment of *illumigene* Pertussis be verified on receipt and before use. External control tests should be performed thereafter in accordance with appropriate federal, state and local guidelines. The *illumigene* Pertussis test kit should not be used in patient testing if the external controls do not produce the correct results.
5. A separate device must be used for each external control reagent.

EXPECTED VALUES

Overall incidence of *B. pertussis* in prospectively collected and tested specimens during the period of this study was approximately 10.0% (51/508).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. This product can be used only with the *illumipro-10* instrument.
2. The *illumigene* Pertussis DNA assay is a qualitative assay and does not provide quantitative values or information about organism load.
3. This device has not been evaluated for monitoring treatment of *Bordetella pertussis* infections.
4. Respiratory infections can be caused by *Bordetella pertussis* as well as other pathogens. Positive results do not preclude coinfection with other respiratory pathogens.
5. The detection of nucleic acid is dependent upon proper specimen collection, handling, transportation, storage and preparation. Failure to observe proper procedure in any one of these steps can lead to incorrect results.
Prevalence of *B. pertussis* infection will affect the test's predictive value.
7. Organism nucleic acids may persist *in vivo*, independent of organism viability. The *illumigene* Pertussis assay does not distinguish between viable and nonviable organisms.
8. As with all molecular based diagnostic tests, (A) False negative results may occur from the presence of inhibitors, technical error, sample mix-up or low numbers of organisms in the clinical specimen; (B) False positive results may occur from the presence of cross-contamination by target organisms, their nucleic acids or amplified product, and from non-specific signals.
9. The *illumigene* Pertussis assay targets the IS481 insertional element of the *Bordetella* genome. The IS481 insertional element is present in *B. pertussis*, *B. holmesii* and some strains of *B. bronchiseptica*.
10. Acetyl salicylic acid, as found in aspirin, produced invalid results when tested at concentrations above 5 mg/mL during *B. pertussis* strain BAA-589 Limit of Detection replicate testing.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The *illumigene* Pertussis DNA Amplification Assay was evaluated from December 2012 to July 2013 by independent clinical test sites representing geographically distinct regions throughout the United States. A total of 729 qualified nasopharyngeal (NP) swab specimens collected from patients suspected of respiratory infections due to *B. pertussis* were evaluated with the test device to establish performance characteristics. Specimens were leftover, de-identified specimens that had previously been submitted for routine *B. pertussis* testing. Specimens included in performance evaluation were prospective (never frozen) and retrospective (frozen prior to *illumigene* testing). The performance of *illumigene* Pertussis was compared to a Composite Reference Method that included two manufacturer validated, IS481-targeted real-time PCR assays followed by bi-directional sequencing of amplicon from PCR positive specimens. The calculated cycle threshold (Ct) value for each PCR assay was determined to be 35.6 at the assay limit of detection (PCR1: 3750 CFU/mL, PCR2: 4522 CFU/mL). Specimens were considered positive when results from either comparator PCR assay produced Ct values below 35.6 and the corresponding bi-directional sequencing result was positive. Specimens were considered to be negative when results from both comparator PCR assays produced Ct values above 35.6. A total of 508 (69.7%) prospective and 221 (30.3%) retrospective specimens were tested. Invalid results were obtained for 13 specimens (1.8%); two specimens remained invalid after repeat testing. Two prospective and two retrospective specimens produced indeterminate comparator PCR results. Table 1 summarizes *illumigene* performance characteristics; Table 2 describes *illumigene* performance characteristics by Site.

Table 1. *illumigene* Assay Performance

| Specimen Description | Positive Specimens | | | Negative Specimens | | | Invalid Results* |
|------------------------------------|----------------------------------|--------------|---------------------|----------------------------------|--------------|---------------------|------------------|
| | <i>illumigene</i> vs. Comparator | PPA | 95% CI | <i>illumigene</i> vs. Comparator | NPA | 95% CI | |
| Composite Method Comparator | | | | | | | |
| Prospective | 30/32 | 93.8% | 79.9 – 98.3% | 451/472 | 95.6% | 93.3 – 97.1% | 2 (13) |
| Retrospective | 21/21 | 100.0% | 84.5 – 100.0% | 192/198 | 97.0% | 93.5 – 98.6% | 0 |
| TOTAL | 51/53 | 96.2% | 87.2 – 99.0% | 643/670 | 96.0% | 94.2 – 97.2% | 2 (13) |

* 11/13 initial invalid specimens produced valid results upon repeat testing

Table 2. *illumigene* Assay Performance by Site

| Specimen Description | Positive Specimens | | | Negative Specimens | | | Invalid Results* |
|------------------------------------|----------------------------------|--------------|---------------------|----------------------------------|--------------|---------------------|------------------|
| | <i>illumigene</i> vs. Comparator | PPA | 95% CI | <i>illumigene</i> vs. Comparator | NPA | 95% CI | |
| Composite Method Comparator | | | | | | | |
| Site 1 | 41/43 | 95.3% | 84.5 – 98.7% | 449/470 | 95.5% | 93.3 – 97.1% | 1 (12) |
| Site 2 | 3/3 | 100.0% | 43.9 – 100.0% | 67/70 | 95.7% | 88.1 – 98.5% | 1 (1) |
| Site 3 | 0/0 | N/A | N/A | 8/8 | 100.0% | 67.6 – 100.0% | 0 |
| Site 4 | 7/7 | 100.0% | 64.6 – 100.0% | 119/122 | 97.5% | 93.0 – 99.2% | 0 |
| TOTAL | 51/53 | 96.2% | 87.2 – 99.0% | 643/670 | 96.0% | 94.2 – 97.2% | (13) |

* 11/13 initial invalid specimens produced valid results upon repeat testing

Clinical studies were conducted with multiple nasopharyngeal swab and sample elution buffer types. Sample buffers tested during clinical studies included 0.85% Saline (n=30 or 4.1%), Tris EDTA (n=8 or 1.1%) and Molecular Grade Water (n= 687 or 94.2%). All sample buffers were used in 0.5 mL volumes. Analytical studies were performed with 0.85% Saline, Tris EDTA, Phosphate Buffered Saline (PBS) and Molecular Grade Water. Analytical studies established equivalence between all sample elution buffer types.

Age information was known for 723 (99.2%) of the patients from whom samples were tested. Patient age ranged from 1 month to 88 years. Thirty-eight (5.2%) patients were less than 1 year of age; 13 (1.8%) were between 1 and 2 years old; 296 (40.6%) were between 2 and up to 12 years, 157 (21.5%) were between 12 and up to 21 years, 190 (26.0%) were above 21 but below 65 years, and the remaining 29 (4.0%) patients were above 65 years of age. There is no expectation that the *illumigene* Pertussis assay performs differently when evaluated specimens from patients in different age groups.

The study population included 413 (56.7%) female and 308 (42.2%) male patients. Gender was unknown for 8 (1.1%) patients included in the study. There is no expectation that the *illumigene* Pertussis assay performance characteristics are influenced by patient gender.

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity or Limit of Detect for the *illumigene* Pertussis assay was determined for *Bordetella pertussis* strain ATCC BAA-589, Tahoma I.

Limit of Detection was determined using 60 replicates *Bordetella pertussis* strain ATCC BAA-589 and a stated probability (eg. 95%, where 57/60 replicates are positive) of obtaining positive responses. Analytical sensitivity testing is summarized below.

| <i>B. pertussis</i> Strain Description | CFU/mL | CFU/Test |
|--|--------|----------|
| ATCC BAA-589 (Tahoma I) | 3265 | 1.48 |

ASSAY REACTIVITY

The following *B. pertussis* strains were tested and produced positive reactions at 3265 CFU/mL or 1.48 CFU/Test with *illumigene* Pertussis: ATCC 12743; ATCC 8478; ATCC 8467; ATCC 9797; ATCC 53894; ATCC 10380; ATCC 12742; and A639. The following *B. pertussis* strains were tested and produced positive reactions at 3500 CFU/mL or 1.59 CFU/test with *illumigene* Pertussis: ATCC 51445 and ATCC BAA-1335.

REPRODUCIBILITY

Reproducibility studies were carried out by three of the four participating Clinical Sites. Blind-coded panels of 10 samples were supplied to participating laboratories. Samples were randomly sorted within each panel to mask sample identities. The panels included contrived samples manufactured as moderate positive samples (1.31×10^4 CFU/mL or 6 CFU/test), low positive samples (4.89×10^3 CFU/mL or 2 CFU/test); and high negative samples (8.2 CFU/mL or 0.004 CFU/test). The panel also included one negative sample, positive control and negative control. Testing was performed by different operators at each site on the same day (intra-assay variability) for five days (inter-assay variability). Three lots of *illumigene* Pertussis and six *illumipro-10* instruments were used in this study. Positive and Negative Controls were tested each day of testing. The results are provided in the table below:

| Sample Type | Site 1 | | Site 2 | | Site 4 | | Total | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| | Percent Agreement | Percent Agreement | Percent Agreement | Percent Agreement | Percent Agreement | Percent Agreement | Percent Agreement | |
| Moderate Positive | 30/30 | 100.0% | 30/30 | 100.0% | 30/30 | 100.0% | 90/90 | 100.0% |
| Low Positive | 27/30 | 90.0% | 29/30 | 96.7% | 30/30 | 100.0% | 86/90 | 95.6% |
| High Negative | 26/30 | 86.7% | 23/30 | 76.7% | 29/30 | 96.7% | 78/90 | 86.7% |
| Negative | 10/10 | 100.0% | 9/10 | 90.0% | 10/10 | 100.0% | 29/30 | 96.7% |
| Negative Control | 10/10 | 100.0% | 10/10 | 100.0% | 10/10 | 100.0% | 30/30 | 100.0% |
| Positive Control | 10/10 | 100.0% | 10/10 | 100.0% | 10/10 | 100.0% | 30/30 | 100.0% |

CROSSREACTIVITY

Crossreactivity studies were performed with positive and negative nasal wash specimens inoculated with bacterial or fungal organisms to a final concentration of 1.0×10^5 CFU/mL or virus at a minimum of 1.0×10^5 TCID₅₀/mL. None of the following organisms reacted with *illumigene* Pertussis: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella petrii*, *Bordetella trematum*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella jordanis*, *Legionella longbeachae*, *Legionella micdadei*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria elongata*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus anginosus* (Group F), *Streptococcus bovis* (Group D), *Streptococcus canis* (Group G), *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus suis*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, Epstein Barr Virus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, Human Metapneumovirus, Influenza A, Influenza B, Measles virus, Mumps virus, Parainfluenza virus 1, Parainfluenza virus 2, Parainfluenza virus 3, Respiratory syncytial virus A, Respiratory syncytial virus B, Rhinovirus.

Bordetella bronchiseptica Strain 4617 and *Bordetella holmesii* were tested at 1.0×10^6 CFU/mL and were found to react with the *illumigene* Pertussis assay.

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

The following chemical substances, at the specified saturated solvent/diluent concentrations, do not interfere with test results: Acetaminophen (10 mg/mL), Advil® [ibuprofen (10 mg/mL)], Afrin® Decongestant Nasal Spray [Oxymetazoline hydrochloride (0.0005% w/v)], Albuterol Sulfate [salbutamol sulfate (1% w/v)], Aspirin (5mg/mL), Coricidin® HBP Cold/Flu Tablets [Acetaminophen (3.26 mg/mL), Chlorpheniramine maleate (0.02 mg/mL)], Diphenhydramine HCl (0.25 mg/mL), Erythromycin (2% w/v), Mupirocin (2% w/v), Petroleum Jelly [white petrolatum (1% w/v)], Robitussin® Cough+Chest Congestion DM Cough Syrup [dextromethorphan HBr (0.1 mg/mL), Guaifenesin (1.0 mg/mL)], Suphedrine PE [phenylephrine HCl (0.3 mg/mL)], Saline Nasal Spray [sodium chloride (0.0065% w/v)], Smokeless Tobacco (snuff) (1% w/v), Tobramycin (0.6 mg/mL), Vicks® VaporRub® [camphor (0.48% w/v), eucalyptus oil (0.12% w/v), menthol (0.26% w/v)].

Aspirin was found to interfere with *illumigene* Pertussis testing at concentrations greater than 5 mg/mL.

The following biological substances, at the specified saturated solvent/diluent concentrations, do not interfere with test results: Human DNA (200 ng/μL), Mucin [bovine submaxillary gland type I-S (1% w/v)], Whole blood (1% w/v).



Pertussis Test di amplificazione del DNA

Test di amplificazione del DNA per il rilevamento di *Bordetella pertussis* in campioni prelevati con tamponi nasofaringei

REF 280750

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

FINALITÀ USO

Il test di amplificazione del DNA *illumigene* Pertussis, eseguito su *illumipro-10™*, è un esame diagnostico in vitro qualitativo per il rilevamento diretto di *Bordetella pertussis* in campioni umani prelevati con tamponi nasofaringei ottenuti da pazienti con sospetta infezione del tratto respiratorio da *Bordetella pertussis*.

Il test *illumigene* Pertussis utilizza la tecnologia loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP, amplificazione isoterma del DNA mediata da loop) per il rilevamento di *Bordetella pertussis* identificando la sequenza di inserzione IS481 del genoma *Bordetella pertussis*. La sequenza di inserzione IS481 può essere individuata anche in *Bordetella holmesii* e in alcuni ceppi di *Bordetella bronchiseptica*. Mentre la malattia respiratoria causata da *B. bronchiseptica* non è frequente negli esseri umani, sono stati riportati focolai misti di *B. holmesii* e *B. pertussis*. I risultati positivi riportati per i test di amplificazione del DNA che avevano come bersaglio la sequenza di inserzione IS481 possono essere coerenti con la presenza di *B. holmesii* o di *B. pertussis*. Quando i fattori clinici suggeriscono che la *B. pertussis* potrebbe non essere la causa dell'infezione respiratoria, dovrebbero essere eseguite indagini cliniche appropriate in base alle linee guida pubblicate.

I risultati del test *illumigene* Pertussis devono essere utilizzati congiuntamente alle informazioni ottenute durante la valutazione clinica del paziente come ausilio nella diagnosi dell'infezione respiratoria.

Il test *illumigene* Pertussis è destinato all'uso nei laboratori ospedalieri, statali o di riferimento. Il dispositivo non è destinato all'uso ambulatoriale.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il test di amplificazione del DNA *illumigene* Pertussis si basa sulla tecnologia LAMP.^{1,2} Il test ha come bersaglio una sequenza di 198 paia di basi (bp) del genoma di *Bordetella pertussis* che si trova in una regione della sequenza di inserzione IS481.

L'amplificazione mediata da loop utilizza primer specificamente disegnati per fornire l'amplificazione isoterma del DNA specifica e continua del DNA. Un sottoprodotto di questa amplificazione è il magnesio pirofosfato, che forma un precipitato bianco che rende torbida la soluzione di reazione. Le caratteristiche di assorbanza della soluzione di reazione vengono monitorate dall'incubatore/lettore *illumipro-10* Meridian. Le variazioni nelle caratteristiche di assorbanza della soluzione di reazione creata dalla precipitazione del magnesio pirofosfato indicano la presenza del DNA bersaglio. L'assenza di DNA bersaglio non determina un cambiamento significativo nell'assorbanza del campione.

Il kit *illumigene* Pertussis include il reagente di controllo/controllo negativo del test, dispositivi di analisi *illumigene*, il tampone di reazione e olio minerale per *illumigene* Pertussis. Il reagente di controllo/controllo negativo del test *illumigene* utilizzato per la diluizione e la preparazione del campione, è una soluzione tampone contenente *E. coli* trattato con formalina che ospita il DNA di *Staphylococcus aureus*. Il dispositivo di analisi *illumigene* Pertussis contiene un granulo liofilizzato in ognuna delle due provette: una provetta TEST con primer specifici per IS481 e una provetta CONTROLLO con primer specifici per *S. aureus*. Il DNA di *S. aureus* nel reagente di controllo/controllo negativo del test e i primer specifici per *S. aureus* nella provetta di CONTROLLO funzionano come controllo interno per il test. Durante la preparazione del campione, ciascun campione del paziente viene aggiunto al reagente di controllo/controllo negativo del test e combinato con il DNA di *S. aureus* prima dell'amplificazione. L'aggiunta di DNA di *S. aureus* al campione del paziente consente l'elaborazione parallela del DNA bersaglio e del DNA di controllo mediante amplificazione e rilevamento. Il controllo interno monitora l'inibizione dell'amplificazione, la prestazione del reagente analitico e l'efficacia dell'elaborazione del campione. La sequenza bersaglio di *S. aureus* deve essere amplificata e rilevata nella reazione finale, altrimenti il test è considerato non valido e i risultati del paziente non vengono riportati.

illumipro-10 monitora le variazioni nelle caratteristiche di assorbanza misurando la trasmissione della luce attraverso le soluzioni di reazione contenute nelle provette Test e Controllo. La trasmissione della luce viene controllata all'inizio dell'esecuzione dell'analisi (Signal_{initial}, S_i) nonché alla fine (Signal_{final}, S_f). *illumipro-10* calcola la variazione nella trasmissione della luce fra la fine e l'inizio dell'analisi (S_f:S_i) e confronta il rapporto con un valore stabilito di cut-off.

I valori stabiliti di cut-off per la provetta TEST sono utilizzati per refertare i risultati del campione. I rapporti S_f:S_i della provetta TEST inferiori all'82% sono refertati come "POSITIVI"; i rapporti S_f:S_i della provetta TEST superiori o pari all'82% sono refertati come "NEGATIVI". I valori numerici non sono riportati.

I valori stabiliti di cut-off per la provetta CONTROLLO sono utilizzati per determinare la validità. I rapporti S_f:S_i della provetta CONTROLLO inferiori al 90% sono considerati validi e consentono di refertare i risultati della provetta TEST (POSITIVO, NEGATIVO). I rapporti S_f:S_i della provetta CONTROLLO superiori o pari al 90% sono considerati non validi e impediscono di refertare i risultati della provetta TEST. Le reazioni della provetta CONTROLLO non valide sono riportate come "NON VALIDE". I valori numerici non sono riportati.

Per la reazione della provetta CONTROLLO valgono criteri di cut-off più rigorosi per garantire che l'amplificazione non sia inibita, i reagenti reagiscano come previsto e l'elaborazione del campione avvenga correttamente.

