

**Art. Nr. / Ordering No. 25-2025/-2100/-2250**

# **Onar<sup>®</sup> Pertussis**

***Bordetella pertussis/parapertussis***  
**Diagnostic Kit for qPCR**

## **Gebrauchsinformation / Instructions for Use**

Reagenzien für 25/100/250 Reaktionen

Reagents for 25/100/250 reactions

Hersteller / Manufacturer:

**Minerva Biolabs GmbH, Koepenicker Strasse 325, 12555 Berlin, Germany**

**NUR FÜR ERFAHRENE ANWENDER!**  
**FOR PROFESSIONAL USE ONLY!**

**ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK**  
**FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE**



CELL CULTURE CONTAMINATION & QUALITY CONTROL  
CLINICAL | WATER | VETERINARY DIAGNOSTICS  
MYCOPLASMA | BACTERIA | VIRUSES



## Symbole



Zur *in vitro* Diagnostik / For *in vitro* diagnostic use



Ch.-Nr. / Lot No.



Art. Nr. / Order No.



Verfallsdatum / Expiry date



Lagerung bei / Store at



Enthält Reagenzien für 25, 100 oder 250 Bestimmungen / Contains reagents for 25, 100 or 250 tests



Hersteller / Manufacturer

## ANWENDUNGSGEBIET

Dieses Kit dient der gleichzeitigen und quantitativen Direktbestimmung von *Bordetella pertussis* und *Bordetella parapertussis* in Rachenabstrichen und Sputum.

## ERKLÄRUNG DES TESTS

Onar<sup>®</sup>Pertussis ist ein *in vitro* Testsystem zum quantitativen Nachweis von *Bordetella pertussis* und *B. parapertussis* in klinischen Proben. Im Vergleich zu immunologischen Methoden, mit denen sich eine Keuchhustenerkrankung erst 2 bis 3 Wochen nach der Infektion nachweisen lässt, hat sich der PCR-basierte Erregernachweis insbesondere in der Frühdiagnostik bewährt. Gegenüber dem Nachweis mittels Kulturplatten zeichnet sich die PCR durch eine kürzere Analysedauer und höhere Sensitivität aus.

## TESTPRINZIP

Der spezifische Erregernachweis erfolgt durch Amplifikation eines Fragmentes des *dermanecrotic toxin* Gens (*dnt*). Dieser Genabschnitt kommt in allen *Bordetella pertussis* und *B. parapertussis* sowie einigen *B. bronchiseptica* Isolaten vor. *B. bronchiseptica* wird in seltenen Fällen als Human-Infektionen nachgewiesen und ruft ein Keuchhusten-ähnliches klinisches Bild hervor.

Zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse in Folge von PCR-Inhibitoren oder fehlgeschlagener DNA-Extraktion enthält der Onar<sup>®</sup>Pertussis eine interne Amplifikationskontrolle. Die Kontroll-DNA kann der Probe vor der DNA-Extraktion zugegeben und so zur Überprüfung des kompletten Analyseprozesses (DNA-Extraktion und PCR-Reaktion) verwendet werden. Zur ausschließlichen Überprüfung auf PCR-Inhibitoren wird die Kontroll-DNA dem PCR MasterMix zugegeben. Die Detektion der Kontrollreaktion erfolgt bei 610 nm (ROX-Kanal) und die Detektion der spezifischen Erregersequenz erfolgt bei 520 nm (FAM-Kanal).

Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* enthält dUTP statt dTTP, so dass die Option besteht verschleppte Amplifikate aus vorangegangenen Analysen durch Einsatz von Uracil-DNA Glycosylase (UNG) abzubauen und somit das Auftreten falsch positiver Ergebnis minimiert werden kann. UNG ist nicht Bestandteil von Onar<sup>®</sup>Pertussis.

## ENTHALTENE REAGENZIEN

Jedes Kit enthält Reagenzien für 25, 100 oder 250 Reaktionen. Das Verfallsdatum der ungeöffneten Packung ist auf dem Außenetikett vermerkt. Die Lagerung erfolgt bis zur Verwendung bei +2 bis +8 °C.

Das chargenspezifische Qualitätskontrollzertifikat (*Certificate of Analysis*) kann auf unserer Webseite heruntergeladen werden ([www.minerva-biolabs.com](http://www.minerva-biolabs.com)).

Reagenz Bezeichnung	Anzahl			Deckelfarbe
	25 Reaktionen Art. Nr. 25-2025	100 Reaktionen Art. Nr. 25-2100	250 Reaktionen Art. Nr. 25-2250	
Primer/Probe/ Nucleotide Mix	1 x lyophilisiert	4 x lyophilisiert	10 x lyophilisiert	rot
Rehydration Buffer A	1 x 1,8 ml	2 x 1,8 ml	3 x 1,8 ml	blau
Rehydration Buffer B	1 x 1,8 ml	2 x 1,8 ml	3 x 1,8 ml	blau
Positive Control DNA	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	2 x lyophilisiert	grün
Internal Control DNA	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	2 x lyophilisiert	gelb
PCR grade Water	1 x 2,0 ml	1 x 2,0 ml	1 x 2,0 ml	weiß

## BENÖTIGTES, ABER NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

Das Onar®*Pertussis* Kit enthält die Reagenzien für den spezifischen Nachweis von *Bordetella pertussis/parapertussis*. Allgemein übliche Verbrauchsmaterialien und Reagenzien eines PCR Labors sind nicht enthalten. Dazu zählen:

- qPCR-Gerät mit Filtersets für die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe FAM und ROX
- PCR-Reaktionsgefäße, passend für das qPCR-Gerät
- 1,5 ml Reaktionsgefäß, DNA- und RNA-frei
- Mikrozentrifuge für 1,5 ml und PCR-Reaktionsgefäße
- Pipette zum Ansetzen und Dispensieren des Reaktionsmixes mit Filterspitzen (10, 100 und 1000 µl)
- hot-start DNA-Polymerase (1 Unit/Test) mit einer Konzentration von 1 U/µl oder 5 U/µl

optional:

- *Bordetella pertussis* Quantifizierungsstandard (Minerva Biolabs, Artikelnr. 52-5571)

Dieser Kit erzielt exzellente Ergebnisse mit unserer MB *Taq* DNA-Polymerase (Cat # 53-0050/100/200/250). Die Polymerase ist nicht Bestandteil des Kits. Bei der Verwendung anderer Polymerasen kann keine umfassende Leistungsfähigkeit garantiert werden. Gerne senden wir Ihnen auf Anfrage ein kostenloses Testmuster der MB *Taq* (10 Units) zu.

## PROBENMATERIAL

Zur Vermeidung einer Inhibition der PCR sollten die Proben in geeigneter Weise vorbereitet werden. Das Kit wurde mit den folgenden Extraktionsverfahren für Abstrichtupfer und Sputum validiert:

- Minerva Biolabs, MB DNA Extraction Kit (Art.Nr. 56-1100)
- Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit (Art.Nr. 51 304), Protokoll für *Swab Samples*

Gute Erfahrungen wurden mit dem direkten Einsatz von ausgewaschenen Abstrichtupfern gemacht. Die Abstrichtupfer sollten nicht länger als 6 Stunden ungekühlt und nicht länger als 48 Stunden gekühlt transportiert worden sein. Besonders geeignet sind trockene Tupfer aus Dacron® oder Kunstfaser:

1. 200 µl Auswaschpuffer (10 mM Tris.HCl pH 8,5, 0,5 % Tween20) oder Swab Wash Buffer (Minerva Biolabs, Art. Nr. 57-1100) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (DNA-frei) vorlegen.
2. Tupfer in den Auswaschpuffer stecken und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen
3. Tupfer an der Seitenwand des Reaktionsgefäßes ausdrücken.
4. Eluat direkt in den Test einsetzen

Die Qualität des Abstrichs durch den Einsender und die Art des verwendeten Abstrichtupfers beeinflusst unkontrollierbar die Menge enthaltener Begleitsubstanzen und damit direkt die Qualität des Probenmaterials. Die Methode kann daher nicht allgemeingültig validiert werden.

DNA-Extrakte und Abstricheluate lassen sich 6 Tage bei +2 bis +8 °C aufbewahren. Längere Lagerzeiten erfordern eine Temperatur von < -18 °C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

## VORSICHTSMAßNAHMEN

Zur in vitro Diagnostik.