PRINCIPI BIOLOGICI

Bordetella pertussis è un agente patogeno umano responsabile esclusivamente per la malattia respiratoria endemica della tosse convulsa (pertosse); una malattia riportata pubblicamente che ha colpito più di 200.000 persone al mondo nel 2012. La tosse convulsa è attualmente la sola malattia negli Stati Uniti che mostra una tendenza all'incremento di casi riportati e morbilità sostanziale nonostante la disponibilità di un vaccino.³ I Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie (CDC) degli Stati Uniti hanno riportato circa 48.300 casi di pertosse nel 2012, una media di 15,4 casi per 100.000 persone negli Stati Uniti.⁴ I recenti focolai hanno indicato un calo di immunità nei bambini dopo aver ricevuto l'ultima dose di richiamo del vaccino acellulare, tenendo conto della sensibilità all'infezione da pertosse nella popolazione sia vaccinata che non vaccinata di bambini di età compresa tra 7 e 11 anni.^{5,6}

I focolai di pertosse sono particolarmente difficili da controllare in quanto le prime fasi della malattia sono simili ad altre infezioni respiratorie e i pazienti possono rimanere altamente infettivi fino a 5 settimane dall'inizio dei sintomi.³ La pertosse, inoltre, non viene ufficialmente diagnosticata fino alla presenza della caratteristica tosse convulsa, che si manifesta almeno 2 settimane dalla comparsa dei sintomi.³ La diagnosi clinica della pertosse può essere eseguita usando test in coltura, test sierologici o test di amplificazione dell'acido nucleico (NAAT). I test in coltura sono altamente specifici ma la sensibilità è bassa, per ottenere i risultati possono essere necessari fino a 7 giorni e le cellule vitali richieste per la coltura diminuiscono con il progredire della malattia (dopo 2 settimane dalla comparsa dei sintomi).⁷ I test NAAT invece possono fornire rapidamente i risultati del test e non richiedono batteri vitali. Tuttavia, il DNA batterico deve essere ancora presente nel nasofaringe (fino a 4 settimane dopo l'inizio della tosse) per prevenire risultati falsi negativi.⁸ Inoltre, solo i pazienti sintomatici con tosse dovrebbero essere testati con i test NAAT per prevenire risultati falsi positivi da contatti diretti asintomatici.⁹ I test sierologici possono essere usati solo per diagnosticare la malattia nelle ultime fasi, circa 2-8 settimane dopo l'inizio della tosse.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

- Reagente di controllo/controllo negativo del test *illumigene* Pertussis:** soluzione tampone Tris contenente *E. coli* trattato con formalina che ospita all'interno un plasmide contenente un segmento del genoma di *S. aureus* e sodio azide (0,09%) come conservante.
- Dispositivo di analisi *illumigene* Pertussis:** dispositivo a due provette contenente i reagenti di amplificazione liofilizzati (DNA polimerasi, deossinucleotidi trifosfati) e i primer specifici per IS481 (provetta TEST) o i primer di controllo (provetta CONTROLLO).
- Tampone di reazione *illumigene* Pertussis:** soluzione tampone Tris-EDTA contenente sodio azide (0,09%) come conservante.
- Olio minerale**

MATERIALI FORNITI SEPARATAMENTE

Kit di controllo esterno *illumigene* Pertussis, numero di catalogo: 279930

MATERIALI NON FORNITI

- Guanti in lattice monouso, senza talco
- Puntali per pipetta privi di DNase/RNase e resistenti alla contaminazione da aerosol
- Sistema di prelievo e trasporto dei campioni
- Tamponi nasofaringei:** poliestere (capacità minima 18 µL, ad es. Puritan Medical Products, n. di catalogo 25-801-D50); nylon floccato (capacità minima 31 µL, ad es. Puritan Medical Products, n. di catalogo 25-201-R50); oppure rayon (capacità minima 69 µL, ad es. Copan, n. di catalogo 503CS01).
- Terreno di trasporto non nutritivo:** liquido Amies, senza carbone; oppure liquido Stuart (volume massimo: 1,2 mL)

STRUMENTI NON FORNITI

- Blocco termostatico a secco di 12 mm in grado di arrivare a 95 C
- Termometro digitale con registrazione della temperatura max/min (es., termometro impermeabile a prova d'urto Traceable® Lollipop™)
- Vortex
- Timer
- Micropipetta in grado di dispensare 50 µL
- illumipro-10™*, Meridian Bioscience, Inc. Numero di catalogo: 610172

PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- Non scambiare il reagente di controllo/controllo negativo del test o i dispositivi di analisi tra i lotti. Il tampone di reazione e l'olio minerale sono intercambiabili, a patto che non siano ancora scaduti quando vengono utilizzati.
- Seguire il livello di biosicurezza 2 e le buone pratiche di laboratorio durante l'esecuzione dei test.⁹ Trattare tutti i campioni e i dispositivi di analisi usati come capaci di trasmettere agenti infettivi. Non mangiare, bere o fumare in aree in cui vengono manipolati i campioni o i reagenti del kit.

- Indossare guanti monouso per la manipolazione dei campioni e subito dopo lavarsi a fondo le mani.
- Applicare i programmi di controllo qualità per i laboratori di analisi molecolari che comprendano impiego e manutenzione adeguati dell'apparecchiatura.¹⁰
- Il dispositivo di analisi *illumigene* Pertussis contiene reagenti liofilizzati. La busta protettiva non deve essere aperta fino a quando non si è pronti a eseguire l'analisi.
- Il dispositivo di analisi *illumigene* Pertussis comprende un sistema di chiusura progettato per prevenire la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione. NON utilizzare dispositivi di analisi con sistemi di chiusura danneggiati.
- Smaltire i dispositivi di analisi *illumigene* subito dopo l'uso, lasciando chiusa la linguetta del dispositivo. NON aprire il dispositivo di analisi dopo l'uso. L'apertura del dispositivo dopo l'amplificazione potrebbe comportare la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione.

FRASI DI RISCHIO E CONSIGLI DI PRUDENZA

Per le nostre attuali conoscenze, non ci sono rischi associati a questo prodotto.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è riportata sull'etichetta del kit. Conservare il kit a 2-30 C.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Assicurarsi che i reagenti del kit siano a temperatura ambiente (21-30 C) prima dell'uso. Si potrebbero ottenere risultati non corretti se i reagenti non vengono portati a temperatura ambiente prima dell'uso.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Tipo di campione: tamponi nasofaringei

Raccolta del campione: il prelievo dei campioni nasofaringei deve essere eseguita in conformità con le procedure della struttura sanitaria per la raccolta di campioni clinici per l'infezione da *Bordetella pertussis*. I campioni nasofaringei devono essere prelevati con i tipi di tamponi adatti (ad es. poliestere, nylon floccato o rayon).

Mettere i tamponi nel terreno di trasporto non nutritivo (ad es. liquido Amies, senza carbone, oppure liquido Stuart) oppure conservarli senza conservante in una provetta sterile senza terreno.

I campioni senza conservante o i campioni conservati in un terreno di trasporto dovrebbero essere analizzati il prima possibile, ma possono rimanere a temperatura ambiente (21-30 C) per un massimo di 5 giorni o refrigerati (2-8 C) per un massimo di 7 giorni prima dell'analisi. Non congelare i campioni.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI:

NOTA: assicurarsi che *illumipro-10* sia acceso e che siano state completate le necessarie verifiche del funzionamento prima di dare inizio alla PREPARAZIONE DEI CAMPIONI. Consultare il Manuale d'uso di *illumipro-10* per ulteriori informazioni sulla configurazione e sul funzionamento dello strumento.

- Mettere il tampone con il campione in una provetta con tampone di reazione etichettata. Rompere l'asta del tampone per far sì che il campione entri nella provetta. Eluire il campione miscelando su vortex per 45-60 secondi. Rimuovere ed eliminare il tampone. I campioni eluiti possono essere conservati a temperatura ambiente (21-30 C) per un massimo di 48 ore oppure refrigerati (2-8 C) per un massimo di 7 giorni prima dell'analisi.
- Aggiungere 50 µL di campione eluito alla provetta di controllo/controllo negativo del test etichettata e tapparla.
- Ripetere i passaggi per la preparazione dei campioni per tutti i campioni che si desidera analizzare.
- Miscelare su vortex ciascuna provetta di controllo/controllo negativo del test contenente il campione eluito per circa 10 secondi.
- Riscaldare ciascuna miscela di campione/controllo in un bagno secco/blocco termico a 95 ± 5 C per 10 ± 2 minuti. Monitorare la fase del trattamento termico con il termometro digitale e il timer.
- Rimuovere ciascun provetta di campione/controllo dal bagno secco/blocco termico. I campioni sottoposti a trattamento termico possono essere tenuti a temperatura ambiente (21-30 C) fino a 15 minuti prima dell'analisi.
- Miscelare su vortex per circa 10 secondi.

PROCEDURA DEL TEST

NOTA: È possibile analizzare un massimo di 10 campioni in un singolo ciclo *illumipro-10*.

- Per ciascun campione estrarre 1 dispositivo di analisi *illumigene* Pertussis dalla busta protettiva. Aprire con attenzione il dispositivo, tenendo le provette in maniera tale che il reagente liofilizzato non fuoriesca all'apertura.
- Trasferire 50 µL di campione sottoposto a trattamento termico nella provetta TEST (granulo bianco) del dispositivo di analisi *illumigene*. Prestare attenzione a non introdurre aria nella miscela di reazione. Usando un nuovo puntale, trasferire 50 µL di campione sottoposto a trattamento termico nella provetta CONTROLLO (granulo giallo) del dispositivo di analisi *illumigene*. Prestare attenzione a non introdurre aria nella miscela di reazione.
- Aggiungere 1 goccia di olio minerale alla provetta TEST e alla provetta CONTROLLO. Chiudere il dispositivo di analisi *illumigene* e la linguetta di chiusura.
- Picchiare il dispositivo sul bancone o agitarlo per rimuovere le bolle d'aria. Esaminare attentamente il dispositivo di analisi per verificare la dissoluzione del granulo di controllo/test e per escludere la presenza di bolle d'aria residue nella provetta e di liquido nella parte superiore del dispositivo. Se si nota la presenza di granuli non disciolti, bolle d'aria o liquido nella parte superiore del dispositivo, picchiare il dispositivo sul bancone e ripetere l'ispezione visiva. L'amplificazione e il rilevamento devono iniziare entro 15 minuti.

- Inserire il dispositivo di analisi *illumigene* nello strumento *illumipro-10* e iniziare la reazione di amplificazione e il rilevamento. I risultati saranno visualizzati alla conclusione del ciclo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

| ID campione | Risultato riportato | Interpretazione |
|-----------------------|---------------------|---|
| Campione del paziente | POSITIVO | Il campione contiene il DNA bersaglio di <i>Bordetella pertussis</i> . |
| | NEGATIVO | Nessun DNA di <i>Bordetella pertussis</i> rilevato. |
| | NON VALIDO | Nessun risultato referabile. Ripetere il test utilizzando il campione originale. Campione del paziente con effetto inibitorio, preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno. |
| Controllo positivo | POSITIVO | Risultato di controllo positivo valido. Reagenti attivi al momento dell'uso, corretto funzionamento di <i>illumipro-10</i> . |
| | NEGATIVO | Risultato del controllo non corretto. Come prima azione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale (Italia +390331433636). |
| | NON VALIDO | Nessun risultato referabile. Ripetere l'intero ciclo di analisi usando i campioni originali. Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno. |
| Controllo negativo | POSITIVO | Risultato del controllo non corretto. Come prima azione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale (Italia +390331433636). |
| | NEGATIVO | Risultato del controllo negativo valido. Reagenti reattivi al momento dell'uso, corretto funzionamento di <i>illumipro-10</i> . |
| | NON VALIDO | Nessun risultato referabile. Ripetere l'intero ciclo di analisi usando i campioni originali. Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno. |
| POZZETTO VUOTO | NESSUNO | Nessun dispositivo di analisi <i>illumigene</i> nel pozzetto di <i>illumipro-10</i> . OPPURE Il dispositivo di analisi <i>illumigene</i> presente è compromesso a causa di un errore nella preparazione del campione, dispositivo sporco o non correttamente posizionato. Ripetere il test utilizzando il campione originale. |

CONTROLLO QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

- Ogni dispositivo contiene una provetta di controllo interno che verifica l'eventuale inibizione dell'amplificazione e l'efficacia dei reagenti e dell'analisi del campione.
- La fase di trattamento termico viene monitorata con un termometro esterno e con un timer a intervalli. Utilizzare la registrazione della temperatura max/min del termometro per garantire il mantenimento di una temperatura di 95 ± 5 C. Usare il timer a intervalli per garantire che la durata del trattamento termico sia di 10 ± 2 minuti.
- La buona pratica di laboratorio raccomanda l'uso di materiali di controllo. Gli operatori devono attenersi alle appropriate linee guida federali, statali e locali riguardanti l'analisi dei controlli di qualità esterni.
- I reagenti di controllo esterni *illumigene* Pertussis sono forniti separatamente (n. di catalogo 279930). Si raccomanda di verificare la reattività di ciascun nuovo lotto e di ogni nuova spedizione di *illumigene* Pertussis al momento della ricezione e prima dell'uso. I test di controllo esterni vanno eseguiti successivamente, in conformità con le appropriate linee guida federali, statali e locali. Il kit del test *illumigene* Pertussis non va utilizzato per l'analisi dei pazienti se i controlli esterni non producono i risultati corretti.
- Va utilizzato un dispositivo separato per ciascun reagente di controllo esterno.

VALORI ATTESI

L'incidenza complessiva di *B. pertussis* nei campioni raccolti e analizzati in modo prospettico durante il periodo di questo studio è stata di circa il 10,0% (51/508).

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Questo prodotto può essere usato solo con lo strumento *illumipro-10*.
- Il test per il rilevamento del DNA di *illumigene* Pertussis è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi o informazioni relative alla carica dell'organismo.
- Questo dispositivo non è stato valutato per il monitoraggio del trattamento delle infezioni da *Bordetella pertussis*.
- Le infezioni del tratto respiratorio possono essere causate da *Bordetella pertussis* come pure da altri patogeni. I risultati positivi non escludono co-infezioni da parte di altri patogeni del tratto respiratorio.
- Il rilevamento dell'acido nucleico dipende dall'adeguatezza delle procedure di prelievo, manipolazione, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni. Il mancato rispetto della procedura appropriata per ciascuna di queste fasi può portare a risultati errati.
- La prevalenza dell'infezione da *B. pertussis* influenzerà il valore predittivo del test.

- Gli acidi nucleici degli organismi possono persistere *in vivo* indipendentemente dalla vitalità degli organismi stessi. Il test *illumigene* Pertussis non distingue tra organismi vitali e non vitali.
- Come per tutti i test diagnostici molecolari, (A) i risultati falsi negativi possono verificarsi in presenza di inibitori, errori tecnici, scambio di campioni o basso numero di organismi nel campione clinico, (B) i risultati falsi positivi possono verificarsi in presenza di contaminazione crociata da parte degli organismi bersaglio, dei rispettivi acidi nucleici o del prodotto di amplificazione nonché da segnali aspecifici.
- Il test *illumigene* Pertussis ha come bersaglio la sequenza di inserzione IS481 del genoma di *Bordetella*. La sequenza di inserzione IS481 è presente in *B. pertussis*, *B. holmesii* e in alcuni ceppi di *B. bronchiseptica*.
- L'acido acetilsalicilico, che si trova nell'aspirina, ha prodotto risultati non validi quando analizzato a concentrazioni superiori a 5 mg/mL durante l'analisi dei replicati per il limite di rilevazione per il ceppo BAA-589 di *B. pertussis*.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Il test di amplificazione del DNA *illumigene* Pertussis è stato valutato da dicembre 2012 a luglio 2013 da laboratori di analisi cliniche indipendenti che rappresentano regioni geograficamente distinte in tutti gli Stati Uniti. Un totale di 729 campioni qualificati prelevati con tamponi nasofaringei (NP), raccolti da pazienti con sospetta infezione da *B. pertussis* sono stati valutati con il dispositivo di analisi per determinare le caratteristiche prestazionali. I campioni erano rimanenze di campioni deidentificati precedentemente inviati per analisi di routine su *B. pertussis*. I campioni biologici inclusi nella valutazione delle prestazioni erano campioni prospettici (mai congelati) e retrospettivi (congelati prima dell'analisi con *illumigene*). Le prestazioni del test per *illumigene* Pertussis sono state confrontate con un metodo di riferimento composito che includeva due test per PCR in tempo reale, con bersaglio la sequenza di inserzione IS481 validati dal produttore, seguito da sequenziamento bidirezionale di ampliconi da campioni positivi ottenuti mediante PCR. Il valore del ciclo soglia calcolato (Ct) per ciascun test PCR è stato determinato di 35,6 al limite di rilevamento del test (PCR1: 3750 CFU/mL, PCR2: 4522 CFU/mL). I campioni sono stati considerati positivi quando i risultati di uno dei test di confronto per PCR hanno prodotto valori di ciclo soglia calcolati (Ct) inferiori a 35,6 e il risultato della sequenza bidirezionale corrispondente era positivo. I campioni sono stati considerati negativi quando i risultati di entrambi i test di confronto per PCR hanno prodotto valori di ciclo soglia calcolati (Ct) superiori a 35,6. Sono stati analizzati un totale di 508 campioni prospettici (69,7%) e 221 campioni retrospettivi (30,3%). I risultati non validi sono stati ottenuti da 13 campioni (1,8%); due campioni sono rimasti non validi dopo aver ripetuto l'analisi. Due campioni prospettici e due retrospettivi hanno prodotto risultati indeterminati con test di confronto per PCR. La Tabella 1 riassume le caratteristiche prestazionali di *illumigene*; la Tabella 2 descrive le caratteristiche prestazionali di *illumigene* per sito clinico.

Tabella 1. Prestazioni del test *illumigene*

| Descrizione dei campioni | Campioni positivi | | | Campioni negativi | | | Risultati non validi ^a |
|------------------------------------|--|--------------|---------------------|--|--------------|---------------------|-----------------------------------|
| | <i>illumigene</i> rispetto a test di confronto | PPA | 95% CI | <i>illumigene</i> rispetto a test di confronto | NPA | 95% CI | |
| Test di confronto metodo composito | | | | | | | |
| Prospettivo | 30/32 | 93,8% | 79,9 – 98,3% | 451/472 | 95,6% | 93,3 – 97,1% | 2 (13) |
| Retrospettivo | 21/21 | 100,0% | 84,5 – 100,0% | 192/198 | 97,0% | 93,5 – 98,6% | 0 |
| TOTALE | 51/53 | 96,2% | 87,2 – 99,0% | 643/670 | 96,0% | 94,2 – 97,2% | 2 (13) |

^a 11/13 campioni non validi iniziali hanno prodotto risultati validi alla ripetizione dell'analisi

Tabella 2. Prestazioni del test *illumigene* per sito clinico

| Descrizione dei campioni | Campioni positivi | | | Campioni negativi | | | Risultati non validi ^b |
|------------------------------------|--|--------------|---------------------|--|--------------|---------------------|-----------------------------------|
| | <i>illumigene</i> rispetto a test di confronto | PPA | 95% CI | <i>illumigene</i> rispetto a test di confronto | NPA | 95% CI | |
| Test di confronto metodo composito | | | | | | | |
| Laboratorio 1 | 41/43 | 95,3% | 84,5 – 98,7% | 449/470 | 95,5% | 93,3 – 97,1% | 1 (12) |
| Laboratorio 2 | 3/3 | 100,0% | 43,9 – 100,0% | 67/70 | 95,7% | 88,1 – 98,5% | 1 (1) |
| Laboratorio 3 | 0/0 | N/A | N/A | 8/8 | 100,0% | 67,6 – 100,0% | 0 |
| Laboratorio 4 | 7/7 | 100,0% | 64,6 – 100,0% | 119/122 | 97,5% | 93,0 – 99,2% | 0 |
| TOTALE | 51/53 | 96,2% | 87,2 – 99,0% | 643/670 | 96,0% | 94,2 – 97,2% | (13) |

^b 11/13 campioni non validi iniziali hanno prodotto risultati validi alla ripetizione dell'analisi

Sono stati condotti studi clinici con multipli tamponi nasofaringei e diversi tipi di tampone di reazione per eluzione. I tamponi di reazione analizzati durante gli studi clinici comprendevano 0,85 % di soluzione salina (n=30 oppure 4,1%), Tris EDTA (n=8 oppure 1,1%) e acqua per indagini molecolari (n= 687 oppure 94,2%). Tutti i tamponi di reazione sono stati usati in volumi di 0,5 mL. Sono stati eseguiti studi analitici con 0,85% di soluzione salina, Tris EDTA, tampone fosfato salino (PBS) e acqua per indagini molecolari. Gli studi analitici hanno stabilito l'equivalenza tra tutti i tipi di tampone di reazione per eluzione.

Le informazioni relative all'età erano note per 723 (99,2%) pazienti i cui campioni sono stati sottoposti ad analisi. L'età dei pazienti andava da 1 mese a 88 anni. 38 (5,2%) avevano meno di 1 anno, 13 (1,8%) tra 1 e 2 anni, 296 (40,6%) tra 2 e 12 anni, 157 (21,5%) tra 12 e 21 anni, 190 (26,0%) avevano più di 21 ma meno di 65 anni e i restanti 29 (4,0%) pazienti avevano più di 65 anni. Non si prevedono differenze nelle prestazioni dei test per *illumigene* Pertussis con campioni provenienti da pazienti appartenenti ai diversi gruppi di età.

La popolazione dello studio includeva 413 pazienti di sesso femminile (56,7%) e 308 pazienti di sesso maschile (42,2%). Per 8 (1,1%) pazienti partecipanti allo studio non era noto il sesso. Non si prevedono differenze nelle prestazioni del test per *illumigene* Pertussis in base al sesso del paziente.

SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica o limite di rilevazione per il test *illumigene* Pertussis è stata determinata per il ceppo ATCC BAA-589, Tahoma I di *Bordetella pertussis*.