Dieses Kit sollte nur von geschulten Personen verwendet werden.

Alle Patientenproben sollten als potentiell infektiös betrachtet und nach den lokalen oder nationalen Vorschriften behandelt werden.

Dieses Kit enthält keine Gefahrstoffe und kann gemäß den örtlichen Bestimmungen entsorgt werden.

## TESTDURCHFÜHRUNG

Der Test sollte mit Negativ- und Positivkontrollen sowie den Patientenproben in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Zur Quantifizierung ist eine Verdünnungsreihe eines geeigneten Standards mitzuführen. Alle Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf +2 bis +8 °C gebracht werden.

## 1. Rehydratisierung der Reagenzien

Nach Rekonstitution können die Reagenzien bei  $< -18\text{ °C}$  bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden und die rekonstituierten Reagenzien (Primer/Probe/Nucleotide Mix, Interne Amplifikationskontrolle und die Positivkontrolle) ggf. aliquotiert gelagert werden.

1.	Primer/Probe/Nucleotide Mix Internal Control Positive Control	Deckel rot Deckel gelb Deckel grün	Alle Lyophilisate für 5 Sekunden bei max. Umdrehung der Tischzentrifuge zentrifugieren.
2.	Primer/Probe/Nucleotide Mix	Deckel rot	Zugabe von 365 $\mu\text{l}$ Rehydratisierungspuffer A: nur bei Verwendung des Light Cycler mit Glaskapillaren B: für alle anderen qPCR Geräte (Deckel blau)
3.	Internal Control	Deckel gelb	Zugabe von 300 $\mu\text{l}$ PCR grade Water (Deckel weiß)
4.	Positive Control	Deckel grün	Zugabe von 300 $\mu\text{l}$ PCR grade Water (Deckel weiß)
5.	Primer/Probe/Nucleotide Mix Internal Control Positive Control	Deckel rot Deckel gelb Deckel grün	5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
6.	Primer/Probe/Nucleotide Mix Internal Control Positive Control	Deckel rot Deckel gelb Deckel grün	DNA kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren

## 2. Herstellung des Reaktionsmixes

Der Reaktionsmix wird bei Raumtemperatur in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für die benötigte Anzahl an Tests und Kontrollen angesetzt.

Pipettierschema bei Verwendung einer Polymerase mit einer Ausgangskonzentration von 5 U/ $\mu\text{l}$ :

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen	
1.			
	Primer/Probe/Nucleotide Mix	14,0 $\mu\text{l}$	350,0 $\mu\text{l}$
	Internal Control DNA	1,0 $\mu\text{l}$	25,0 $\mu\text{l}$
	Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,2 $\mu\text{l}$	5,0 $\mu\text{l}$

Pipettierschema bei Verwendung einer Polymerase mit einer Ausgangskonzentration von 1 U/ $\mu\text{l}$ :

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen	
1.			
	Primer/Probe/Nucleotide Mix	14,0 $\mu\text{l}$	350,0 $\mu\text{l}$
	Internal Control DNA	1,0 $\mu\text{l}$	25,0 $\mu\text{l}$
	Polymerase (1 U/ $\mu\text{l}$ )	1,0 $\mu\text{l}$	25,0 $\mu\text{l}$

2. Reaktionsmix durch Schnippen des Gefäßes vorsichtig mischen.

3. In jedes PCR-Reaktionsgefäß 15  $\mu\text{l}$  geben. Überschuss verwerfen

## 3. Beschickung der Testansätze

1. Negativkontrollen: Zugabe von wahlweise 10  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer der verwendeten DNA-Extraktion (vgl. Kapitel Probenmaterial) oder PCR Grade Water (Deckel weiß)
2. Proben: Zugabe von jeweils 10  $\mu\text{l}$  Extrakt oder Eluat
3. Positivkontrollen: Zugabe von jeweils 10  $\mu\text{l}$  Positive Control DNA (Deckel grün)
4. Alle Ansätze verschließen, kurz zentrifugieren, in den Thermocycler stellen und Thermocycler-Programm starten.