Il limite di rilevazione è stato determinato usando 60 replicati per il ceppo ATCC BAA-589 di *Bordetella pertussis* e una probabilità stabilita (es. 95% dove 57/60 repliche sono positive) di ottenere risposte positive. L'analisi della sensibilità analitica è sintetizzata qui di seguito.

| Descrizione del ceppo <i>B. pertussis</i> | CFU/ml | CFU/Test |
|---|--------|----------|
| ATCC BAA-589 (Tahoma I) | 3265 | 1,48 |

REATTIVITÀ ANALISI

I seguenti ceppi di *B. pertussis* sono stati analizzati e hanno prodotto reazioni positive a 3.265 CFU/mL o 1,48 CFU/Test con Pertussis *illumigene*: ATCC 12743; ATCC 8478; ATCC 8467; ATCC 9797; ATCC 53894; ATCC 10380; ATCC 12742; e A639. I seguenti ceppi di *B. pertussis* sono stati analizzati e hanno prodotto reazioni positive a 3.500 CFU/mL o 1,59 CFU/test con Pertussis *illumigene*: ATCC 51445 e ATCC BAA-1335.

RIPRODUCIBILITÀ

Gli studi di riproducibilità sono stati eseguiti in tre dei quattro laboratori partecipanti a cui sono stati forniti pannelli codificati in cieco di 10 campioni. I campioni sono stati ordinati casualmente all'interno di ciascun pannello per mascherare le identità dei campioni. I pannelli includevano campioni artificiali prodotti come campioni positivi moderati (1,31 x 10⁴ CFU/mL oppure 6 CFU/test), campioni positivi bassi (4,89 x 10³ CFU/mL oppure 2 CFU/test), e campioni negativi alti (8,2 CFU/mL oppure 0,004 CFU/test). Il pannello comprendeva anche un campione negativo, un controllo positivo e un controllo negativo. L'analisi è stata condotta da diversi operatori in ciascun laboratorio lo stesso giorno (variabilità intra-analisi) per cinque giorni (variabilità inter-analisi). In questo studio sono stati utilizzati tre lotti di *illumigene* Pertussis e sei strumenti *illumipro-10*. I controlli positivi e negativi sono stati testati ogni giorno di analisi. I risultati sono mostrati nella tabella seguente:

| Tipo di campione | Laboratorio 1 | | Laboratorio 2 | | Laboratorio 4 | | Totale | |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------|
| | Percentuale di concordanza | Percentuale di concordanza | Percentuale di concordanza | Percentuale di concordanza | Percentuale di concordanza | Percentuale di concordanza | Percentuale di concordanza | |
| Positivo moderato | 30/30 | 100,0% | 30/30 | 100,0% | 30/30 | 100,0% | 90/90 | 100,0% |
| Positivo basso | 27/30 | 90,0% | 29/30 | 96,7% | 30/30 | 100,0% | 86/90 | 95,6% |
| Negativo alto | 26/30 | 86,7% | 23/30 | 76,7% | 29/30 | 96,7% | 78/90 | 86,7% |
| Negativo | 10/10 | 100,0% | 9/10 | 90,0% | 10/10 | 100,0% | 29/30 | 96,7% |
| Controllo negativo | 10/10 | 100,0% | 10/10 | 100,0% | 10/10 | 100,0% | 30/30 | 100,0% |
| Controllo positivo | 10/10 | 100,0% | 10/10 | 100,0% | 10/10 | 100,0% | 30/30 | 100,0% |

CROSS-REATTIVITÀ

Gli studi di reattività crociata sono stati eseguiti con campioni positivi e negativi ottenuti da lavaggio nasale inoculati con organismi batterici o fungini a una concentrazione finale di 1,0 x 10⁶ CFU/mL o virus a un minimo di 1,0 x 10⁵ TCID₅₀/mL. Nessuno dei seguenti organismi ha reagito con *illumigene* Pertussis: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella petrii*, *Bordetella trematum*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella jordanis*, *Legionella longbeachae*, *Legionella micdadei*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria elongata*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus anginosus* (Gruppo F), *Streptococcus bovis* (Gruppo D), *Streptococcus canis* (Gruppo G), *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *Equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus suis*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, Epstein Barr Virus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, Metapneumovirus umano, Influenza A, Influenza B, virus del morbillo, virus degli orecchioni, virus della parainfluenza 1, virus della parainfluenza 2, virus della parainfluenza 3, virus sinciziale respiratorio A, virus sinciziale respiratorio B, Rhinovirus.

Il ceppo 4617 di *Bordetella bronchiseptica* e *Bordetella holmesii* sono stati analizzati a 1,0 x 10⁵ CFU/mL e hanno reagito con il test *illumigene* Pertussis.

ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

Le seguenti sostanze chimiche, alle specifiche concentrazioni saturate di solvente/diluente, non interferiscono con i risultati dei test: acetaminofene (10 mg/mL), Advil® [ibuprofene (10 mg/mL)], spray nasale decongestionante Afrin® [ossimetazolina cloridrato (0,0005% w/v)], albuterolo solfato [salbutamolo solfato (1% w/v)], aspirina (5mg/mL), compresse per sintomi influenzali/raffreddore Coricidin® HBP [acetaminofene (3,26 mg/mL), clorfeniramina maleato (0,02 mg/mL)], difenidramina HCl (0,25 mg/mL), eritromicina (2% w/v), mupirocina (2% w/v), gel petrolio [petrolato bianco (1% w/v)], sciroppo per congestione toracica/tosse DM Robitussin® [dexometrorfano HBr (0,1 mg/mL), guaifenesina (1,0 mg/mL)], sufedrina PE [fenilefrina HCl (0,3 mg/mL)], spray nasale salino [cloruro di sodio (0,0065% w/v)], tabacco senza fumo (da fiuto) (1% w/v), tobramicina (0,6 mg/mL), Vicks® VapoRub® [canfora (0,48% w/v), olio di eucalipto (0,12% w/v), mentolo (0,26% w/v)].

L'aspirina ha interferito con l'analisi del test *illumigene* Pertussis a concentrazioni superiori a 5 mg/mL.

Le seguenti sostanze biologiche, alle specifiche concentrazioni saturate di solvente/diluente, non interferiscono con i risultati dei test: DNA umano (200 µg/L), mucina [ghiandola sottomascellare bovina tipo I-S (1% w/v)], sangue intero (1% w/v).

FRANCAIS



Test d'amplification de l'ADN pour la détection du *Bordetella pertussis* sur les écouvillons nasopharyngés

REF 280750

IVD Dispositif médical de diagnostic in vitro

BUT DE LA METHODE

Le test d'amplification ADN *illumigene* Pertussis, réalisé sur l'instrument *illumipro-10™* est un test qualitatif de diagnostic in vitro pour la détection directe de *Bordetella pertussis* chez l'Homme sur des écouvillonnages nasopharyngés, recueillis chez des patients suspectés d'infection des voies respiratoires due à *Bordetella pertussis*.

Le test *illumigene* Pertussis utilise la technologie d'amplification génique isotherme de l'ADN (LAMP) pour détecter *Bordetella pertussis* en ciblant la séquence d'insertion IS481 du génome de *Bordetella pertussis*. La séquence d'insertion IS481 peut également être retrouvée dans *Bordetella holmesii* et certaines souches de *Bordetella bronchiseptica*. Alors que les maladies respiratoires provoquées par *B. bronchiseptica* sont rares chez l'homme, des épidémies mixtes impliquant *B. holmesii* et *B. pertussis* ont été décrites. Les résultats positifs décrits pour les tests d'amplification de l'ADN ciblant IS481 peuvent être compatibles avec la présence de *B. holmesii* ou de *B. pertussis*. Quand des facteurs cliniques suggèrent que l'infection respiratoire n'est pas provoquée par *B. pertussis*, d'autres investigations cliniquement pertinentes peuvent être réalisées conformément aux recommandations publiées.

Les résultats du test *illumigene* Pertussis doivent être utilisés en association avec les renseignements obtenus au cours de l'évaluation clinique du patient et vus comme une aide au diagnostic de l'infection respiratoire.

Le test *illumigene* Pertussis est destiné à une utilisation dans les hôpitaux, centre de référence, dans les laboratoires publics ou privés. Le dispositif n'est pas prévu pour une utilisation dans une unité de soins ou au chevet des patients.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le test d'amplification de l'ADN *illumigene* Pertussis est basé sur la technologie d'amplification génique isotherme (LAMP).^{1,2} Le test cible une séquence de 198 paires de bases (pb) du génome de *Bordetella pertussis* qui se trouvent dans une région de la séquence d'insertion IS481.

L'amplification génique isotherme (LAMP) utilise des amorces spécialement conçues pour obtenir une amplification de l'ADN spécifique, continue et isotherme. Le pyrophosphate de magnésium est un produit secondaire de cette amplification, et forme un précipité blanc qui trouble la solution de réaction. Les caractéristiques d'absorbance de la solution de réaction sont suivies par l'instrument *illumipro-10* Incubateur/Lecteur de Meridian. La présence de l'ADN cible est signalée par la modification des caractéristiques d'absorbance de la solution de réaction en raison de la précipitation du pyrophosphate de magnésium. En l'absence de l'ADN cible, aucune modification significative de l'absorbance de l'échantillon n'est observée.

Le kit *illumigene* Pertussis inclut le réactif de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif *illumigene* Pertussis, les dispositifs de test *illumigene* Pertussis, le tampon d'échantillon *illumigene* Pertussis et de l'huile minérale. Le contrôle de dosage/le Contrôle Négatif *illumigene*, utilisé pour la dilution et la préparation l'échantillon, est une solution tamponnée Tris contenant des *E. coli* traités au formol, et porteurs d'ADN de *Staphylococcus aureus*. Le dispositif de test *illumigene* Pertussis contient une bille de réactif d'amplification lyophilisé dans chacune de ses deux chambres: une chambre de TEST comprenant des amorces spécifiques à IS481 et une chambre de CONTROLE comprenant des amorces spécifiques à *S. aureus*. L'ADN de *S. aureus* du Contrôle de dosage/Contrôle Négatif et les amorces spécifiques à *S. aureus* dans la chambre de CONTROLE jouent le rôle de contrôle interne du test. Pendant la préparation du l'échantillon, chaque échantillon de patient est dilué avec Contrôle de dosage/Contrôle Négatif et mélangé avec l'ADN de *S. aureus* avant l'amplification. L'ajout d'ADN de *S. aureus* à l'échantillon d'une patiente permet de traiter en parallèle l'ADN ciblé et l'ADN de contrôle par l'amplification et la détection. Le contrôle interne permet de déceler un problème d'inhibition de l'amplification et l'efficacité des réactifs du test ou du traitement des échantillons. La séquence du contrôle *S. aureus* doit être amplifiée et détectée dans la réaction finale; dans le cas contraire, le test est considéré comme étant non valide et les résultats du patient ne peuvent pas être rapportés.

L'instrument *illumipro-10* suit les modifications des caractéristiques d'absorbance en mesurant la transmission de la lumière à travers les solutions de réaction de test et de contrôle. La transmission de la lumière est contrôlée au début (Signal_{initial}, S_i) et à la fin (Signal_{final}, S_f) de l'exécution du test. L'instrument *illumipro-10* calcule la variation de la transmission de la lumière entre le début et la fin de l'exécution du test (S_f/S_i) et il compare le rapport à une valeur seuil prédéfinie.

Des valeurs seuil prédéfinies pour la chambre de TEST sont utilisées pour présenter les résultats des échantillons. Les rapports S_f/S_i inférieurs à 82 % dans la chambre de TEST sont présentés en résultat « POSITIF »; les rapports S_f/S_i supérieurs ou égaux à 82 % dans la chambre de TEST sont présentés en résultat « NEGATIF ». Les valeurs numériques ne sont pas présentées.

Des valeurs seuil prédéfinies pour la chambre de CONTROLE sont utilisées pour confirmer la validité du test. Les rapports S_f/S_i inférieurs à 90 % dans la chambre de CONTROLE sont considérés comme valides et conduisent à la présentation des résultats de la chambre de TEST (POSITIF, NEGATIF). Les rapports S_f/S_i supérieurs ou égaux à 90 % dans la chambre de CONTROLE sont considérés comme non valides et empêchent la présentation des résultats pour la chambre de TEST. Les réactions non valides de la chambre de CONTROLE sont présentées comme « NON VALIDES ». Les valeurs numériques ne sont pas présentées.

Des critères d'exclusion plus sévères sont appliqués à la réaction de la chambre de CONTROLE pour s'assurer que l'amplification n'est pas inhibée, que les réactifs fonctionnent comme prévu et que l'échantillon a été traité de manière appropriée.

PRINCIPE DU TEST

Bordetella pertussis est un agent pathogène humain exclusif, responsable d'une maladie respiratoire endémique, la coqueluche; il s'agit d'une maladie à déclaration obligatoire dans certains pays qui a touché plus de 200,000 personnes dans le monde en 2012. Aux Etats-Unis, la coqueluche est actuellement la seule maladie qui affiche une tendance à l'augmentation des cas déclarés et une morbidité substantielle en dépit de la disponibilité d'un vaccin.³ Les Centers for Disease Control (CDC) des Etats-Unis ont enregistré environ 48,300 cas de coqueluche en 2012, soit une moyenne de 15,4 cas pour 100,000 habitants.⁴ Des épidémies récentes de coqueluche ont indiqué que l'immunité des enfants diminuait progressivement après avoir reçu la dernière dose de rappel du vaccin acellulaire, rendant les populations pédiatriques âgées de 7 à 11 ans, vaccinées comme non vaccinées, sensibles à une infection par la coqueluche.^{5,6}

Les épidémies de coqueluche sont particulièrement difficiles à contrôler, car les stades précoces de la maladie ressemblent à ceux d'autres maladies respiratoires alors que les patients restent hautement infectieux pendant jusqu'à 5 semaines après l'apparition des symptômes.³ De plus, le diagnostic de coqueluche ne peut être retenu définitivement qu'en présence de la toux coquelucheuse caractéristique (« chant du coq ») qui apparaît environ 2 semaines après le début des symptômes.³ Le diagnostic clinique de la coqueluche peut s'appuyer sur des cultures, une sérologie ou des tests d'amplification de l'acide nucléique. Bien que la culture soit hautement spécifique, sa sensibilité est faible, l'obtention des résultats peut demander jusqu'à 7 jours, et le nombre de cellules viables nécessaires pour une culture diminue au fur et à mesure de l'évolution de la maladie (à partir de 2 semaines après l'apparition des symptômes).⁷ Contrairement aux cultures, les tests d'amplification de l'acide nucléique peuvent fournir des résultats rapides et ne nécessitent pas de bactéries viables. Cependant, de l'ADN bactérien doit encore être présent dans le nasopharynx (jusqu'à 4 semaines après l'apparition de la toux) afin d'éviter des résultats faussement négatifs.⁸ De plus, seuls les patients symptomatiques ayant une toux devraient être testés par amplification de l'acide nucléique afin d'éviter des résultats faux-positifs liés à des contacts de proches asymptomatiques.⁵ La sérologie ne peut être utilisée pour le diagnostic qu'aux stades tardifs de la maladie, environ 2 à 8 semaines après l'apparition de la toux.

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

1. **Contrôle du dosage/Contrôle Négatif *illumigene* Pertussis:** Solution tampon Tris contenant des cellules d'*E. coli* traitées au formol, abritant un plasmide contenant un segment du génome de *S. aureus* et de l'azide de sodium (0,09 %) en tant que conservateur.
2. **Dispositif de test *illumigene* Pertussis:** dispositif à deux chambres contenant les réactifs d'amplification lyophilisés (ADN polymérase, désoxynucléotide triphosphates), soit des amorces spécifiques de l'IS481 (chambre de TEST), soit des amorces de contrôle (chambre de CONTROLE).

- Tampon pour échantillon d'*illumigene* Pertussis:** solution tampon Tris-EDTA contenant de l'azide de sodium (0,09 %) en tant que conservateur.
- Huile minérale**

MATERIEL FOURNI SEPARÉMENT

Kit de contrôle externe *illumigene* Pertussis, numéro de catalogue: 279930

MATÉRIEL NON FOURNI

- Gants jetables en latex, non poudrés
 - Embouts de pipettes résistant aux aérosols, sans ADNase/ARNase
 - Système de prélèvement et de transport des échantillons
- Écouillons nasopharyngés:** Polyester (capacité minimale 18 µL, par exemple le catalogue de produits Puritan Medical, référence 25-801-D50); nylon floqué (capacité minimale 31 µL, par exemple le catalogue de produits Puritan Medical, référence 25-201-R50); ou rayonné (capacité minimale 69 µL, par exemple, Copan 503CS01).
- Milieu de transport non nutritif:** Liquide Amies, sans charbon; ou Liquide Stuart (volume maximum: 1,2 mL)

EQUIPEMENT NON FOURNI

- Bain à sec avec élément thermique de 12 mm pouvant atteindre 95 C
- Thermomètre numérique avec mémoire de température maximale/minimale (par ex., thermomètre étanche/antichoc Traceable® Lollipop™)
- Agitateur-mélangeur Vortex
- Minuteur
- Micropipette d'une contenance de 50 µL
- illumipro-10*, Meridian Bioscience, Inc. Numéro de référence: 610172

PRECAUTIONS

- Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
- Ne pas mélanger Contrôle de dosage/Contrôle Négatif ou les dispositifs de test appartenant à des lots différents. Le tampon de réaction et l'huile minérale sont interchangeables à condition de se trouver dans les limites de la date de péremption au moment de leur utilisation.
- Suivre les consignes de sécurité biologique de niveau 2 et les bonnes pratiques de laboratoire pendant les tests.⁹ Traiter tous les spécimens et tous les dispositifs de test comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Ne pas manger, boire ou fumer dans les espaces où les échantillons ou les réactifs du kit sont manipulés.
- Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons. Se laver minutieusement les mains après la manipulation.
- Les programmes de contrôle de la qualité pour les laboratoires d'analyses moléculaires, y compris la bonne utilisation et l'entretien de l'équipement, doivent être suivis.¹⁰
- Le dispositif de test *illumigene* Pertussis contient des réactifs lyophilisés. Ne pas retirer la pochette de protection avant d'être prêt à effectuer le test.
- Le dispositif de test *illumigene* Pertussis est muni d'un loquet conçu pour éviter la contamination de la zone de test avec le produit d'amplification. NE PAS utiliser les dispositifs de test dont le loquet est brisé.
- Jeter les dispositifs de test *illumigene* immédiatement après le traitement en laissant le loquet bien en place. Ne PAS ouvrir le dispositif de test après le traitement. L'ouverture du dispositif après l'amplification peut contaminer la zone de test avec le produit d'amplification.

PHRASES DE RISQUE ET CONSEILS DE PRUDENCE

A notre connaissance, il n'y pas de risques associés à ce produit.

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'expiration figure sur l'étiquette du kit. Conserver le kit à une température comprise entre 2 C et 30 C.

PREPARATION DES REACTIFS

S'assurer que les réactifs du kit sont à la température ambiante (21 C à 30 C) avant leur emploi. On pourrait obtenir des résultats incorrects si les réactifs ne sont pas amenés à la température ambiante avant l'emploi.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Type d'échantillon: Ecouillons nasopharyngés

Prélèvement des échantillons: Le prélèvement des échantillons nasopharyngés sur écouvillon doit être effectué selon les procédures de l'établissement concernant le recueil des spécimens en cas d'infection par *Bordetella pertussis*. Les échantillons nasopharyngés sur écouvillon doivent être recueillis avec les types appropriés d'écouvillon (par ex., en coton, mousse, nylon floqué, polyester ou rayonné).

Placer les écouvillons dans un milieu de transport non nutritif (par exemple Liquide Amies, sans charbon ou Liquide Stuart) ou conserver les échantillons sans conservateurs dans un tube stérile ne contenant aucun milieu.

Les échantillons sans conservateur ou les échantillons conservés dans un milieu de transport doivent être traités le plus rapidement possible, mais ils peuvent être maintenus à température ambiante (21 C à 30 C) pendant une période pouvant atteindre 5 jours ou réfrigérés (2 C à 8 C) pendant une période pouvant atteindre 7 jours avant d'être testés. Ne pas congeler les échantillons.