Zwischen der Herstellung des Mastermixes und dem Starten der PCR sollten nicht mehr als 45 Minuten vergehen, da es sonst zu einer Verringerung der Fluoreszenzausbeute kommen kann. Die Pipettierreihenfolge sollte eingehalten und die Reaktionsgefäße nach jedem Pipettieren sofort geschlossen werden.

## 4. Start der Reaktion

1. Beladung des Cyclers, dabei festen Sitz der PCR-Gefäße in den Gefäßaufnahmen des Gerätes und der Deckel auf den PCR-Gefäßen überprüfen.
2. Programmierung des PCR-Geräts oder Überprüfung gespeicherter Temperaturprofile. Im Anhang werden Temperaturprofile für marktgängige qPCR-Geräte aufgeführt. Protokolle für weitere qPCR-Geräte sind auf Anfrage verfügbar.
3. Start des PCR-Geräts und Aufzeichnung der Messdaten.

## 5. Darstellung der Testergebnisse

1. Speichern der Daten nach Beendigung des Programms
2. Auslesen der Kanäle für die Fluoreszenzfarbstoffe FAM und ROX  
Darstellung der Daten als 2. Ableitung
3. Ermittlung der Ct-Werte für die Negativkontrollen, die Positivkontrollen und die Proben
4. Auswertung unter Beachtung der labor- und gerätespezifischen Referenzbereiche

### Referenzbereiche für ausgewählte qPCR-Geräte:

qPCR-Gerät	Hersteller	Bewertung des <i>threshold cycle</i>		
		positiv	grenzwertig	negativ
LightCycler 1.2	Roche	$< 40$	$\geq 40$	kein Ct
ABI 7500	Applied Biosystems	$< 40$	$\geq 40$	kein Ct
Rotorgene 6000	Corbett	$< 40$	$\geq 40$	kein Ct
Mx3005P	Agilent	$< 40$	$\geq 40$	kein Ct

## ANMERKUNGEN ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

1. Diese Gebrauchsinformation muss für eine erfolgreiche Benutzung des Onar®*Pertussis* weitgehend verstanden worden sein. Die gelieferten Reagenzien einer Charge sind als integrale Einheit zu verstehen. Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht vermischt werden. Die Reagenzien des Kits dürfen nach Ablauf der Haltbarkeit nicht mehr verwendet werden.
2. Jegliche Abweichung vom Testverfahren kann die Resultate beeinträchtigen.
3. Bei Verwendung anderer als der validierten MB Taq DNA Polymerase sind die unter „Benötigtes, aber nicht im Kit enthaltene Material“ aufgeführten Hinweise zu beachten. Die Menge an Polymerase kann bis 2,5 U/Reaktion erhöht werden. Bitte beachten Sie, dass sich dann das Pipettierschema für den Reaktionsmix verändert.
4. Inhibitionen können durch die Probenmatrix direkt aber auch durch den Probenelutionspuffer anderer DNA-Extraktionskits als der Empfohlenen verursacht werden. Die Negativkontrollen sollten daher immer mit dem verwendeten Probenelutionspuffer komplettiert werden.
5. Je Ansatz sollte mindestens eine Negativkontrolle mitgeführt werden, die auch die Probenaufbereitung berücksichtigt. Die Mitführung einer Positivkontrolle erleichtert die Auswertung. Typische Ct-Werte für die Interne Kontrolle und die Positivkontrolle werden auf dem Certificate of Analysis ausgewiesen und können zur orientierenden Qualitätskontrolle dienen.
6. Die Verwendung von Kontrollproben ist ratsam, um die Von-Tag-zu-Tag-Gültigkeit der Resultate zu sichern. Die Kontrollen sollten in gleicher Weise wie die Proben durchgeführt werden. Es wird dem Labor empfohlen eigene Kontrollproben mit einem hohen, medialen und niedrigen (z.B. 3x LOD<sub>95</sub>) Niveau herzustellen bzw. kommerzielle Kontrollen, z.B. MB *Quantification Standard B. pertussis/parapertussis* (Art.Nr. 52-0571), zu verwenden. Eine Teilnahme an externen Qualitätskontrollprogrammen, wie z.B. von der INSTAND e. V. Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V. angeboten, wird empfohlen.

## INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Wie bei allen diagnostischen Tests darf die endgültige klinische Beurteilung nicht auf den Resultaten eines einzelnen Tests beruhen, sondern sollte vom Arzt erst nach der Evaluation aller klinischen Daten und Laborbefunde erfolgen.

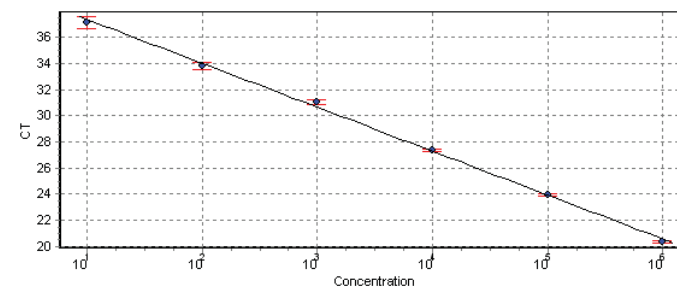
Die hier angegebenen Werte dienen nur als Richtlinie. Jedes Labor sollte seinen eigenen Referenzbereich für die Ct-Werte der Kontrollen und den Nachweisbereich erstellen.

Nachweis von <i>B. pertussis/parapertussis</i> FAM-Kanal	Interne Kontrolle ROX-Kanal	Interpretation
positiv	irrelevant	<i>B. pertussis/parapertussis</i> positiv
negativ	negativ	Inhibition der PCR
negative	positiv	<i>B. pertussis/parapertussis</i> negativ

Die Präsenz von *B. pertussis* oder *B. parapertussis* in der Probe wird durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Target-Kanal angezeigt. Bei Verwendung der Internen Kontrolle wird eine fehlerfreie PCR durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Kanal für die Interne Kontrolle angezeigt. Die Interne Kontrolle ist so gering dosiert, dass sie bei hohen Konzentrationen an Target-DNA nicht mehr amplifiziert wird. Eine erfolgreiche PCR ist dann durch das Signal im Target-Kanal erkennbar.

## ANALYTISCHE CHARAKTERISTIKA DES TESTS

Eine typische Standardkurve für Onar®*Pertussis* ist unten dargestellt. Die Linearregression wurde aus 4 Replikaten je Verdünnungsstufe mit dem RotorGene 6000 ermittelt.



## Präzision

Die Präzision des Onar®*Pertussis* wurde unter Verwendung genomischer DNA Präparationen (*Bordetella pertussis* und *Bordetella parapertussis*) bei drei verschiedenen Konzentrationen auf einem RotorGene 6000 Instrument ermittelt.

Konzentrations-niveau	Genomeinheiten (GE) pro Test	Intraassay Variation [% VK]	Interassay Variation [% VK]
Niedrig	100	1,71	1,81
Mittel	1.000	0,82	0,86
Hoch	10.000	0,30	0,45

Die dargestellte Intraassay Variation basiert auf der Streuung der Ct-Werte von Proben gleicher Konzentrationen (100 GE/PCR, 1000 GE/PCR, 100000 GE/PCR) innerhalb eines Testansatzes mit je 4 Replikaten pro Konzentration. Angegeben ist der Mittelwert des Variationskoeffizienten (VK) aus 4 Wiederholungen. Die dargestellte Interassay Variation basiert auf der Streuung der Ct-Werte von Proben gleicher Konzentrationen (100 GE/PCR, 1000 GE/PCR, 100000 GE/PCR) aus zwei unabhängigen Testansätzen mit je 4 Replikaten pro Konzentration. Angegeben ist der Mittelwert des VK aus 2 Wiederholungen.

## Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität ist normalerweise besser als 20 GE/Test (n=24).

## Wiederfindung

Aufgestockte Abstrichproben wurden vorbereitet, indem Lösungen mit variierenden *Bordetella*-Konzentrationen zu den Abstricheluaten zugegeben wurden. Die Wiederfindungen lagen bei 100 % (n=24).

## Kreuzreaktivität

Eine Kreuzreaktivität mit Mikroorganismen der Bronchialflora (*Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*) oder DNA humanem Ursprungs konnte nicht gefunden werden.