PREPARATION DES ECHANTILLONS:

REMARQUE: s'assurer que l'instrument *illumipro-10* est sous tension et que la vérification de ses performances a été accomplie avant le commencement de la PREPARATION DES ECHANTILLONS. Consulter le manuel de l'utilisateur de l'*illumipro-10* pour obtenir de plus amples renseignements sur l'installation et le fonctionnement de l'appareil.

- Placer l'écouvillon dans un tube étiqueté contenant un tampon pour échantillon. Couper la tige de l'écouvillon pour permettre à l'échantillon de tenir dans le tube. Eluer l'échantillon en le passant au vortex pendant 45 à 60 secondes. Retirer l'écouvillon et le jeter. **Les échantillons élués peuvent être maintenus à température ambiante (21 C à 30 C) pendant une période pouvant atteindre 48 heures ou réfrigérés (2 C à 8 C) pendant une période pouvant atteindre 7 jours avant d'être testés.**
- Ajouter 50 µL d'échantillon élué à un tube étiqueté de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif et boucher le tube.
- Recommencer les étapes de préparation des spécimens pour tous les échantillons à traiter.
- Mélanger au Vortex chaque tube de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif contenant un échantillon élué pendant approximativement 10 secondes.
- Chauffer chaque mélange échantillon/contrôle dans un bain thermique à sec/bloc chauffant à 95 ± 5 C pendant 10 ± 2 minutes. Surveiller l'étape de traitement thermique à l'aide d'un thermomètre numérique et d'un minuteur.
- Retirer chaque tube d'échantillon/de contrôle du bain thermique à sec/du bloc chauffant. Les échantillons ayant été traités thermiquement peuvent être conservés à température ambiante (entre 21 C et 30 C) pendant un maximum de 15 minutes avant d'être analysés.
- Mélanger vortex pendant environ 10 secondes.

PROCÉDURE DE TEST

REMARQUE: Il est possible de traiter au maximum 10 échantillons à la fois dans l'*illumipro-10*.

- Retirer un (1) dispositif de test *illumigene* Pertussis de sa pochette de protection pour chaque échantillon. Ouvrir le dispositif avec précaution en tenant les compartiments de sorte que le réactif lyophilisé ne tombe pas au moment de l'ouverture.
- Transférer 50 µL de chaque échantillon traité thermiquement dans la chambre de TEST (bille blanche) du dispositif de test *illumigene*. Veiller à ne pas introduire d'air supplémentaire dans le mélange réactif. A l'aide d'un embout de pipette neuf, transférer 50 µL d'échantillon traité thermiquement dans la chambre de CONTROLE (bille jaune) du dispositif de test *illumigene*. Veiller à ne pas introduire d'air supplémentaire dans le mélange réactif.
- Ajouter 1 goutte d'huile minérale dans, à la fois, la chambre de TEST et la chambre de CONTROLE. Fermer le dispositif de test *illumigene* et engager correctement le loquet.
- Tapoter le dispositif sur la paillasse ou mélanger pour éliminer les bulles d'air. Observer soigneusement la réhydratation de la bille de contrôle/test du dispositif de test et rechercher la présence de bulles d'air dans la chambre et le liquide dans les bouchons du dispositif. En cas de billes non dissoutes, de bulles d'air ou de liquide dans les bouchons, tapoter le dispositif sur le dessus de la paillasse et répéter l'examen visuel. L'amplification et la détection doivent commencer dans les 15 minutes.
- Insérer chaque dispositif de test *illumigene* dans l'*illumipro-10* et lancer la réaction d'amplification et la détection. Les résultats seront affichés à la fin de l'exécution du test.

INTERPRETATION DES RESULTATS

| ID échantillon | Résultats indiqués | Interprétation |
|---------------------|--------------------|--|
| Spécimen du patient | POSITIF | Échantillon contenant l'ADN cible de <i>Bordetella pertussis</i> . |
| | NEGATIF | Aucun ADN de <i>Bordetella pertussis</i> détecté. |
| | NON VALIDE | Résultat non exploitable. Recommencer le test à l'aide des échantillons d'origine. Spécimen de patient inhibiteur, mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne de l'instrument ou échec du contrôle interne. |
| Contrôle positif | POSITIF | Résultat de contrôle positif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l' <i>illumipro-10</i> . |
| | NEGATIF | Résultat de contrôle non valide. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée. |
| | NON VALIDE | Résultat non exploitable. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons d'origine. Mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne de l'instrument ou échec du contrôle interne. |
| Contrôle négatif | POSITIF | Résultat de contrôle non valide. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée. |
| | NEGATIF | Résultat de contrôle négatif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l' <i>illumipro-10</i> . |
| | NON VALIDE | Résultat non exploitable. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons d'origine. Mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne de l'instrument ou échec du contrôle interne. |
| PUITS VIDE | AUCUN | Aucun dispositif de test <i>illumigene</i> dans le puits de l' <i>illumipro-10</i> . OU Le dispositif de test <i>illumigene</i> présente ne répond pas en raison d'une mauvaise préparation des échantillons, de saleté ou d'un mauvais positionnement du dispositif. Recommencer le test à l'aide des échantillons d'origine. |

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

- Chaque dispositif contient une chambre de contrôle interne contrôlant l'inhibition de l'amplification, les réactifs de dosage et l'efficacité du traitement des échantillons.
- L'étape du traitement thermique est surveillée avec un thermomètre et un minuteur externes. Utiliser la mémoire des températures maximum/minimum du thermomètre pour vérifier qu'une température de 95 ± 5 C est maintenue. Utiliser le minuteur pour vérifier que la durée du traitement thermique est de 10 ± 2 minutes.
- Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'emploi de matériels de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives locales, nationales ou fédérales appropriées relatives à l'exécution de contrôles de qualité externes.
- Les réactifs de contrôle externes *illumigene* Pertussis sont vendus séparément (Réf.: 279930). Il est recommandé de vérifier la réactivité de chaque nouveau lot et chaque nouvel envoi d'*illumigene* Pertussis dès leur réception et avant l'emploi. Les tests de contrôle externe doivent être exécutés par la suite conformément aux directives locales, nationales et/ou fédérales. Le kit de test d'*illumigene* Pertussis ne doit pas être utilisé pour tester les patients si les contrôles externes ne fournissent pas de résultats corrects.
- Utiliser un dispositif séparé pour chaque réactif de contrôle externe.

VALEURS ATTENDUES

L'incidence globale de *B. pertussis* dans une série de spécimens recueillis et testés de façon prospective au cours de cette étude a été d'environ 10,0 % (51/508).

LIMITATIONS DU TEST

- Ce produit peut uniquement être utilisé avec l'instrument *illumipro-10*.
- Le test d'ADN *illumigene* Pertussis est un test qualitatif qui ne fournit pas de valeurs quantitatives ou d'informations sur la charge en organismes.
- Ce dispositif n'a pas été évalué pour la surveillance du traitement des infections à *Bordetella pertussis*.
- Les infections respiratoires peuvent être provoquées par *Bordetella pertussis* ainsi que par d'autres pathogènes. Des résultats positifs n'excluent pas une co-infection par d'autres pathogènes respiratoires.
- La détection de l'acide nucléique dépend de la réalisation correcte du recueil, de la manipulation, du transport, de la conservation et de la préparation de l'échantillon. Le non-respect de la procédure appropriée lors de l'une de ces étapes peut entraîner des résultats incorrects.
- La prévalence de l'infection à *B. pertussis* influence la valeur prédictive du test.
- Les acides nucléiques de l'organisme peuvent persister *in vivo* de manière indépendante de la viabilité de l'organisme. Le test *illumigene* Pertussis ne fait pas de distinction entre les organismes viables et non viables.
- Comme avec tous les tests de diagnostic moléculaire, (A) des résultats faux-négatifs peuvent se produire en raison de la présence d'inhibiteurs, d'une erreur technique, d'un mélange d'échantillons ou de quantités faibles d'organismes dans l'échantillon clinique, (B) des résultats faux-positifs peuvent se produire en raison de la présence d'une contamination croisée par des organismes cibles, leurs acides nucléiques ou du produit amplifié, et en raison de signaux non spécifiques.
- Le test *illumigene* Pertussis est dirigé contre la séquence d'insertion IS481 du génome de *Bordetella*. La séquence d'insertion IS481 est présente dans *B. pertussis*, *B. holmesii* et certaines souches de *B. bronchiseptica*.
- L'acide acétyl salicylique, quel qu'il soit, se trouve dans l'aspirine, a entraîné des résultats non valides sur des tests à des concentrations supérieures à 5 mg/mL au cours de tests de reproduction de la limite de détection sur des souches de *B. pertussis* BAA-589.

PERFORMANCES DU TEST

Le test d'amplification de l'ADN *illumigene* Pertussis a été évalué de décembre 2012 à juillet 2013 par des centres de tests cliniques indépendants représentant des régions géographiquement distinctes à travers les Etats-Unis. Au total, 729 échantillons nasopharyngés (NP) sur écouvillon qualifiés, recueillis auprès de patients suspects d'une infection à *B. pertussis* ont été évalués avec le dispositif de test pour établir les caractéristiques des performances. Les échantillons étaient des restes, des spécimens dé-identifiés qui avaient été envoyés antérieurement pour des tests de routine à la recherche de *B. pertussis*. Les échantillons inclus dans l'évaluation de la performance étaient prospectifs (jamais congelés) et rétrospectifs (congelés avant l'analyse *illumigene*). La performance du test *illumigene* Pertussis a été comparée à une méthode composite de référence qui incluait deux tests par PCR en temps réel, ciblant IS481 et validés par le fabricant, suivis de séquençage bidirectionnel des amplicons issus des échantillons positifs par PCR. La valeur seuil calculée du cycle (Ct) de chaque test par PCR a été établie à 35,6, limite de détection du test (PCR1: 3750 UFC/mL, PCR2: 4522 UFC/mL). Les échantillons ont été considérés positifs lorsque les résultats PCR de l'un des tests comparateurs ont fourni des valeurs Ct inférieures à 35,6 et que le résultat du séquençage bidirectionnel correspondant était positif. Les échantillons ont été considérés négatifs quand les résultats des tests PCR comparateurs ont fourni des valeurs Ct supérieures à 35,6. Au total, 508 (69,7%) échantillons prospectifs et 221 (30,3%) échantillons rétrospectifs ont été testés. Des résultats non valides ont été obtenus pour 13 échantillons (1,8%); deux étaient encore non valides après la répétition du test. Deux spécimens prospectifs et deux spécimens rétrospectifs ont donné des résultats non déterminés avec les tests PCR comparateurs. Le Tableau 1 résume les caractéristiques de performance du test *illumigene*; le Tableau 2 décrit les caractéristiques de performance du test *illumigene* pour chaque site.

Tableau 1. Caractéristiques de performance du test *illumigene*

| Description de l'échantillon | Echantillons positifs | | | Echantillons négatifs | | | Résultats non valides ^a |
|--------------------------------|--|-------------------------------------|----------------------|--|-------------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| | <i>illumigene</i> par rapport au comparateur | Pourcentage de concordance positive | IC à 95 % | <i>illumigene</i> par rapport au comparateur | Pourcentage de concordance négative | IC à 95 % | |
| Comparateur; Méthode composite | | | | | | | |
| Prospectif | 30/32 | 93,8 % | 79,9 – 98,3 % | 451/472 | 95,6 % | 93,3 – 97,1 % | 2 (13) |
| Rétrospectif | 21/21 | 100,0 % | 84,5 – 100,0 % | 192/198 | 97,0 % | 93,5 – 98,6 % | 0 |
| TOTAL | 51/53 | 96,2 % | 87,2 – 99,0 % | 643/670 | 96,0 % | 94,2 – 97,2 % | 2 (13) |

^a 11 spécimens sur 13, initialement non valides, ont fourni des résultats valides après répétition du test.

Tableau 2. Performance du test *illumigene* par site

| Description de l'échantillon | Echantillons positifs | | | Echantillons négatifs | | | Résultats non valides ^a |
|--------------------------------|--|-------------------------------------|----------------------|--|-------------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| | <i>illumigene</i> par rapport au comparateur | Pourcentage de concordance positive | IC à 95 % | <i>illumigene</i> par rapport au comparateur | Pourcentage de concordance négative | IC à 95 % | |
| Comparateur; Méthode composite | | | | | | | |
| Centre 1 | 41/43 | 95,3 % | 84,5 – 98,7 % | 449/470 | 95,5 % | 93,3 – 97,1 % | 1 (12) |
| Centre 2 | 3/3 | 100,0 % | 43,9 – 100,0 % | 67/70 | 95,7 % | 88,1 – 98,5 % | 1 (1) |
| Centre 3 | 0/0 | N/A | N/A | 8/8 | 100,0 % | 67,6 – 100,0 % | 0 |
| Centre 4 | 7/7 | 100,0 % | 84,6 – 100,0 % | 119/122 | 97,5 % | 93,0 – 99,2 % | 0 |
| TOTAL | 51/53 | 96,2 % | 87,2 – 99,0 % | 643/670 | 96,0 % | 94,2 – 97,2 % | (13) |

^a 11 spécimens sur 13, initialement non valides, ont fourni des résultats valides après répétition du test.

Des études cliniques ont été effectuées avec de nombreux types d'écouvillons nasopharyngés et de tampons d'éluion. Les tampons d'échantillons testés au cours des études cliniques ont inclus le sérum physiologique 0,85% (n=30 ou 4,1%), le Tris-EDTA (n=8 ou 1,1%) et l'eau de qualité biologie moléculaire (n=687 ou 94,2%). Tous les tampons d'échantillons ont été utilisés à un volume de 0,5 mL. Des études analytiques ont été effectuées avec du Sérum physiologique 0,85%, du Tris-EDTA, du tampon phosphate (PBS) et de l'eau de qualité biologie moléculaire. Des études analytiques ont établi l'équivalence de tous les types de tampons d'échantillon utilisés.

Des renseignements sur l'âge des patients étaient disponibles pour 723 (99,2%) patients dont les échantillons ont été testés. L'âge des patients était compris entre 1 mois et 88 ans. Trente-huit (5,2%) patients étaient âgés de moins de 1 an; 13 (1,8%) avaient entre 1 et 2 ans; 296 (40,6%) avaient entre 2 et moins de 12 ans, 157 (21,5%) avaient entre 12 et 21 ans, 190 (26,0%) avaient plus de 21 ans mais moins de 65 ans, et les 29 patients restants (4,0%) avaient plus de 65 ans. On ne s'attend pas à ce que le test *illumigene* Pertussis se comporte différemment quand les spécimens évalués proviennent de patients de différents groupes d'âge.

La population de l'étude a inclus 413 (56,7%) patients de sexe féminin et 308 (42,2%) patients de sexe masculin. Le sexe était inconnu pour 8 (1,1%) patients inclus dans l'étude. On ne s'attend pas à ce que les caractéristiques de performance du test *illumigene* Pertussis soient influencées par le sexe du patient.

SENSIBILITE ANALYTIQUE

La sensibilité analytique ou la limite de détection du test *illumigene* Pertussis a été établie pour la souche de *Bordetella pertussis* ATCC BAA-589, Tahoma I.

La limite de détection a été déterminée en utilisant 60 répliqués de la souche de *Bordetella pertussis* ATCC BAA-589 et une probabilité théorique (par exemple 95% soit 57 répliqués sur 60 sont positifs) de réponses positives à obtenir. La sensibilité analytique observée est résumée ci-dessous:

| Description de la souche de <i>B. pertussis</i> | UFC/mL | UFC/Test |
|---|--------|----------|
| ATCC BAA-589 (Tahoma I) | 3265 | 1,48 |

REACTIVITE DU TEST

Les souches de *B. pertussis* suivantes ont été testées et ont fourni des réactions positives à 3265 UFC/ml ou 1,48 UFC/test avec la technique *illumigene* Pertussis : ATCC 12743; ATCC 8478; ATCC 8467; ATCC 9797; ATCC 53894; ATCC 10380; ATCC 12742; et A639. Les souches de *B. pertussis* suivantes ont été testées et ont fourni des réactions positives à 3500 UFC/ml ou 1,59 UFC/test avec la technique *illumigene* Pertussis : ATCC 51445 et ATCC BAA-1335.

REPRODUCTIBILITE

Des études de reproductibilité ont été réalisées par trois des quatre sites cliniques participants. Des panels codés, en aveugle, comportant 10 échantillons ont été fournis aux laboratoires participants. Les échantillons furent codifiés au hasard pour chaque panel afin de masquer les identités. Les panels incluaient des échantillons préparés artificiellement, des modérément positifs ($1,31 \times 10^4$ UFC/mL ou 6 UFC/test), des faiblement positifs ($4,89 \times 10^3$ UFC/mL ou 2 UFC/test) et des échantillons hautement négatifs (8,2 UFC/mL ou 0,004 UFC/test). Le panel incluait également un échantillon négatif, un contrôle positif et un contrôle négatif. Les tests furent exécutés par des techniciens différents dans chaque centre, le même jour (variabilité intra-test), pendant cinq jours (variabilité inter-tests). Trois lots de tests *illumigene* Pertussis et six instruments *illumipro-10* furent utilisés dans cette étude. Les contrôles positifs et négatifs furent testés chaque jour de test. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous:

| Type d'échantillon | Centre 1 | | Centre 2 | | Centre 4 | | Total | |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Concordance en pourcentage | Concordance en pourcentage | Concordance en pourcentage | Concordance en pourcentage | Concordance en pourcentage | Concordance en pourcentage | Concordance en pourcentage | Concordance en pourcentage |
| Modérément positif | 30/30 | 100,0 % | 30/30 | 100,0 % | 30/30 | 100,0 % | 90/90 | 100,0 % |
| Faiblement positif | 27/30 | 90,0 % | 29/30 | 96,7 % | 30/30 | 100,0 % | 86/90 | 95,6 % |
| Fortement négatif | 26/30 | 86,7 % | 23/30 | 76,7 % | 29/30 | 96,7 % | 78/90 | 86,7 % |
| Négatif | 10/10 | 100,0 % | 9/10 | 90,0 % | 10/10 | 100,0 % | 29/30 | 96,7 % |
| Contrôle négatif | 10/10 | 100,0 % | 10/10 | 100,0 % | 10/10 | 100,0 % | 30/30 | 100,0 % |
| Contrôle positif | 10/10 | 100,0 % | 10/10 | 100,0 % | 10/10 | 100,0 % | 30/30 | 100,0 % |

REACTIONS CROISEES

Des études de réactivité croisée ont été effectuées sur des échantillons obtenus par lavage nasal, positifs et négatifs, inoculés avec des organismes bactériens et fongiques de manière à obtenir une concentration finale de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL ou virus à la dose infectieuse médiane de culture tissulaire de $1,0 \times 10^5$ DICT₅₀/mL. Aucun des organismes suivants n'a réagi avec le test *illumigene* Pertussis: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella petrii*, *Bordetella trematum*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella jordanis*, *Legionella longbeachae*, *Legionella micdadei*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria elongata*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus anginosus* (Groupe F), *Streptococcus bovis* (Groupe D), *Streptococcus canis* (Groupe G), espèces *dysgalactiae* de *Streptococcus dysgalactiae*, espèces *equisimilis* de *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus suis*, *Ureaplasma urealyticum*, adénovirus, coronavirus, coxsackievirus, cytomégalovirus, virus d'Epstein Barr, virus Herpes Simplex 1, Herpes virus Herpes simplex 2, métagonovirus humain, influenza A, influenza B, virus de la rougeole, virus des oreillons, virus parainfluenza 1, virus parainfluenza 2, virus parainfluenza 3, virus syncytial respiratoire A, virus respiratoire syncytial B, rhinovirus.

Bordetella bronchiseptica (souche 4617) et *Bordetella holmesii* ont été testées à des concentrations de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL; elles ont réagi avec le test *illumigene* Pertussis.

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Les substances chimiques suivantes, aux concentrations de saturation solvant/diluant spécifiées, n'influencent pas les résultats de test: Acétaminophène (paracétamol) (10 mg/mL), Advil® [ibuprofène (10 mg/mL)], spray nasal décongestionnant Afrin® [chlorhydrate d'oxymétazoline (0,0005% p/v)], sulfate d'albutérol [sulfate de salbutamol (1% p/v)], Aspirine (5mg/mL), comprimés de Coricidin® HBP Cold/Flu (rhume/grippe) [Acétaminophène (paracétamol) (3,26 mg/mL), maléate de chlorphéniramine (0,02 mg/mL)], chlorhydrate de diphényldramine (0,25 mg/mL), érythromycine (2% p/v), (mupirocine) (2% p/v), gelée de pétrole [vaseline blanche (1% p/v)], sirop contre la toux Robitussin® Cough+Chest Congestion DM (toux + encombrement bronchique) [dextrométhorphan HBr (0,1 mg/mL), guaifénésine (1,0 mg/mL)], suphédrine PE [chlorhydrate de phényléphrine (0,3 mg/mL)], spray nasal de sérum physiologique [chlorure de sodium (0,0065% p/v)], tabac sans fumée (1% p/v), tobramycine (0,6 mg/mL), Vicks® VaporRub® [camphre (0,48% p/v), huile d'eucalyptus (0,12% p/v), menthol (0,26% p/v)].

L'aspirine perturbe le test *illumigene* Pertussis à des concentrations supérieures à 5 mg/mL.

Les substances biologiques suivantes, aux concentrations de saturation solvant/diluant spécifiées, n'influencent pas les résultats de test: ADN humain (200 ng/μL), mucine [Mucine de type I-S de glande sous maxillaire bovine (1% p/v)], sang total (1% p/v).

ESPAÑOL


Pertussis
Ensayo de amplificación de ADN

Ensayo de amplificación de ADN para la detección de *Bordetella pertussis* en muestras de hisopos nasofaríngeo

REF 280750

IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

USO INDICADO

El ensayo de amplificación de ADN *illumigene* Pertussis, realizado en el *illumipro-10*[™], es una prueba de diagnóstico in vitro cualitativa para la detección directa de *Bordetella pertussis* en las muestras de hisopos nasofaríngeo humano tomadas de los pacientes de los que se sospecha que tienen una infección de las vías respiratorias que se puede atribuir al *Bordetella pertussis*.

El ensayo para la tos ferina *illumigene* utiliza la tecnología de amplificación de ADN isotérmica (LAMP) mediada por bucle para detectar *Bordetella pertussis* dirigiéndose al elemento insercional IS481 del genoma de *Bordetella pertussis*. El elemento insercional IS481 también se puede encontrar en *Bordetella holmesii* y en algunas cepas de *Bordetella bronchiseptica*. Mientras que la enfermedad respiratoria causada por *B. bronchiseptica* no es frecuente en los humanos, se ha informado de brotes epidémicos mixtos que implican a *B. holmesii* y a *B. pertussis*. Los resultados positivos informados por los ensayos de amplificación del ADN dirigidos al IS481 pueden ser coherentes con la presencia de *B. holmesii* o *B. pertussis*. Cuando los factores clínicos sugieren que es posible que *B. pertussis* no sea la causa de la infección respiratoria, se debe/n realizar otra/s investigación/es clínicamente adecuadas de acuerdo con las directrices publicadas.

Los resultados del ensayo *illumigene* Pertussis se deben usar junto con la información obtenida de la evaluación clínica del paciente como ayuda en el diagnóstico de la infección respiratoria.

illumigene Pertussis está diseñado para su uso en laboratorios de hospital, de referencia o estatales. El dispositivo no es para uso en análisis inmediato.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El ensayo de amplificación de ADN *illumigene* Pertussis se basa en la tecnología de amplificación mediada por bucle (LAMP).^{1,2} El ensayo se dirige a una secuencia de 198 pares de base (pb) del genoma de *Bordetella pertussis* que reside en una región de la secuencia del elemento insercional IS481.

La amplificación mediada por bucle utiliza cebadores especialmente diseñados para proporcionar amplificación de ADN isotérmica específica y continua. Un subproducto de esta amplificación es la formación de pirofosfato de magnesio, que crea un precipitado blanco que provoca turbidez en la solución de reacción. Las características de absorbancia de la solución de reacción se vigilan mediante el Lector/Incubadora Meridian *illumipro-10*. Los cambios en las características de absorción de la solución de reacción que se generan a partir de la precipitación del pirofosfato de magnesio indican la presencia del ADN objetivo. La ausencia del ADN objetivo no tiene como resultado un cambio significativo en la absorbancia de la muestra.

El equipo *illumigene* Pertussis incluye el reactivo de control/control negativo del ensayo, dispositivos de prueba *illumigene* Pertussis, tampón de muestra *illumigene* Pertussis y aceite mineral. El control/control negativo del ensayo de *illumigene*, utilizado para la dilución y preparación de muestras, es una solución tamponada con Tris que contiene *E. coli* tratada con formol que alberga ADN de *Staphylococcus aureus*. El dispositivo de prueba *illumigene* Pertussis contiene una microesfera de amplificación liofilizada en cada una de las dos cámaras: una cámara de PRUEBA con cebadores específicos para IS481 y una cámara de CONTROL con cebadores específicos para *S. aureus*. El ADN de *S. aureus* del reactivo de control/control negativo del ensayo y los cebadores específicos para *S. aureus* de la cámara de CONTROL funcionan como control interno para el ensayo. Durante la preparación de las muestras, se añade cada muestra de paciente al reactivo de control/control negativo del ensayo y se combina con ADN de *S. aureus* antes de la amplificación. La adición del ADN del *S. aureus* a la muestra de la paciente permite el procesamiento paralelo del ADN del objetivo y el ADN del control a través de la amplificación y detección. El control interno monitoriza la inhibición de la amplificación, el rendimiento de los reactivos del ensayo y la eficacia del procesamiento de la muestra. El objetivo de control del *S. aureus* debe amplificarse y detectarse en la reacción final o la prueba se considerará no válida y no se darán a conocer los resultados del paciente.

El *illumipro-10* monitoriza los cambios en las características de absorbancia a través de la medición de la transmisión de luz por las soluciones de reacción de Prueba y Control. La transmisión de luz se comprueba al Inicio del proceso (Señal_{Inicio}, S_i) y al Final del proceso (Señal_{Final}, S_f) del ensayo. El *illumipro-10* calcula el cambio producido en la transmisión de luz entre el Final del proceso y el Inicio del proceso (S_f:S_i) y compara el porcentaje con un valor de corte fijo.

Los valores de corte fijos de la cámara de PRUEBA se utilizan para informar resultados de muestras. Los porcentajes de la cámara de PRUEBA S_iS_i inferiores al 82 % se muestran como «POSITIVO»; los porcentajes de la cámara de PRUEBA S_iS_i superiores o iguales al 82 % se muestran como «NEGATIVO». *Los valores numéricos no se informan.*

Los valores de corte fijos de la cámara de CONTROL se utilizan para determinar la validez. Los porcentajes S_iS_i de la cámara de CONTROL inferiores al 90 % se consideran válidos y permiten mostrar los resultados de la cámara de PRUEBA (POSITIVO, NEGATIVO). Los porcentajes S_iS_i de la cámara de CONTROL superiores o iguales al 90 % se consideran no válidos e impiden notificar los resultados de la cámara de PRUEBA. Las reacciones no válidas de la cámara de CONTROL se informan como «NO VÁLIDAS». *Los valores numéricos no se informan.*

Los criterios de corte más rigurosos se aplican a la reacción de la cámara de CONTROL para garantizar que no se inhiba la amplificación, que los reactivos tengan el rendimiento esperado y que el procesamiento de muestras se haya realizado adecuadamente.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

Bordetella pertussis es un patógeno humano responsable exclusivamente de la tos convulsiva (tos ferina) de la enfermedad respiratoria endémica; una enfermedad de declaración obligatoria públicamente que ha tenido un impacto sobre más de 200.000 personas en todo el mundo en 2012. La tos ferina actualmente es la única enfermedad en los EE.UU. que muestra una tendencia creciente de casos de declaración obligatoria e importante morbilidad a pesar de la disponibilidad de una vacuna.³ Los Centros para el Control de Enfermedades de EE.UU. (CDC) informaron de aproximadamente 48.300 casos de tos ferina en 2012, un promedio de 15,4 casos por 100.000 personas en los Estados Unidos.⁴ Los brotes epidémicos de tos ferina recientes han indicado una inmunidad decreciente en los niños después de recibir la última dosis de vacuna acelular de refuerzo, permitiendo la propensión a la infección de tos ferina en poblaciones tanto vacunadas como sin vacunar de niños con edades comprendidas entre 7 y 11.^{5,6}

Los brotes de tos ferina son especialmente difíciles de controlar ya que los estadios tempranos de la enfermedad se asemejan a otras infecciones respiratorias y los pacientes pueden seguir siendo altamente infecciosos durante un máximo de 5 semanas después de la aparición de los síntomas.³ Además, la tos ferina no se diagnostica oficialmente hasta que se muestra la presencia de la tos «convulsa» característica casi 2 semanas después de la aparición de los síntomas.³ El diagnóstico clínico de la tos ferina se puede realizar utilizando cultivos, serología o las pruebas de amplificación del ácido nucleico (NAAT). Mientras que el cultivo es sumamente específico, la sensibilidad es baja, los resultados pueden tardar hasta 7 días y las células viables necesarias para el cultivo disminuyen con la evolución de la enfermedad (después de 2 semanas de la aparición de los síntomas).⁷ A diferencia del cultivo, los ensayos NAAT pueden aportar los resultados de la prueba rápidamente y no necesitan bacterias viables. Sin embargo, el ADN bacteriano debe estar aún presente en la nasofaringe (hasta 4 semanas después del inicio de la tos) para evitar resultados falsamente negativos.⁸ Además, solo se debe probar a los pacientes sintomáticos con tos mediante NAAT para evitar resultados falsamente positivos por contactos estrechos asintomáticos.⁸ La serología sólo se puede usar para el diagnóstico en las últimas etapas de la enfermedad, aproximadamente 2 a 8 semanas después de la aparición de la tos.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

1. **Reactivo de control/control negativo del ensayo *illumigene* Pertussis:** Solución tamponada con Tris que contiene células de *E. coli* tratadas con formol que albergan plásmido que contiene un segmento del genoma de *S. aureus* y azida sódica (0,09 %) como conservante.
2. **Dispositivo de prueba *illumigene* Pertussis:** Dispositivo de dos cámaras que contiene reactivos de amplificación liofilizados (ADN polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos) y, o bien cebadores específicos de IS481 (cámara de PRUEBA) o cebadores de control (cámara de CONTROL).
3. **Tampón de muestra *illumigene* Pertussis:** Solución tamponada con Tris-EDTA que contiene azida sódica (0,09 %) como conservante.
4. **Aceite mineral**

MATERIALES PROPORCIONADOS POR SEPARADO

Equipo de Control Externo *illumigene* Pertussis, número de catálogo: 279930

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Guantes desechables de látex, sin polvo
2. Puntas de pipeta resistentes al aerosol, libras de ribonucleasa/desoxirribonucleasa
3. Sistema de recogida y transporte de muestras
Exudados nasofaríngeos: Poliéster (capacidad mínima 18 µL, p. ej. catálogo de Puritan Medical Products 25-801-D50); nailon flocado (capacidad mínima 31 µL, p. ej. catálogo Puritan Medical Products 25-201-R50); o rayón (capacidad mínima 69 µL, p. ej. Copan 503CS01).
Medios de transporte no nutritivos: Amies líquido, sin carbón; o líquido Stuart (volumen máximo: 1,2 mL)

EQUIPO NO PROPORCIONADO

1. Baño seco con bloque de calor de 12 mm capaz de 95 C
2. Termómetro digital con memoria de temperatura máx/mín (p. ej., termómetro sumergible y a prueba de golpes Traceable® Lollipop™)
3. Mezclador Vortex
4. Cronómetro de intervalos
5. Micropipeta capaz de administrar 50 µL
6. *illumipro-10*, Meridian Bioscience, Inc. Número de catálogo: 610172

PRECAUCIONES:

1. Todos los reactivos son sólo para uso de diagnóstico in vitro.
2. No intercambiar reactivos de control/control negativo de ensayo o dispositivos de prueba entre lotes. El tampón de muestra y el aceite mineral son intercambiables siempre y cuando se usen dentro de la fecha de caducidad asignada.
3. Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio y Bioseguridad de Nivel 2 durante la prueba.⁹ Trate todas las muestras y los dispositivos de prueba usados como capaces de transmitir agentes infecciosos. No coma, beba ni fume en las zonas donde se manejan los reactivos del equipo o las muestras.
4. Use guantes desechables cuando maneje las muestras y lávese bien las manos después.
5. Se deben emplear programas de Control de Calidad para Laboratorios de Prueba Molecular, incluyendo el uso y cuidado correctos del equipo.¹⁰
6. El dispositivo de prueba *illumigene* Pertussis contiene reactivos liofilizados. La bolsa de protección no debería abrirse hasta que esté listo para realizar el ensayo.
7. El dispositivo de prueba *illumigene* Pertussis incluye una característica de cierre que está diseñada para evitar la contaminación de la zona de prueba con el producto de amplificación. NO use dispositivos de prueba con cierres rotos.
8. Deseche los dispositivos de prueba usados de *illumigene* inmediatamente después del proceso, poniendo el cierre del dispositivo en su lugar firmemente. NO abra el dispositivo de prueba después del procesamiento. Abrir el dispositivo después de la amplificación puede provocar una contaminación de la zona de prueba con el producto de amplificación.

FRASES DE RIESGO Y SEGURIDAD

No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del equipo. Almacene el equipo a una temperatura entre 2 y 30 °C.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Asegúrese de que los reactivos del equipo están a temperatura ambiente (21 - 30 C) antes de su uso. Se pueden obtener resultados incorrectos si los reactivos no están a temperatura ambiente antes del uso.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Tipo de muestra: Exudados nasofaríngeos

Toma de muestras: Las recogida de muestras de exudados nasofaríngeos se debe realizar de acuerdo con los procedimientos institucionales para la recogida de muestras clínicas para la infección por *Bordetella pertussis*. Las muestras de exudados nasofaríngeos deben obtenerse empleando hisopos adecuados (p. ej., de poliéster, nailon flocado o rayón).

Coloque los hisopos en un medio de transporte no nutritivo (p. ej. Líquido Amies, sin carbón o líquido Stuart) o almacene sin conservantes en un tubo estéril sin medio.

Las muestras sin conservantes o muestras almacenadas en medios de transporte se deben analizar en cuanto sea posible, pero se pueden mantener a una temperatura ambiente (21 - 30 C) durante un máximo de 5 días o refrigeradas (2 - 8 C) durante un máximo de 7 días antes del análisis. No congele las muestras.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

NOTA: Asegúrese de que el *illumipro-10* está encendido y que se hayan completado las verificaciones de rendimiento necesarias antes de iniciar la PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. Consulte el Manual del operador de *illumipro-10* para obtener más información acerca de la instalación y el funcionamiento del instrumento.

1. Coloque la muestra del hisopo en un tubo tampón de muestra etiquetado. Corte el mango del hisopo para asegurarse de que la muestra cabe en el tubo. Eluya la muestra mezclándola con vórtex durante 45 a 60 segundos. Retire y descarte el hisopo. **Las muestras eluidas se pueden mantener a temperatura ambiente (21 - 30 C) durante un máximo de 48 horas o refrigeradas (2 - 8 C) durante un máximo de 7 días antes del análisis.**
2. Añada 50 µL de la muestra eluida a un tubo de control/control negativo del ensayo etiquetado y tápelo.
3. Repita los pasos de preparación de la muestra para todas las muestras que se van a procesar.
4. Vórtex cada tubo de control/control negativo del ensayo que contiene la muestra eluida durante aproximadamente 10 segundos.
5. Caliente cada mezcla de muestra/control en un baño seco/bloque de calor a 95 ± 5 C durante 10 ± 2 minutos. Monitoree el paso de tratamiento térmico con un termómetro digital y un cronómetro de intervalos.
6. Saque cada tubo de muestra/control del baño seco. Las muestras tratadas térmicamente pueden mantenerse a una temperatura ambiente entre 21 y 30 C durante un máximo de 15 minutos antes de la prueba.
7. Vórtex durante unos 10 segundos.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTA: Se pueden procesar un máximo de 10 muestras en cada proceso del *illumipro-10*.

1. Saque 1 dispositivo de prueba *illumigene* Pertussis de su bolsa de protección por cada muestra. Abra el dispositivo cuidadosamente, sujetando las cámaras de tal modo que el reactivo liofilizado no se caiga al abrir el dispositivo.
2. Transfiera 50 µL de la muestra tratada térmicamente a la cámara TEST (microesfera blanca) del dispositivo de prueba *illumigene*. Tenga cuidado de no introducir aire en la mezcla de reacción. Usando una punta de pipeta nueva, transfiera 50 µL de la muestra tratada térmicamente a la cámara de CONTROL (microesfera amarilla) del dispositivo de prueba *illumigene*. Tenga cuidado de no introducir aire en la mezcla de reacción.

- Añada 1 gota de aceite minera a las dos cámaras la de PRUEBA y la de CONTROL. Cierre el dispositivo de prueba *illumigene* y asegure el cierre con firmeza.
- Dé unos golpecitos en la parte superior del banco o mezcle para remover las burbujas de aire. Examine con cuidado el dispositivo de prueba para la rehidratación de la microesfera de control/prueba, para las burbujas de aire que quedan en la cámara y el líquido en la parte superior del dispositivo. Si se advierten microesferas sin disolver, burbujas de aire o líquido en la parte superior del dispositivo, golpee el dispositivo sobre la parte superior del banco y repita la inspección visual. La amplificación y la detección deben comenzar en un plazo de 15 minutos.
- Introduzca el dispositivo de prueba de *illumigene* en el *illumipro-10* e inicie la reacción de amplificación y detección. Los resultados se mostrarán al final del proceso.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

| ID de la muestra | Resultado notificado | Interpretación |
|------------------------|----------------------|---|
| Muestra de la paciente | POSITIVO | La muestra contiene ADN objetivo de <i>Bordetella pertussis</i> . |
| | NEGATIVO | No se ha detectado ADN de <i>Bordetella pertussis</i> . |
| | NO VÁLIDO | Sin resultados notificables. Repita la prueba usando la muestra original. Muestra de la paciente inhibitoria, preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno. |
| Control positivo | POSITIVO | Resultado de control positivo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el <i>illumipro-10</i> funciona correctamente. |
| | NEGATIVO | Resultado de control incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la faya. Si los repite la faya luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local. |
| | NO VÁLIDO | Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno. |
| Control negativo | POSITIVO | Resultado de control incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la faya. Si los repite la faya luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local. |
| | NEGATIVO | Resultado de control negativo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el <i>illumipro-10</i> funciona correctamente. |
| | NO VÁLIDO | Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno. |
| Pocillo Vacío | NINGUNO | No hay ningún dispositivo de prueba de <i>illumigene</i> en el pocillo del <i>illumipro-10</i> . O El dispositivo de prueba del <i>illumigene</i> no funciona bien debido a un fallo en la preparación de la muestra o a que el dispositivo está sucio o mal colocado. Repita la prueba usando la muestra original. |

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

- Cada dispositivo contiene una cámara de control interno que controla la inhibición de la amplificación, la eficacia de los reactivos del ensayo y el procesamiento de la muestra.
- El paso del tratamiento térmico se monitoriza con un termómetro externo y un cronómetro de intervalos. Use la memoria de temperatura máx/mín del termómetro para asegurarse de que se mantiene una temperatura de 95 ± 5 C. Use el cronómetro de intervalos para asegurarse de que la duración del tratamiento térmico es de 10 ± 2 minutos.
- Las Buenas Prácticas de Laboratorio recomiendan el uso de materiales de control. Los usuarios deben seguir las directrices federales, estatales y locales adecuadas relativas a la ejecución de controles de calidad externos.
- Los reactivos de control externo *illumigene* Pertussis se suministran por separado (Catálogo 279930). Se recomienda que la reactividad de cada nuevo lote y cada nuevo envío de *illumigene* Pertussis se verifique a la recepción y antes de su uso. Se deberían realizar pruebas de control externo a partir de ese momento, de conformidad con las directrices federales, estatales y locales adecuadas. El equipo de prueba *illumigene* Pertussis no debería usarse en la prueba de pacientes si los controles externos no ofrecen los resultados correctos.
- Se debe usar un dispositivo aparte para cada reactivo de control externo.