## Anhang: Programmierung und Datenerfassung verschiedener qPCR-Geräte

### 1. LightCycler® 1.2, 1.5 und 2.0

#### Programmschritt 1: Vorinkubation

Zyklen	1
Analysemodus	None
<b>Temperaturprofil [°C]</b>	<b>Segment 1</b>
Zieltemperatur [°C]	95
Inkubationszeit [min]	2:00
Temperaturanstiegsrate [°C/s]	20.0
zweite Zieltemperatur [°C]	0
Temperaturschritte [°C]	0.0
Verzögerung [Zyklen]	0
Fluoreszenzmessung	None

**Die Dauer der Vorinkubation bei 95 °C ist von der verwendeten Polymerase abhängig. Bei anderen Hot-Start-Enzymen muss die Vorinkubation zur Aktivierung entsprechend verlängert werden. Bitte entnehmen Sie die Dauer dem Beipackzettel Ihrer Polymerase.**

#### LightCycler® 2.0:

**Bitte stellen Sie die „Seek Temperature“ auf mindestens 90 °C ein.**

#### Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen 45  
Analysemodus Quantifikation

Temperaturprofil [°C]	Segment 1	Segment 2
Zieltemperatur [°C]	95	60
Inkubationszeit [s]	5	30
Temperaturanstiegsrate [°C/s]	20.0	20.0
zweite Zieltemperatur [°C]	0	0
Temperaturschritte [°C]	0.0	0.0
Verzögerung [Zyklen]	0	0
Fluoreszenzmessung	None	Single

#### Programmschritt 3: Kühlung

Zyklen	1
Analysemodus	None
<b>Temperaturprofil [°C]</b>	<b>Segment 1</b>
Zieltemperatur [°C]	40
Inkubationszeit [s]	30
Temperaturanstiegsrate [°C/s]	20.0
zweite Zieltemperatur [°C]	0
Temperaturschritte [°C]	0.0
Verzögerung [Zyklen]	0
Fluoreszenzmessung	None

### Auswertung der Rohdaten:

- Es erfolgt zunächst die Auswahl der Fluoreszenzkanäle F1 und F2 bzw. Channel 1 und 3
- Zu Darstellung der Amplifikationskurven und den probenspezifischen *ct*-Werten wird auf *Quantification* geklickt.
- Der Threshold wird von der Software automatisch gelegt.
- Amplifikationskurven ohne signifikanten Anstieg sind als negativ zu werten.

	<i>Bordetella</i>	Interne Kontrolle
Kanäle beim LC 1.2, 1.5	F1	F2
Kanäle bei LC 2.0	Channel 1	Channel 3

### 2. Rotorgene 6000 (5-plex)

#### Programmschritt 1: Vorinkubation

Einstellung	Hold
Zieltemperatur	95 °C
Inkubationszeit	3:00 min

**Bitte achten Sie vor dem Start des Laufes auf die korrekte Filterauswahl:**  
**Target (dnt):** Green (470-510 nm)  
**Interne Kontrolle:** Orange (585-610 nm)

#### Programmschritt 2: Amplifikation

Einstellung	Cycling
Zyklen	45
Denaturierung	95 °C für 10 sek
Annealing/Extension	60 °C für 45 sek —> <b>Datenerfassung (Filter Green und Orange)</b>
Gain	automatisch (auto Gain)
Slope Correct	aktiviert
Ignore First	deaktiviert

### Auswertung der Rohdaten:

- Öffnen des Fensters *Analysis*
- Auswahl des Reiters *Quantitation*
- Auswahl des jeweiligen Kanals (Green oder Orange)
- Starten der Analyse durch doppeltes Anklicken.
- Es öffnen sich folgende Fenster:  
*Quantitation Analysis - Cycling A* (green oder orange)  
*Quant. Results - Cycling A* (green oder orange)  
*Standard Curve - Cycling A* (green oder orange)
- Im Fenster *Quantitation Analysis* erst *linear scale* und dann *slope correct* wählen
- Einstellung des Threshold (entfällt wenn eine Standardreihe mitgeführt und *Autothreshold* angewählt wurde)
  - Im Fenster *CT Calculation* den Threshold setzen (Wert 0-1)
  - Thresholdlinie in Grafik plazieren. Die Thresholdlinie sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle gelegt werden.
- Im Fenster *Quant. Results* können die *ct*-Werte abgelesen werden.
- Proben, die keine *ct*-Werte zeigen sind als negativ zu werten.