VALORES ESPERADOS

La incidencia global de *B. pertussis* en muestras recogidas y probadas prospectivamente durante el periodo de este estudio fue aproximadamente 10,0 % (51/508).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Este producto solo se puede utilizar con el instrumento *illumipro-10*.
- El ensayo para ADN de *illumigene* Pertussis es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni información sobre la carga del microorganismo.

- Este dispositivo no está evaluado para vigilar el tratamiento de las infecciones por *Bordetella pertussis*.
- Las infecciones respiratorias las pueden causar tanto *Bordetella pertussis* como otros microbios patógenos. La obtención de resultados positivos no significa que no exista coinfección con otros microorganismos patógenos de las vías respiratorias.
- La detección de ácido nucleico dependerá de la recogida, de la manipulación, del transporte, del almacenamiento y de la preparación de las muestras adecuadas. El no seguir el procedimiento adecuado en cualquiera de estos pasos puede dar lugar a resultados incorrectos.
- La prevalencia de la infección por *B. pertussis* afectará al valor predictivo de la prueba.
- Los ácidos nucleicos de los microorganismos pueden persistir *in vivo* independientemente de la viabilidad del microorganismo. El ensayo de *illumigene* Pertussis no distingue entre organismos viables y no viables.
- Al igual que sucede con todas las pruebas de diagnóstico moleculares: (A) pueden producirse resultados falsos negativos debido a la presencia de inhibidores, a errores técnicos, a la mezcla de muestras o al escaso número de microorganismos presentes en la muestra clínica, y (B) pueden producirse falsos resultados positivos debido a la presencia de contaminación cruzada por microorganismos objetivo, por sus ácidos nucleicos o por producto amplificado, así como por señales no específicas.
- El ensayo *illumigene* Pertussis está dirigido al elemento insercional IS481 del genoma de *Bordetella*. El elemento insercional IS481 está presente en *B. pertussis*, *B. holmesii* y en algunas cepas de *B. bronchiseptica*.
- El ácido acetil salicílico, como se encuentra en la aspirina, produce resultados no válidos cuando se prueba a concentraciones por encima de 5 mg/mL durante la prueba repetida del límite de detección de *B. pertussis* cepa BAA-589.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El ensayo de amplificación del ADN *illumigene* Pertussis fue evaluado desde diciembre 2012 a julio 2013 por centros de pruebas clínicas independientes que geográficamente representan distintas regiones por todos los Estados Unidos. Se evaluó un total de 729 muestras correctas de exudados nasofaríngeos (NF) tomados a pacientes con sospecha de infección respiratoria por *B. pertussis* con el dispositivo de prueba para conocer las características de funcionamiento. Las muestras fueron restos, muestras sin identificación que habían sido enviadas previamente para las pruebas habituales de *B. pertussis*. Las muestras incluidas en la evaluación del funcionamiento fueron prospectivas (nunca congeladas) y retrospectivas (congeladas antes de someterlas a la prueba *illumigene*). El funcionamiento de *illumigene* Pertussis se comparó con un método de referencia combinado que incluía dos ensayos PCR en tiempo real dirigidos a IS481 validados por el fabricante seguido por secuencia bidireccional de amplicón de muestras positivas de PCR. Se determinó que el valor umbral del ciclo calculado (Ct) para cada ensayo PCR fue de 35,6 en el límite de detección del ensayo (PCR1: 3750 UFC/mL, PCR2: 4522 UFC/mL). Las muestras fueron consideradas positivas cuando los resultados del ensayo PCR comprobador produjeron valores Ct por debajo de 35,6 y el resultado de secuencia bidireccional correspondiente era positivo. Las muestras fueron consideradas negativas cuando los resultados de los dos ensayos PCR comparadores producían valores Ct por encima de 35,6. Se examinó un total de 508 (69,7 %) muestras prospectivas y 221 (30,3 %) retrospectivas. Se obtuvieron resultados no válidos de 13 muestras (1,8 %); dos muestras siguieron siendo no válidas después de repetir la prueba. Dos muestras prospectivas y dos muestras retrospectivas produjeron resultados de PCR comparadores indeterminados. La tabla 1 resume las características de funcionamiento de *illumigene*; la tabla 2 describe las características de funcionamiento de *illumigene* por centro.

Tabla 1. Funcionamiento del ensayo *illumigene*

| Descripción de las muestras | Muestras positivas | | | Muestras negativas | | | Resultados no válidos ^a |
|--|--|---------------|----------------------|--|---------------|----------------------|------------------------------------|
| | <i>illumigene</i> frente al comparador | PPA | IC 95 % | <i>illumigene</i> frente al comparador | NPA | IC 95 % | |
| Comparador del método combinado | | | | | | | |
| Prospectivo | 30/32 | 93,8 % | 79,9 – 98,3 % | 451/472 | 95,6 % | 93,3 – 97,1 % | 2 (13) |
| Retrospectivo | 21/21 | 100,0 % | 84,5 – 100,0 % | 192/198 | 97,0 % | 93,5 – 98,6 % | 0 |
| TOTAL | 51/53 | 96,2 % | 87,2 – 99,0 % | 643/670 | 96,0 % | 94,2 – 97,2 % | 2 (13) |

^a 11/13 muestras no válidas al inicio produjeron resultados válidos al repetir la prueba

Tabla 2. Funcionamiento del ensayo *illumigene* por centro

| Descripción de las muestras | Muestras positivas | | | Muestras negativas | | | Resultados no válidos ^b |
|--|--|---------------|----------------------|--|---------------|----------------------|------------------------------------|
| | <i>illumigene</i> frente al comparador | PPA | IC 95 % | <i>illumigene</i> frente al comparador | NPA | IC 95 % | |
| Comparador del método combinado | | | | | | | |
| Centro 1 | 41/43 | 95,3 % | 84,5 – 98,7 % | 449/470 | 95,5 % | 93,3 – 97,1 % | 1 (12) |
| Centro 2 | 3/3 | 100,0 % | 43,9 – 100,0 % | 67/70 | 95,7 % | 88,1 – 98,5 % | 1 (1) |
| Centro 3 | 0/0 | N/A | N/A | 8/8 | 100,0 % | 67,6 – 100,0 % | 0 |
| Centro 4 | 7/7 | 100,0 % | 64,6 – 100,0 % | 119/122 | 97,5 % | 93,0 – 99,2 % | 0 |
| TOTAL | 51/53 | 96,2 % | 87,2 – 99,0 % | 643/670 | 96,0 % | 94,2 – 97,2 % | (13) |

^b 11/13 muestras iniciales no válidas produjeron resultados válidos al repetir la prueba

Los estudios clínicos fueron realizados con múltiples exudados nasofaríngeos y tipos de tampón de elución de muestra. Los tampones de la muestra probados durante los estudios clínicos incluían 0,85 % solución salina (n=30 o 4,1 %) , Tris EDTA (n=8 o 1,1 %) y agua de calidad molecular (n=687 o 94,2 %). Todos los tampones de muestra fueron usados en volúmenes de 0,5 mL. Los estudios analíticos se realizaron con 0,85 % solución salina, Tris EDTA, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y agua de calidad molecular. Los estudios analíticos establecieron la equivalencia entre todos los tipos de tampón de elución de muestra.

La información de la edad era conocida para 723 (99,2 %) de los pacientes cuyas muestras fueron probadas. La edad de los pacientes oscilaba entre 1 mes y 88 años. Treinta y ocho (5,2 %) de los pacientes tenían menos de 1 año; 13 (1,8 %) tenían entre 1 y 2 años; 296 (40,6 %) tenían entre 2 y 12 años, 157 (21,5 %) entre 12 y 21 años, 190 (26,0 %) eran mayores de 21 pero menores de 65, y los restantes 29 (4,0 %) pacientes eran mayores de 65 años. No se espera que el ensayo *illumigene* Pertussis funcione de manera diferente cuando evalúe muestras de pacientes de distintos grupos de edad.

La población en estudio incluía 413 (56,7 %) mujeres y 308 (42,2 %) varones. No se conocía el sexo de 8 (1,1 %) pacientes incluidos en el estudio. No se espera que el sexo del paciente influya en las características de funcionamiento del ensayo para la tos ferina *illumigene*.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica o límite de detección para el ensayo *illumigene* Pertussis fue determinado para *Bordetella pertussis* cepa ATCC BAA-589, Tahoma I.

El límite de detección fue determinado usando 60 réplicas de *Bordetella pertussis* cepa ATCC BAA-589 y una probabilidad indicada (p. ej. 95 %, donde 57/60 réplicas son positivas) de obtener respuestas positivas. La prueba de sensibilidad analítica se resume a continuación:

| Descripción cepa <i>B. pertussis</i> | CFU/ml | CFU/Prueba |
|--------------------------------------|--------|------------|
| ATCC BAA-589 (Tahoma I) | 3265 | 1,48 |

REACTIVIDAD DEL ENSAYO

Se probaron las siguientes cepas del *B. pertussis* y produjeron reacciones positivas en 3265 CFU/mL o 1,48 CFU/prueba con *illumigene* Pertussis: ATCC 12743; ATCC 8478; ATCC 8467; ATCC 9797; ATCC 53894; ATCC 10380; ATCC 12742 y A639. Se probaron las siguientes cepas del *B. pertussis* y produjeron reacciones positivas en 3500 CFU/mL o 1,59 CFU/prueba con *illumigene* Pertussis: ATCC 51445 y ATCC BAA-1335.

REPRODUCIBILIDAD

Los estudios de reproducibilidad se realizaron en tres de los cuatros centros clínicos participantes. Se suministraron paneles codificados a ciegas de 10 muestras a los laboratorios participantes. Las muestras se eligieron aleatoriamente dentro de cada panel para enmascarar las identidades de las muestras. Los paneles incluían muestras artificiales fabricadas como muestras positivas moderadas (1,31 x 10⁴ CFU/mL o 6 CFU/prueba), muestras positivas bajas (4,89 x 10³ CFU/mL o 2 CFU/prueba); y muestras negativas altas (8,2 CFU/mL o 0,004 CFU/prueba). El panel también incluía una muestra negativa, control positivo y control negativo. La prueba fue realizada por diferentes operadores en cada centro el mismo día (variabilidad intraensayo) durante cinco días (variabilidad interensayo). En este estudio se usaron tres lotes de *illumigene* Pertussis y seis instrumentos *illumipro-10*. Se probaron los controles negativos y positivos cada día de pruebas. Los resultados aparecen en la tabla que sigue:

| Tipo de muestra | Centro 1 | | Centro 2 | | Centro 4 | | Total | |
|-------------------|----------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|
| | Acuero en porcentaje | | Acuero en porcentaje | | Acuero en porcentaje | | Acuero en porcentaje | |
| Positivo moderado | 30/30 | 100,0 % | 30/30 | 100,0 % | 30/30 | 100,0 % | 90/90 | 100,0 % |
| Positivo bajo | 27/30 | 90,0 % | 29/30 | 96,7 % | 30/30 | 100,0 % | 86/90 | 95,6 % |
| Negativo alto | 26/30 | 86,7 % | 23/30 | 76,7 % | 29/30 | 96,7 % | 78/90 | 86,7 % |
| Negativo | 10/10 | 100,0 % | 9/10 | 90,0 % | 10/10 | 100,0 % | 29/30 | 96,7 % |
| Control negativo | 10/10 | 100,0 % | 10/10 | 100,0 % | 10/10 | 100,0 % | 30/30 | 100,0 % |
| Control positivo | 10/10 | 100,0 % | 10/10 | 100,0 % | 10/10 | 100,0 % | 30/30 | 100,0 % |

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizaron estudios de reactividad cruzada con muestras de enjuague nasal positivo y negativo inoculadas con microorganismos micóticos y bacterianos para una concentración final de 1,0 x 10⁶ CFU/mL o virus con un mínimo de 1,0 x 10⁵ TCID₅₀/mL. Ninguno de los siguientes microorganismos reaccionó con *illumigene* Pertussis: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella petrii*, *Bordetella trematum*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella jordanis*, *Legionella longbeachae*, *Legionella micdadei*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria elongata*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus anginosus* (Grupo F), *Streptococcus bovis* (Grupo D), *Streptococcus canis* (Grupo G), *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus suis*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Cocksackievirus, Cytomegalovirus, Epstein Barr Virus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, Human Metapneumovirus, Influenza A, Influenza B, virus del sarampión, virus de las paperas, Parainfluenza virus 1, Parainfluenza virus 2, Parainfluenza virus 3, virus sincitial respiratorio A, virus sincitial respiratorio B, Rhinovirus.

Se probaron *Bordetella bronchiseptica* cepa 4617 y *Bordetella holmesii* a 1,0 x 10⁶ CFU/mL y se encontró que reaccionaban con el ensayo *illumigene* Pertussis.

PRUEBAS PARA SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias químicas, en las concentraciones de solvente/diluyente saturadas que se especificaron, no interfirieron en los resultados de la prueba: Acetaminofeno (10 mg/mL), Advil® [ibuprofeno (10 mg/mL)], Afrin® spray nasal descongestionante [hidrocloruro de oximetazolina (0,0005 % p/v)], sulfato de albuterol [sulfato de salbutamol (1 % p/v)], aspirina (5 mg/mL), Coricidin® HBP comprimidos para resfriado/gripe [Acetaminofeno (3,26 mg/mL), maleato de clorfeniramina (0,02 mg/mL)], Difenhidramina HCl (0,25 mg/mL), Eritromicina (2 % p/v), Mupirocina (2 % p/v), vaselina [petrolato blanco (1 % p/v)], Robitussin® jarabe para la tos Cough+Chest Congestion DM [dextrometofan HBr (0,1 mg/ml), Guaifenesina (1,0 mg/mL)], Sufedrina PE [fenilefrina HCl (0,3 mg/mL)], spray nasal salino [cloruro sódico (0,0065 % p/v)], tabaco sin humo (rapé) (1 % p/v), Tobramicina (0,6 mg/mL), Vicks® VaporRub® [alcanfor (0,48 % p/v), aceite de eucalipto (0,12 % p/v), mentol (0,26 % p/v)].

Se encontró que la aspirina interfería con la prueba de *illumigene* Pertussis a concentraciones mayores de 5 mg/mL.

Las siguientes sustancias biológicas, en las concentraciones de solvente/diluyente saturadas que se especificaron, no interfirieron en los resultados de la prueba: ADN humano (200 ng/μL), Mucina [tipo de glándula submaxilar bovina I-S (1 % p/v)], sangre entera (1 % p/v).

DEUTSCH



Pertussis
DNA-Amplifikationsassay

DNA-Amplifikationsassay zum Nachweis von *Bordetella pertussis* in Nasopharynx-Abstrichproben

REF 280750

IVD In-vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Der *illumigene* Pertussis- DNA-Amplifikationsassay, durchgeführt auf dem *illumipro-10™*, ist ein qualitativer diagnostischer in-vitro-Test zum direkten Nachweis von *Bordetella pertussis* in humanen Nasopharynx-Abstrichproben von Patienten mit Verdacht auf eine durch *Bordetella pertussis* hervorgerufene Respirationstraktinfektion.

Der *illumigene* Pertussis- Assay benutzt die „Loop-Mediated“ isothermale DNA-Amplifizierung (LAMP)-Technologie zum Nachweis von *Bordetella pertussis* durch den gezielten Nachweis des Insertionselementes IS481 des *Bordetella pertussis*-Genoms. Das Insertionselement IS481 kann auch in *Bordetella holmesii* und einigen *Bordetella bronchiseptica*-Stämmen gefunden werden. Durch *B. bronchiseptica* verursachte Atemwegserkrankungen sind selten beim Menschen. Über Ausbrüche von Mischinfektionen mit *B. holmesii* und *B. pertussis* wurde jedoch berichtet. Positive Ergebnisse von DNA-Amplifikationsassays zum gezielten Nachweis von IS481 können auf Vorhandensein von *B. holmesii* oder *B. pertussis* hinweisen. Wenn klinische Faktoren darauf hinweisen, dass *B. pertussis* nicht unbedingt die Ursache der Atemweginfektion ist, sollten andere klinisch angemessene Untersuchungen entsprechend den publizierten Leitlinien durchgeführt werden.

Die Ergebnisse des *illumigene* Pertussis-Assays sollten im Zusammenhang mit Informationen einer klinischen Beurteilung des Patienten als Hilfe bei der Diagnose von Atemwegsinfektionen benutzt werden.

illumigene Pertussis ist für die Anwendung im Krankenhaus, in staatlichen oder Referenz-Laboren vorgesehen. Der Test soll nicht für die „Point-of-Care-Diagnostik“ (am Krankenbett) verwendet werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Der *illumigene* Pertussis- DNA-Amplifikationsassay basiert auf der „Loop-Mediated isothermal Amplification“ (LAMP)-Technologie.^{1,2} Der Assay weist gezielt eine Sequenz von 198 Basenpaaren (bp) des *Bordetella pertussis*-Genoms nach, die sich in einer Region der IS481-Insertionsequenz befindet.

Bei der Loop vermittelten Amplifizierung werden spezielle Primer verwendet, um eine spezifische und kontinuierliche isotherme DNA-Amplifizierung zu erzielen. Als Nebenprodukt der Amplifizierung wird Magnesiumpyrophosphat gebildet, welches einen weißen Niederschlag bildet, wodurch eine trübe Reaktionslösung entsteht. Die Absorptionsmerkmale der Reaktionslösung werden vom Meridian *illumipro-10* Inkubator/-Lesegerät überwacht. Die durch den Niederschlag von Magnesiumpyrophosphat erzeugten Änderungen der Absorptionsmerkmale der Reaktionslösung deuten auf die Anwesenheit der Ziel-DNA hin. Die Abwesenheit von Ziel-DNA bewirkt keine signifikante Änderung der Absorption des Probenmaterials.

Das *illumigene* Pertussis kit enthält das *illumigene* Pertussis-Assay-Kontroll Negativkontrollreagenz, *illumigene* Pertussis-Testsysteme, *illumigene* Pertussis-Probenpuffer und Mineralöl. Bei der *illumigene* Assay-Kontrolle/Negativkontrolle, welche für die Verdünnung und Präparation des Probenmaterials verwendet wird, handelt es sich um eine Tris-gepufferte Lösung, die mit Formalin behandelte, *Staphylococcus aureus*-DNA beherbergende *E. coli* enthält. Das *illumigene* Pertussis-Testsystem enthält ein lyophilisiertes Amplifikationskugelnchen in jeder der zwei Kammern: einer TEST-Kammer mit IS481-spezifischen Primern und einer KONTROLL-Kammer mit *S. aureus*-spezifischen Primern. Zusammen funktionieren die *S. aureus*-DNA im Assay-Kontrollreagenz/Negativkontrollreagenz und die *S. aureus*-spezifischen Primer in der KONTROLL-Kammer als interne Kontrolle für den Assay. Bei der Präparation des Probenmaterials wird jede Patientenprobe dem Assay-Kontrollreagenz/ Negativkontrollreagenz beigefügt und vor der Amplifikation mit der *S. aureus*-DNA kombiniert. Die Zugabe von *S. aureus*-DNA zur Patientenprobe ermöglicht die parallele Verarbeitung von Ziel-DNA und Kontroll-DNA durch Amplifikation und Detektion. Die Amplifikationsinhibition, Assayreagenzleistung und Effizienz der Probenverarbeitung werden von der internen Kontrolle überwacht. Das Kontroll-*S. aureus*-Ziel muss amplifiziert und in der endgültigen Reaktion erkannt werden, oder der Test wird als ungültig erachtet und die Patientenergebnisse werden nicht berichtet.

Zur Überwachung der Änderungen der Absorptionsmerkmale misst der *illumipro-10* den Lichtdurchlass durch die Test- und Kontroll-Reaktionslösungen. Der Lichtdurchlass wird zu Beginn des Testdurchlaufs ($Signal_{initial}$, S_i) und am Ende des Testdurchlaufs ($Signal_{final}$, S_f) des Assays kontrolliert. Die Änderung des Lichtdurchlasses zwischen Ende und Beginn des Durchlaufs ($S_f:S_i$) wird vom *illumipro-10* gemessen, und das Verhältnis wird mit einem festgelegten Cutoff-Wert verglichen.