	<i>Bordetella</i>	Interne Kontrolle
Kanal	Green	Orange

### 3. ABI 7500

#### Detektoreinstellungen:

für die Target-DNA Sonde: Reporter - FAM Quencher - none  
für die Interne Kontroll-Sonde: Reporter - ROX Quencher - none

Die ROX-Referenz-Funktion muss ausgeschaltet sein.

Beide Detektoren müssen für jedes verwendete Reaktionsgefäß aktiviert werden.

Die Fluoreszenzmessung erfolgt während der Extension.

#### Programmschritt 1: Vorinkubation

Einstellung Hold  
Zieltemperatur 95 °C  
Inkubationszeit 3:00 min

#### Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen 45  
Einstellung Cycle  
Denaturierung 95 °C für 15 sek  
Annealing/Extension 60 °C für 60 sek

#### Auswertung der Rohdaten:

- Die Grundeinstellungen erfolgen in der rechten Funktionsleiste:

Data: Delta RN vs. Cycle  
Detector: FAM und ROX  
Line Color: Well Color

	Bordetella	Interne Kontrolle
Kanal	FAM	ROX

- Mit der rechten Maustaste öffnet sich ein neues Fenster, dort erfolgt die Einstellung der *Graph settings*

Folgende Einstellungen sollten dort angewählt und im Anschluß mit ok bestätigt werden:

Real Time Settings: Linear  
Y-Axis Post Run Settings: Linear und Auto Scale  
X-Axis Post Run Settings: Auto Scale  
Display Options: 2

- Zur Berechnung der ct-Werte und deren Darstellung im Report bitte auf *Analyze* klicken.
- Der Threshold sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle gelegt werden.
- Proben ohne ausgewiesenen ct-Wert sind als negativ zu werten.

### 4. Mx3005P

- im Setupmenü, Reiter *Plate Setup* die belegten Wells markieren
- unter *Collect Fluorescence Data* FAM und ROX auswählen
- Reference Dye of „none“ setzen entsprechend Grundeinstellung
- unter „well type“ können die Art der Probe (Negativ- oder Positivkontrolle, Probe, Standard) spezifiziert werden
- Eingabe des Temperaturprofils unter Reiter *„Thermal Profile Design“*:
  - Segment 1 (Pre-Melt): 3 min, 95 °C
  - Segment 2: 15 sec, 95 °C  
1 min, 60 °C  
data collection end, 45 Zyklen
- Unter Menü *„Run“* im Fenster *„Run Status“* auf *„Start“* klicken

#### Auswertung der Rohdaten:

- Im Menü *„Analysis“* auf Reiter *„Analysis Selection/Setup“* zu analysierende Positionen markieren
- Im Fenster *„algorithm enhancement“* müssen die Optionen:
  - Amplification-based threshold
  - Adaptive baseline
  - Moving avergaeaktiviert sein
- Auf Reiter *„Results“* und *„Amplification Plots“* den Threshold automatisch setzen und die Ct-Werte unter *„Text Report“* ablesen

## INDICATION

This kit is used for simultaneous and quantitative direct determination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in throat swabs and sputum.

## EXPLANATION OF THE TEST

Onar<sup>®</sup>Pertussis is a clinical in vitro test system for quantitative detection of *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis* in patient samples. Compared to immunological methods that can detect whooping disease first after 2 to 3 weeks of infection, the PCR-based detection of pathogens has proven qualities especially in the early diagnosis. Compared with the detection by culture plates, PCR is characterized by a shorter analysis time and higher sensitivity.

## TEST PRINCIPLE

The pathogen is specifically detected by amplifying a fragment of the dermanecrotic toxin gene (dnt). This gene segment was found in all *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis* and several isolates of *B. bronchiseptica*. *B. bronchiseptica* is detected in rare cases where human infections and evokes a pertussis-like clinical picture.

False negative results due to PCR inhibitors or improper DNA extraction are detected by the internal amplification control. The Internal Control DNA can be added to the sample prior to DNA extraction and analysis for verification of the complete process (DNA extraction and PCR reaction). The Internal Control DNA can also be added directly to the PCR master mix to act as a PCR control only. The amplification of the control reaction is detected at 610 nm (ROX channel) and the pathogen-specific sequence at 520 nm (FAM channel).