Die Probenergebnisse werden anhand festgelegter Cutoff-Werte für die TEST-Kammer gemeldet. $S_f:S_i$ -Verhältnisse der TEST-Kammer von weniger als 82% werden als „POSITIV“, $S_f:S_i$ -Verhältnisse der TEST-Kammer, größer als oder gleich wie 82% werden als „NEGATIV“ gemeldet. *Es werden keine numerischen Werte ausgegeben.*

Die Gültigkeit wird anhand fester Cutoff-Werte für die KONTROLL-Kammer beurteilt. $S_f:S_i$ -Verhältnisse der KONTROLL-Kammer von weniger als 90% werden für gültig erachtet und lassen die Meldung der Ergebnisse der TEST-Kammer zu (POSITIV, NEGATIV). $S_f:S_i$ -Verhältnisse der KONTROLL-Kammer größer als oder gleich wie 90% werden für ungültig erachtet und verhindern die Meldung der Ergebnisse der TEST-Kammer. Ungültige Ergebnisse für die KONTROLL-Kammer werden als „UNGÜLTIG“ gemeldet. *Es werden keine numerischen Werte gemeldet.*

Die Cutoff-Kriterien für die KONTROLL-Kammer-Reaktion sind strenger, um zu gewährleisten, dass die Amplifikation nicht gehemmt wird, dass die Reagenzien bestimmungsgemäß funktionieren und dass die Probenverarbeitung sachgemäß durchgeführt wurde.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Bordetella pertussis ist ein humanes Pathogen, das ausschließlich Keuchhusten (Pertussis), eine endemische Atemwegserkrankung verursacht. Pertussis ist eine meldepflichtige Erkrankung, von der 2012 weltweit 200.000 Personen betroffen waren. In den USA ist Keuchhusten derzeit die einzige Erkrankung mit zunehmendem Trend meldepflichtiger Fälle und erheblicher Morbidität trotz der Verfügbarkeit eines Impfstoffes.³ Die amerikanische Seuchenkontrollbehörde (Centers for Disease Control, CDC) meldete 2012 ca. 48.300 Pertussis-Fälle, entsprechend einem Durchschnitt von 15,4 Fällen pro 100.000 Personen in den USA.⁴ Pertussis-Ausbrüche in der jüngsten Vergangenheit zeigten eine abnehmende Immunität bei Kindern nach Erhalt der letzten Booster-Dosis des azellulären Impfstoffes, was zu einer Infektionsanfälligkeit in sowohl geimpften als auch ungeimpften Populationen von Kindern im Alter zwischen 7 und 11 Jahren führte.^{5,6}

Pertussis-Ausbrüche zu beherrschen, ist eine besondere Herausforderung, da die Frühstadien der Krankheit anderen Atemwegserkrankungen ähneln und die Patienten bis zu 5 Wochen nach Auftreten der Symptome hochinfektiös bleiben.³ Außerdem wird Pertussis erst offiziell diagnostiziert, wenn beinahe zwei Wochen nach Krankheitsbeginn die charakteristischen Symptome des Keuchhustens auftreten.³ Die klinische Diagnose von Pertussis kann mittels Kultur, Serologie oder Nukleinsäure-Amplifikationstests (NAAT) gestellt werden. Die Kultur ist zwar hochspezifisch, die Sensitivität jedoch gering. Bis zum Erhalt von Ergebnissen kann es 7 Tage dauern, und die Anzahl lebensfähiger Zellen, die für eine Kultur erforderlich sind, nimmt mit Fortschreiten der Erkrankung (2 Wochen nach Auftreten der Symptome) ab.⁷ Im Gegensatz zur Kultur können NAAT-Assays schnelle Testergebnisse liefern und benötigen keine lebensfähigen Bakterien. Bakterien-DNA muss jedoch noch im Nasopharynx vorhanden sein (bis zu 4 Wochen nach Auftreten des Hustens), um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden.⁸ Außerdem sollte der NAAT ausschließlich bei symptomatischen Patienten mit Husten durchgeführt werden, um falsch positive Ergebnisse bei asymptomatischen Personen mit engem Kontakt mit Erkrankten zu vermeiden.⁸ Die Serologie kann ausschließlich in späten Stadien der Erkrankung (ca. 2-8 Wochen nach Auftreten des Hustens) zur Diagnose benutzt werden.

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Aussenseite der Packung angegeben.

1. ***illumigene* Pertussis-Assay- Kontrollreagenz/Negativkontrollreagenz:** Tris-gepufferte Lösung mit Formalin behandelten *E. coli*, die Plasmid mit einem Segment des *S. aureus*-Genoms beherbergen, mit Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel.
2. ***illumigene* Pertussis-Testsystem:** Ein Testsystem mit zwei Kammern, das lyophilisierte Amplifikationsreagenzien (DNA-Polymerase, Deoxynukleotidtriphosphate) und entweder IS481-spezifische Primer (TEST-Kammer) oder Kontroll-Primer (KONTROLL-Kammer) enthält.
3. ***illumigene* Pertussis-Probenpuffer:** Tris-EDTA-Lösung mit Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel.
4. **Mineralöl**

SEPARAT GELIEFERTE MATERIALIEN

illumigene Externes Pertussis-Kontrollkit, Bestellnummer: 279930

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Einweg-Latexhandschuhe, ungepudert
2. DNase/RNase-freie, aerosolbeständige Pipettenspitzen
3. Probenentnahme und Transportsystem
Nasopharyngeale Abstriche: Polyester (minimale Kapazität 18 µL, z.B. Puritan Medical Products, Bestellnummer 25-801-D50); beflocktes Nylon (minimale Kapazität 31 µL, z.B. Puritan Medical Products, Bestellnummer 25-201-R50); oder Rayon (minimale Kapazität 69 µL, z.B. Copan 503CS01).
Nicht-nutritives Transportmedium: Liquid Amies, ohne Kohle oder Liquid Stuart (Maximalvolumen: 1,2 mL)

NICHT MITGELIEFERTE AUSRÜSTUNG

1. Heizblock zur Erhitzung auf 95 C
2. Digitalthermometer mit Max-/Min-Temperaturspeicher (z.B. wasserdichtes/stoßfestes Thermometer, wie -Traceable® Lollipop™)
3. Vortex-Mixer
4. Intervall-Stoppuhr
5. 50 µL-Mikropipette
6. *illumipro-10*, Bestellnummer von Meridian Bioscience, Inc.: 610172

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die in-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Das Assay-Kontrollreagenz/Negativkontrollreagenz und die Testsysteme nicht zwischen Chargen austauschen. Der Probenpuffer und das Mineralöl können ausgetauscht werden, solange zum Zeitpunkt des Gebrauchs das angegebene Haltbarkeitsdatum noch nicht abgelaufen ist.
3. Befolgen Sie bei den Untersuchungen die Biosicherheitsstufe 2 und eine gute Laborpraxis.⁹ Behandeln Sie alle Proben und gebrauchte Testsysteme so als könnten Sie infektiöse Erreger übertragen. In den Bereichen, in denen die Proben und Reagenzien der Kits bearbeitet werden, darf weder gegessen, noch getrunken oder geraucht werden.
4. Bei der Handhabung der Proben sind Einweghandschuhe zu tragen. Nach der Arbeit sind die Hände gründlich zu waschen.
5. Qualitätskontrollprogramme für Laboratorien, die molekulare Tests durchführen, einschließlich richtiger Gebrauch und Pflege der Ausrüstung, sollten angewendet werden.¹⁰
6. Das *illumigene* Pertussis-Testsystem enthält lyophilisierte Reagenzien. Der Schutzbeutel darf erst dann geöffnet werden, wenn der Assay durchgeführt wird.
7. Das *illumigene* Pertussis-Testsystem ist mit einer Sperrvorrichtung ausgestattet, um eine Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt zu verhindern. Testsysteme mit defekter Sperrvorrichtung NICHT verwenden.
8. Die Sperrvorrichtung gebrauchter *illumigene* Testsysteme sicher arretieren und sofort nach Gebrauch entsorgen. Das Testsystem nach der Verarbeitung NICHT öffnen. Öffnen des Testsystems nach der Amplifikation kann zur Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt führen.

GEFAHREN – UND SICHERHEITSGANGABEN

Es gibt keine bekannten Gefahren die mit diesem Produkt verbunden sind.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Kits angegeben. Kit bei 2-30 C aufbewahren.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Stellen Sie sicher, dass Kitreagenzien vor Gebrauch Raumtemperatur (21-30 C) erreicht haben. Werden die Reagenzien vor Gebrauch nicht auf Raumtemperatur gebracht, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Probentyp: Nasopharyngeale Abstriche

Probennahme: Nasopharyngeale Abstrichproben sollten in Übereinstimmung mit den Verfahren der jeweiligen Einrichtung zur Entnahme klinischer Proben bei *Bordetella pertussis*-Infektion entnommen werden. Die nasopharyngealen Abstrichproben sollten mit geeigneten Tupfern (z.B. Polyester, befocktes Nylon oder Rayon) entnommen werden.

Die Tupfer in ein nicht-nutritives Transportmedium (z.B. Liquid Amies ohne Kohle oder Liquid Stuart) einlegen oder ohne Konservierungsmittel in einem sterilen Röhrchen ohne Medium aufbewahren.

Proben ohne Konservierungsmittel und in Transportmedien aufbewahrte Proben sollten so schnell wie möglich getestet werden, können jedoch bei Raumtemperatur (21-30 C) bis zu 5 Tage oder gekühlt (2-8 C) bis zu 7 Tage vor dem Test aufbewahrt werden. Die Proben nicht einfrieren.

PROBENVORBEREITUNG:

HINWEIS: Achten Sie darauf, dass der *illumipro-10* eingeschaltet ist und die erforderlichen Leistungsüberprüfungen vor Beginn der PROBENVORBEREITUNG durchgeführt wurden. Weitere Informationen zur Einrichtung und zum Betrieb des Geräts finden Sie im *illumipro-10*-Bedienerhandbuch.

- Die Abstrichprobe in ein beschriftetes Probenpufferröhrchen geben. Den Tupferschaft abschneiden, damit die Probe sicher in das Röhrchen passt. Die Probe durch 45-60 Sekunden langes Vortexen eluieren. Den Tupfer entfernen und entsorgen. **Eluierte Proben können bei Raumtemperatur (21-30 C) bis zu 48 Stunden und gekühlt (2-8 C) bis zu 7 Tage vor dem Test aufbewahrt werden.**
- 50 µL der eluierten Probe in ein Röhrchen mit der Beschriftung Assay-Kontrolle/Negativkontrolle geben und verschließen.
- Die Probenvorbereitungsschritte für alle zu untersuchenden Proben wiederholen.
- Alle Röhrchen mit Assay-Kontrolle/Negativkontrolle, die eine eluierte Probe enthalten, ca. 10 Sekunden vortexen.
- Alle Proben/Kontrollgemische in einem Heizblock bei 95 ± 5 C 10 ± 2 Minuten erhitzen. Überwachen Sie den Hitzebehandlungsschritt mit dem Digitalthermometer und der Intervall-Stoppuhr.
- Alle Proben-/Kontrollröhrchen vom Heizblock entfernen. Wärmebehandelte Proben können bis zu 15 Minuten vor dem Test bei Raumtemperatur (21-30 C) aufbewahrt werden.
- Vortexen Sie ca. 10 Sekunden.

TESTDURCHFÜHRUNG

HINWEIS: In einem Lauf auf dem *illumipro-10* können maximal 10 Proben verarbeitet werden.

- Nehmen Sie für jede Probe ein *illumigene* Pertussis-Testsystem aus dem Schutzbeutel. Öffnen Sie vorsichtig das System und halten Sie die Kammern so, dass das lyophilisierte Reagenz beim Öffnen nicht herausfällt.
- Überführen Sie 50 µL der wärmebehandelten Probe in die TEST-Kammer (weißes Bead) des *illumigene* Testsystems. Achten Sie darauf, dass keine Luft in das Reaktionsgemisch kommt. Nehmen Sie eine neue Pipettenspitze und überführen Sie 50 µL der wärmebehandelten Probe in die KONTROLL-Kammer (gelbes Bead) des *illumigene* Testsystems. Achten Sie darauf, dass keine Luft in das Reaktionsgemisch kommt.
- Geben Sie einen Tropfen Mineralöl sowohl in die TEST-Kammer als auch in die KONTROLL-Kammer. Schließen Sie das *illumigene* Testsystem und verschließen Sie die Sperrvorrichtung sicher.
- Klopfen Sie das Testsystem (die Reaktionsgefäße) leicht auf die Arbeitsfläche auf oder schwenken Sie es, um Luftblasen zu entfernen. Überprüfen Sie das Testsystem sorgfältig auf die Rehydratation des Kontroll-/Test-Beads sowie auf Luftblasen in der Kammer und Flüssigkeit im oberen Teil der Reaktionsgefäße. Falls nicht gelöste Kügelchen, Luftblasen oder Flüssigkeit im oberen Teil der Reaktionsgefäße zu erkennen sind, klopfen Sie diese auf die Arbeitsfläche und wiederholen Sie die Sichtkontrolle. Die Amplifikation und Detektion sollten innerhalb von 15 Minuten initiiert werden.
- Geben Sie das *illumigene* Testsystem in den *illumipro-10* und starten Sie die Amplifikationsreaktion und -detektion. Die Ergebnisse werden am Ende des Laufs angezeigt.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

| Proben-ID | Ausgewiesenes Ergebnis | Auswertung |
|------------------|------------------------|---|
| Patientenprobe | POSITIV | Probe enthält <i>Bordetella pertussis</i> -Ziel-DNA. |
| | NEGATIV | <i>Bordetella pertussis</i> -DNA nicht nachgewiesen. |
| | UNGÜLTIG | Kein meldefähiges Ergebnis. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der Originalprobe. Hemmende Patientenprobe, falsche Probenvorbereitung, fehlerhaftes Reagenz, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler. |
| Positivkontrolle | POSITIV | Gültiges positives Kontrollergebnis. Reagenzien sind zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv, <i>illumipro-10</i> funktioniert korrekt. |
| | NEGATIV | Falsches Kontrollergebnis. Die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer. |
| | UNGÜLTIG | Kein meldefähiges Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten Assay-Lauf unter Verwendung von Originalproben. Falsche Probenvorbereitung, fehlerhaftes Reagenz, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler. |
| Negativkontrolle | POSITIV | Falsches Kontrollergebnis. Die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer.. |
| | NEGATIV | Gültiges negatives Kontrollergebnis. Reagenzien sind zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv, <i>illumipro-10</i> funktioniert korrekt. |
| | UNGÜLTIG | Kein meldefähiges Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten Assay-Lauf unter Verwendung von Originalproben. Falsche Probenvorbereitung, fehlerhaftes Reagenz, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler. |
| LEERER SCHACHT | KEINE/R | Kein <i>illumigene</i> Testsystem im <i>illumipro-10</i> -Schacht. ODER Das vorhandene <i>illumigene</i> Testsystem ist aufgrund fehlerhafter Probenvorbereitung, verunreinigter Reaktionsgefäße oder falsch aufgestellter Systeme beeinträchtigt. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der Originalprobe. |

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.

- Jedes Testsystem enthält eine interne Kontrollkammer, die die Amplifikationsinhibition, Assay-Reagenzien und die Effizienz der Probenverarbeitung überwacht.
- Der Hitzebehandlungsschritt wird mit einem externen Thermometer und einer Intervall-Stoppuhr überwacht. Verwenden Sie den Max-/Min-Temperaturspeicher des Thermometers, um sicherzustellen, dass eine Temperatur von 95 ± 5 C aufrecht erhalten bleibt. Verwenden Sie die Intervall-Stoppuhr, um sicherzustellen, dass die Dauer der Hitzebehandlung 10 ± 2 Minuten beträgt.
- Gemäß guter Laborpraxis ist die Anwendung von Kontrollmaterialien empfohlen. Anwender sollten die entsprechenden bundesstaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien zur Mitführung von externen Qualitätskontrollen befolgen.
- Externe Kontrollreagenzien für *illumigene* Pertussis werden separat geliefert (Bestellnr. 279930). Es wird empfohlen, die Reaktivität jeder neuen Charge und jeder neuen Lieferung von *illumigene* Pertussis beim Empfang und vor Gebrauch zu überprüfen. Externe Kontrolltests sind danach gemäß bundesstaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien durchzuführen. Das *illumigene* Pertussis-Testkit sollte nicht für Tests an Patientenproben verwendet werden, wenn die externen Kontrollen nicht die richtigen Ergebnisse erzeugen.
- Für jedes externe Kontrollreagenz muss ein separates Testsystem verwendet werden.

ERWARTETE WERTE

Die Häufigkeit von *B. pertussis* insgesamt in prospektiv entnommenen und getesteten Proben während der Periode dieser Studie war ca. 10,0% (51/508).

EINSCHRÄNKUNGEN

- Dieses Produkt kann nur mit dem *illumipro-10*-Instrument verwendet werden.
- Beim *illumigene* Pertussis-DNA-Assay handelt es sich um einen qualitativen Assay, der keine quantitativen Ergebnisse oder Informationen zur Keimlast liefert.
- Dieses Testsystem wurde nicht für die Überwachung der Behandlung von Infektionen mit *Bordetella pertussis* geprüft.
- Atemwegsinfektionen können von *Bordetella pertussis* sowie von anderen Pathogenen verursacht werden. Ein positives Ergebnis schließt eine Koinfektion mit anderen Pathogenen der Atemwege nicht aus.
- Die Detektion von Nukleinsäuren hängt von der korrekten Probenentnahme sowie Handhabung, Transport, Lagerung und Vorbereitung ab. Wird das ordnungsgemäße Verfahren bei einem dieser Schritte nicht eingehalten, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.
- Die Prävalenz einer Infektion mit *B. pertussis* beeinflusst den prädiktiven Wert des Tests.

- Die Nukleinsäuren des Organismus können unabhängig von der Lebensfähigkeit des Organismus *in vivo* fortbestehen. Der *illumigene* Pertussis-Assay unterscheidet nicht zwischen lebensfähigen und nicht lebensfähigen Organismen.
- Wie bei allen diagnostischen Tests auf molekularer Grundlage können (A) falsch negative Ergebnisse infolge der Präsenz von Inhibitoren, technischen Fehlern, Vertauschen der Proben und geringer Organismenanzahl in der klinischen Probe entstehen; (B) falsch positive Ergebnisse können infolge der Präsenz einer Kreuzkontamination mit Zielorganismen, deren Nukleinsäuren oder dem amplifizierten Produkt sowie von nicht-spezifischen Signalen entstehen.
- Mit dem *illumigene* Pertussis-Assay wird das Insertionselement IS481 des *Bordetella*-Genoms gezielt nachgewiesen. Das Insertionselement IS481 ist in *B. pertussis*, *B. holmesii* und einigen *B. bronchiseptica*-Stämmen vorhanden.
- Acetylsalicylsäure (in Aspirin) produzierte ungültige Ergebnisse bei Tests mit Konzentrationen über 5 mg/mL im Rahmen der Replikattests mit dem *B. pertussis*-Stamm BAA-589 zur Nachweisgrenze.

LEISTUNGSMERKMALE

Der *illumigene* Pertussis-DNA-Amplifikationsassay wurde von Dezember 2012 bis Juli 2013 durch unabhängige klinische Untersuchungsstellen in geographisch unterschiedlichen Regionen der USA bewertet. Insgesamt 729 qualifizierte und Nasopharyngeal-(NP)-Abstrichproben von Patienten mit vermuteter *B. pertussis*-Respirationstraktinfektion wurden mit dem Testsystem geprüft, um Leistungsmerkmale zu bestimmen. Es handelte sich um übriggebliebene und deidentifiziertere Proben, die früher für routinemäßige *B. pertussis* tests eingeschickt wurden. Die bei der Leistungsbeurteilung untersuchten Proben waren prospektiv (nie eingefroren) und retrospektiv (vor dem *illumigene* test eingefroren). Die Leistung des *illumigene* Pertussis tests wurde mit einer kombinierten Referenzmethode verglichen, die zwei vom Hersteller validierte Echtzeit-PCR-Assays zum gezielten Nachweis von IS481, gefolgt von bidirektionaler Sequenzierung des Amplikon von PCR-positiven Proben, umfasste. Der berechnete Zyklus-Schwellenwert (Ct-Wert) für alle PCR-Assays betrug 35,6 bei der Nachweisgrenze des Assays (PCR1: 3750 KBE/mL, PCR2: 4522 KBE/mL). Proben wurden als positiv angesehen, wenn die Ergebnisse eines der Vergleichs-PCR-Assays Ct-Werte unter 35,6 produzierte und das korrespondierende Ergebnis der bidirektionalen Sequenzierung positiv war. Proben wurden als negativ angesehen, wenn die Ergebnisse beider Vergleichs-PCR-Assays Ct-Werte über 35,6 produzierte. Insgesamt 508 (69,7%) prospektive und 221 retrospektive Proben (30,3%) wurden getestet. Ungültige Ergebnisse wurden von 13 Proben (1,8%) erhalten; zwei Proben blieben ungültig nach wiederholten Tests. Zwei prospektive und zwei retrospektive Proben produzierten unbestimmte Ergebnisse mit dem Vergleichs-PCR-Assay. Tabelle 1 zeigt *illumigene* Leistungscharakteristika; Tabelle 2 beschreibt *illumigene* Leistungscharakteristika nach Einrichtung.

Tabelle 1. *illumigene* Assay-Leistung

| Beschreibung der Probe | Positive Proben | | | Negative Proben | | | Ungültige Ergebnisse ^a |
|------------------------------------|---|--------------|---------------------|---|--------------|---------------------|-----------------------------------|
| | <i>illumigene</i> vs. Vergleichsmethode | PPA | 95% CI | <i>illumigene</i> vs. Vergleichsmethode | NPA | 95% CI | |
| Vergleichspräparat Kompositmethode | | | | | | | |
| Prospektiv | 30/32 | 93,8% | 79,9 – 98,3% | 451/472 | 95,6% | 93,3 – 97,1% | 2 (13) |
| Retrospektiv | 21/21 | 100,0% | 84,5 – 100,0% | 192/198 | 97,0% | 93,5 – 98,6% | 0 |
| GESAMT | 51/53 | 96,2% | 87,2 – 99,0% | 643/670 | 96,0% | 94,2 – 97,2% | 2 (13) |

^a Bei 11/13 anfänglich ungültigen Proben ergaben wiederholte Tests gültige Proben

Tabelle 2. *illumigene* Assay-Leistung nach Einrichtung

| Beschreibung der Probe | Positive Proben | | | Negative Proben | | | Ungültige Ergebnisse ^a |
|------------------------------------|---|--------------|---------------------|---|--------------|---------------------|-----------------------------------|
| | <i>illumigene</i> vs. Vergleichsmethode | PPA | 95% CI | <i>illumigene</i> vs. Vergleichsmethode | NPA | 95% CI | |
| Vergleichspräparat Kompositmethode | | | | | | | |
| Einrichtung 1 | 41/43 | 95,3% | 84,5 – 98,7% | 449/470 | 95,5% | 93,3 – 97,1% | 1 (12) |
| Einrichtung 2 | 3/3 | 100,0% | 43,9 – 100,0% | 67/70 | 95,7% | 88,1 – 98,5% | 1 (11) |
| Einrichtung 3 | 0/0 | N/A | N/A | 8/8 | 100,0% | 67,6 – 100,0% | 0 |
| Einrichtung 4 | 7/7 | 100,0% | 64,6 – 100,0% | 119/122 | 97,5% | 93,0 – 99,2% | 0 |
| GESAMT | 51/53 | 96,2% | 87,2 – 99,0% | 643/670 | 96,0% | 94,2 – 97,2% | (13) |

^a Bei 11/13 anfänglich ungültigen Proben ergaben wiederholte Tests gültige Proben

Klinische Studien wurden mit mehreren Nasopharynx-Abstrichen und Probenelutions-Pufferarten durchgeführt. Probenpuffer, die im Rahmen der klinischen Studien geprüft wurden, umfassten 0,85%ige Kochsalzlösung (n=30 bzw. 4,1%), Tris-EDTA (n=8 bzw. 1,1%) und für die Molekularbiologie geeignetes Wasser (n=687 bzw. 94,2%). Alle Probenpuffer hatten ein Volumen von 0,5 mL. Analytische Studien wurden mit 0,85%iger Kochsalzlösung, Tris-EDTA, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und für die Molekularbiologie geeignetes Wasser durchgeführt. Analytische Studien wiesen eine Äquivalenz aller Probenelutions-Pufferarten nach.

Von 723 Patienten (99,2%), deren Proben getestet wurden, war das Alter bekannt. Das Alter der Patienten lag zwischen 1 Monat und 88 Jahren. 38 Patienten (5,2%) waren weniger als 1 Jahr alt, 13 (1,8%) waren 1 bis 2 Jahre alt, 296 (40,6%) waren 2 bis 12 Jahre alt, 157 (21,5%) waren 12 bis 21 Jahre alt, 190 (26,0%) waren über 21 und unter 65 Jahre alt und die übrigen 29 Patienten (4,0%) waren über 65 Jahre alt. Es wird nicht erwartet, dass die Leistung des *illumigene* Pertussis-Assays bei der Analyse von Proben vom Alter der Patienten abhängt.

Die Studienpopulation umfasste 413 Frauen (56,7%) und 308 Männer (42,2%). Bei 8 Patienten (1,1%) in der Studie war das Geschlecht unbekannt. Es wird nicht erwartet, dass die Leistungscharakteristika des *illumigene* Pertussis-Assays vom Geschlecht der Patienten beeinflusst wird.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität bzw. Nachweisgrenze für den *illumigene* Pertussis-Assay wurde für den *Bordetella pertussis*-Stamm ATCC BAA-589 Tahoma I ermittelt.

Die Nachweisgrenze wurde mit 60 Replikaten des *Bordetella pertussis*-Stamms ATCC BAA-589 bestimmt und eine Wahrscheinlichkeit, positive Ergebnisse zu erhalten, angegeben (z.B. 95%, wenn 57/60 Replikaten positiv sind). Die Tests zur analytischen Sensitivität sind nachstehend zusammengefasst.

| Beschreibung des <i>B. pertussis</i> -Stamms | KBE/mL | KBE/Test |
|--|--------|----------|
| ATCC BAA-589 (Tahoma I) | 3265 | 1,48 |

ASSAY-REAKTIVITÄT

Folgende *B. pertussis*-Stämme wurden getestet und produzierten positive Reaktionen mit dem *illumigene* Pertussis bei 3265 KBE/mL oder 1,48 KBE/Test: ATCC 12743; ATCC 8478; ATCC 8467; ATCC 9797; ATCC 53894; ATCC 10380; ATCC 12742 und A639. Folgende *B. pertussis*-Stämme wurden getestet und produzierten positive Reaktionen mit dem *illumigene* Pertussis bei 3500 KBE/mL oder 1,59 KBE/Test: ATCC 51445 und ATCC BAA-1335.

REPRODUZIERBARKEIT

Reproduzierbarkeitsstudien wurden in drei der vier teilnehmenden klinischen Einrichtungen durchgeführt. Blindkodierte Panels von 10 Proben wurden an die teilnehmenden Laboratorien zur Verfügung gesendet. Die Proben waren innerhalb jedes Panels nach dem Zufallsprinzip gereiht, um die Probenidentität zu maskieren. Die Panels enthielten künstlich hergestellte Proben, die mäßig positiv ($1,31 \times 10^6$ KBE/mL oder 6 KBE/Test), leicht positiv ($4,89 \times 10^3$ KBE/mL oder 2 CFU/Test); und hoch negativ (8,2 CFU/mL oder 0,004 CFU/Test) waren. Das Panel enthielt außerdem eine negative Probe sowie eine positive und negative Kontrolle. Die Tests wurden am selben Tag von verschiedenen Bedienern in jeder Einrichtung (Intra-Assay-Variabilität) fünf Tage lang (Inter-Assay-Variabilität) durchgeführt. In dieser Studie wurden drei Chargen von *illumigene* Pertussis und sechs *illumipro-10*-Instrumente eingesetzt. An jedem Testtag wurden die Positiv- und Negativkontrollen getestet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle unten aufgeführt:

| Probentyp | Einrichtung 1 | | Einrichtung 2 | | Einrichtung 4 | | Gesamt | |
|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------|
| | Übereinstimmung in Prozent | Übereinstimmung in Prozent | Übereinstimmung in Prozent | Übereinstimmung in Prozent | Übereinstimmung in Prozent | Übereinstimmung in Prozent | Übereinstimmung in Prozent | |
| Mäßig positiv | 30/30 | 100,0% | 30/30 | 100,0% | 30/30 | 100,0% | 90/90 | 100,0% |
| Schwach positiv | 27/30 | 90,0% | 29/30 | 96,7% | 30/30 | 100,0% | 86/90 | 95,6% |
| Stark negativ | 26/30 | 86,7% | 23/30 | 76,7% | 29/30 | 96,7% | 78/90 | 86,7% |
| Negativ | 10/10 | 100,0% | 9/10 | 90,0% | 10/10 | 100,0% | 29/30 | 96,7% |
| Negativkontrolle | 10/10 | 100,0% | 10/10 | 100,0% | 10/10 | 100,0% | 30/30 | 100,0% |
| Positivkontrolle | 10/10 | 100,0% | 10/10 | 100,0% | 10/10 | 100,0% | 30/30 | 100,0% |

KREUZREAKTIVITÄT

Kreuzreaktivitätsstudien wurden mit positiven und negativen nasalen Waschproben, die mit bakteriellen oder mykotischen Organismen (Endkonzentration $1,0 \times 10^6$ KBE/mL) oder Viren (mindestens $1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL), inokuliert waren, durchgeführt. Keiner der folgenden Organismen zeigte im *illumigene* Pertussis eine Reaktion: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella petrii*, *Bordetella trematum*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella jordanii*, *Legionella longbeachae*, *Legionella micdadei*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria elongata*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus anginosus* (Gruppe F), *Streptococcus bovis* (Gruppe D), *Streptococcus canis* (Gruppe G), *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus suis*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, Epstein Barr Virus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, humanes Metapneumovirus, Influenza A, Influenza B, Masernvirus, Mumpsvirus, Parainfluenzavirus 1, Parainfluenzavirus 2, Parainfluenzavirus 3, Respiratory syncytial Virus A, Respiratory syncytial Virus B, Rhinovirus.

Bordetella-bronchiseptica-Stamm 4617 und *Bordetella holmesii* wurden bei $1,0 \times 10^6$ KBE/mL getestet und reagierten mit dem *illumigene* Pertussis-Assay.

STÖRSUBSTANZEN-TESTS

Die folgenden chemischen Substanzen stören in den angegebenen gesättigten Lösungsmittel-/Verdünnungsmittelkonzentrationen die Testergebnisse nicht: Paracetamol (10 mg/mL), Advil® [Ibuprofen (10 mg/mL)], Afrin® Abschwellender Nasenspray [Oxymetazolinhydrochlorid (0,0005% Gewicht/Volumsprozent)], Albuterolsulfate [Salbutamolsulfate (1% Gewicht/Volumsprozent)], Aspirin (5 mg/mL), Coricidin® HBP Tabletten gegen Erkältung und Grippe [Paracetamol (3,26 mg/mL), Chlorpheniraminmaleat (0,02 mg/mL)], Diphenhydramin-HCl (0,25 mg/mL), Erythromycin (2% Gewicht/Volumsprozent), Mupirocin (2% Gewicht/Volumsprozent), Petroleum Jelly [weißes Petrolat (1% Gewicht/Volumsprozent)], Robitussin® gegen Husten+Stauungsgefühl in der Brust [Robitussin-DM Hustensirup [Dextromethorphan HBr (0,1 mg/mL), Guaifenesin (1,0 mg/mL)], Suphedrin PE [Phenylephrin-HCl (0,3 mg/mL)], Kochsalzlösung-Nasenspray [Natriumchlorid (0,0065% Gewicht/Volumsprozent)], Schnupftabak (1% Gewicht/Volumsprozent), Tobramycin (0,6 mg/mL), Vicks® VaporRub® [Camphor (0,48% Gewicht/Volumsprozent), Eucalyptusöl (0,12% Gewicht/Volumsprozent), Menthol (0,26% Gewicht/Volumsprozent)].

Aspirin störte die Ergebnisse des *illumigene* Pertussis-Tests bei Konzentrationen über 5 mg/mL.

Die folgenden biologischen Substanzen stören die Testergebnisse in den angegebenen gesättigten Lösungsmittel-/Verdünnungsmittelkonzentrationen nicht: Humane DNA (200 ng/µL), Mucin [Rinder-Submaxillärdrüse Typ I-S (1% Gewicht/Volumsprozent)], Vollblut (1% Gewicht/Volumsprozent).

REFERENCES

- Nagamine, K., Hase, T., Notoni, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifications using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002; 16:223-29.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., Notoni, T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantitating template DNA. *J Biochem Biophys* 2004; 59:145-47.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2005 CDC Guidelines: Recommended Antimicrobial Agents for the Treatment and Postexposure Prophylaxis of Pertussis. 2005; 54(RR14); 1-16.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2012 Final Pertussis Surveillance Report. 2013; 61(52).
- Klein NP, et al. Waning Protection after Fifth Dose of Acellular Pertussis Vaccine in Children. *N Engl J Med* 2012; 367: 1012-1019.
- Misegades LK, et al. Association of Childhood Pertussis with Receipt of 5 Doses of Pertussis Vaccine by Time Since Last Vaccine Dose, California, 2010. *JAMA* 2012; 308(20): 2126-2132.
- Andre P, et al. Comparison of Serological and Real-Time PCR Assays to Diagnose Bordetella pertussis Infection in 2007. *J Clin Micro* 2008; 46(5): 1672-1677.
- Centers for Disease Control and Prevention. Best Practices for Health Care Professionals on the use of Polymerase Chain Reaction (PCR) for Diagnosing Pertussis.
- US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.
- CLSI: MM3-A2 Molecular diagnostic methods for infectious disease; approved guideline, 2nd ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2006.



SN11189

REV. 12/13

| | |
|---|--|
| <p>Meridian Bioscience, Inc. USA/Corporate Office 3471 River Hills Drive Cincinnati, Ohio 45244 Telephone: (513) 271-3700 Orders/Customer Service: (800) 543-1980 Technical Support Center: (800) 343-3858 Information Fax:(513) 272-5432 Ordering Fax:(513) 271-0124</p> | <p>Meridian Bioscience Europe s.a. / n.v. Rue de l'Industrie 7 1400 Nivelles Belgium Tel: +32 (0) 67 89 59 59 Fax: +32 (0) 67 89 59 58 e-mail: info.bn@meridianbioscience.eu</p> |
| | <p>Meridian Bioscience Europe b.v. Halderheiweg 6 5282 SN Boxtel The Netherlands Tel: +31 (0) 411 62 11 66 Fax: +31 (0) 411 62 48 41 e-mail: info.bn@meridianbioscience.eu</p> |
| <p>Meridian Bioscience Europe Via dell'Industria, 7 20020 Villa Cortese (MI) Italy Tel: +39 0331 433636 Fax: +39 0331 433616 e-mail: info@meridianbioscience.eu</p> | <p>Meridian Bioscience Europe France 34, rue de Ponthieu 75008 Paris France Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40 Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10 e-mail: info.fr@meridianbioscience.eu</p> |

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product.

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, Erläuterung der graphischen symbole)

| | | | |
|----------------|--|-------------------------------|--|
| | Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusqu'à / Fecha de caducidad / Verwendbar bis | CONTROL + | Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle |
| LOT | Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargementzeichnung | CONTROL - | Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle |
| IVD | In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum | EC REP | Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunità Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft |
| CE | This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über die Vitro Diagnostik 98/79/EG. | SMP PREP DIL SFE | Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenzubereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet |
| REF | Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer | | Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren |
| | Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten | RoHS | Restriction of Hazardous Substances / Restrizione all'uso di sostanze pericolose / Limitation de substances dangereuses / Restricción de Substancias Nocivas / Beschränkung der Verwendung bestimmter gefährlicher Stoffe |
| | Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller | | Caution, consult accompanying documents / Attention, vedere le istruzioni per l'uso / Attention voir notice d'instructions / Atención, ver instrucciones de uso / Achtung, Begleitdokumente beachten |
| | Contains sufficient for <=> tests / Contiene sufficiente per <=> saggi / Contenu suffisant pour <=> tests / Contenido suficiente para <=> ensayos / Inhalt ausreichend für <=> Prüfungen | BUF RXN | Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction / Reagent / Reagent / Reagent |
| | Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Límite de temperatura / Temperaturbegrenzung | | ETL Registered Mark Certified / Marchio di certificazione registrato a livello nazionale / Certificado Conforme ETL / Marca de Certificación Registrada Nacional / ETL Konform beglaubigt |
| SN | Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer | | Recycle - do not dispose of as general waste / Riciclare - non eliminare come rifiuto generico / Recycle - ne pas jeter dans une poubelle / Reciclar - no desecho como basura general / Recycle - dieses Produkt nicht über den Hausmüll entsorgen |
| TEST | Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de prueba / Testgerät | HT TUBE | Heat Treatment Tube / Provetta per il trattamento termico / Tube pour le traitement thermique / Tubo de tratamiento de calor / Röhrechen zur Hitzebehandlung |
| | Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum | | For IVD Performance Evaluation Only / Solamente per valutazione delle prestazioni / Reagents IVD reserved for evaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung |
| | LASER RADIATION: Avoid Exposure to Beam / RADIAZIONE LASER: Evitare l'esposizione al raggio / RAYONNEMENT LASER: Eviter toute exposition au faisceau / Radiación Laser: Evite exposición a los rayos / LASERSTRAHLUNG: Direktion Kontakt mit dem Strahl vermeiden | | HOT SURFACE: Keep hands away from hot surfaces / Superficie calda: tenero le mani lontano dalle superfici calde / SURFACES CHAUDES: Ne pas toucher les surfaces chaudes / Superficie Caliente: Mantenga las manos alejadas de la superficie caliente / Heiße Oberfläche: Kontakt mit heißen Oberflächen vermeiden |
| | CAUTION: Laser Radiation / ATTENZIONE: Radiazione Laser / AVERTISSEMENT: Rayonnement laser / Precaución: Radiación Laser / WARNUNG: Laserstrahlung | IPX-0 | CAUTION: Protect from water / ATTENZIONE: Proteggere dall'acqua / AVERTISSEMENT: Protéger de l'humidité / Precaución: Protección del agua / WARNUNG: Vor Feuchtigkeit schützen |
| | CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaución: Peligroso / WARNUNG: Riskogefahr | CONTROL | Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest |
| BUF | Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer | REAG | Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien |
| CONJ | Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat | | Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweis |
| MIN OIL | Mineral Oil / Olio Minerale / Huile Minérale / Aceite Mineral / Mineralöl | DET REAG | Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Détection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagent |
| ST TUBE | Screw Top Tube / Provetta con tappo a vite / Tube à bouchon vissé / Tubo con tapa de rosca / Röhrechen mit Schnappverschluss | COL | Sample Preparation Column / Colonna di preparazione del campione / Colonne pour la préparation de l'échantillon / Columna de preparación de muestra / Säule zur Probenaufbereitung |
| BUF SMP | Sample Buffer / Soluzione tampone per i campioni / Tampon de l'échantillon / Tampón de muestra / Probenpuffer | REAG 1 | Reagent 1 / Reagente 1 / Réactifs 1 / Reactivos 1 / Reagenzien 1 |
| REAG 2 | Reagent 2 / Reagente 2 / Réactifs 2 / Reactivos 2 / Reagenzien 2 | REAG 3 | Reagent 3 / Reagente 3 / Réactifs 3 / Reactivos 3 / Reagenzien 3 |
| REAG 4 | Reagent 4 / Reagente 4 / Réactifs 4 / Reactivos 4 / Reagenzien 4 | REAG A | Reagent A / Reagente A / Réactifs A / Reactivos A / Reagenzien A |
| REAG B | Reagent B / Reagente B / Réactifs B / Reactivos B / Reagenzien B | REAG C | Reagent C / Reagente C / Réactifs C / Reactivos C / Reagenzien C |

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at 800-543-1980.