The Primer / Probe / Nucleotide Mix contains dUTP instead of dTTP, so the option is available to degrade amplicons from previous analysis by use of uracil-DNA glycosylase (UNG). Thus the occurrence of false-positive result can be minimized. UNG is not part of Onar<sup>®</sup>Pertussis.

## REAGENTS

Each kit contains reagents for 25, 100 or 250 reactions. The expiry date of the unopened package is marked on the package label. The kit components are stored until use at +2 to +8 ° C. The lot specific quality control certificate (Certificate of Analysis) can be downloaded from our website ([www.minerva-biolabs.com](http://www.minerva-biolabs.com)).

Kit Component Label Information	Quantity			Cap Color
	25 reactions Order No. 25-2025	100 reactions Order No. 25-2100	250 reactions Order No. 25-2250	
Primer/Probe/ Nucleotide Mix	1 x lyophilized	4 x lyophilized	10 x lyophilized	red
Rehydration Buffer A	1 x 1.8 ml	2 x 1.8 ml	3 x 1.8 ml	blue
Rehydration Buffer B	1 x 1.8 ml	2 x 1.8 ml	3 x 1.8 ml	blue
Positive Control DNA	1 x lyophilized	1 x lyophilized	2 x lyophilized	green
Internal Control DNA	1 x lyophilized	1 x lyophilized	2 x lyophilized	yellow
PCR grade Water	1 x 2.0 ml	1 x 2.0 ml	1 x 2.0 ml	white

## NEEDED, BUT NOT INCLUDED IN THE KIT

The Onar<sup>®</sup>Pertussis kit contains the reagents for the specific detection of *Bordetella pertussis* / *parapertussis*. General industrial supplies and reagents, usually available PCR laboratories are not included:

- qPCR device with filter sets for the detection of the fluorescence dyes FAM and ROX
- PCR reaction tubes for the specific qPCR device
- 1,5 ml reaction tubes, DNA- and RNA-free
- Micro centrifuge for 1.5 ml PCR reaction tubes
- Pipettes with corresponding filter tips to prepare and dispense the reaction mix (10, 100 und 1000 µl)
- hot-start DNA polymerase (1 unit/reaction) with a concentration of 1 U/µl or 5 U/µl

optional:

- *Bordetella pertussis* Quantification Standard (Minerva Biolabs, Order No. 52-5571)

This test provides excellent results with MB Taq DNA polymerase (Cat # 53-0050/100/200/250). The polymerase is not part of the kit. A suitable performance of other polymerases can not be guaranteed. Please request your free samples of MB Taq polymerase (10 units).

## SPECIMEN

To avoid inhibition of PCR, samples should be appropriately prepared. The assay was validated using the following extraction procedures for swab and sputum:

- Minerva Biolabs, MB DNA Extraction Kit (No. 56-1100)
- Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit (No. 51 304), Protocol for Swab Samples



### 3. Loading the test tubes

1. Negative Controls: add 10 µl elution buffer from DNA extraction (ref. chapter Sample Material) or PCR Grade Water (white cap)
2. Sample: add 10 µl of eluate or extract
3. Positive Control: add 10 µl Positive Control DNA (green cap)
4. Close and spin all PCR tubes briefly, load the qPCR cyclers and start the program

Preparation of the master mix and sample loading should not take more than 45 minutes to avoid a reduction in the fluorescent signal. The pipetting sequence should be respected and the tubes closed after each sample load.

### 4. Starting the reaction

1. Load the cycler, check each PCR tube and the cycler lid for tight fit
2. Program the qPCR cycler or check stored temperature profiles. See Appendix for temperature profiles of selected qPCR cyclers. Programs for additional cyclers might be available on request.
3. Start the program and data reading.

### 5. Result reading

1. Save the data at the end of the run.
2. Read the channels for the fluorescence dyes FAM and ROX and show the 2nd deviation of the data.
3. Read the calculation of the Ct values for the negative controls, the positive controls and the samples
4. Evaluate in accordance with the laboratory and instrument-specific reference ranges

#### Reference range for selected qPCR devices:

qPCR device	Manufacturer	Evaluating the threshold cycle		
		positive	borderline	negative
LightCycler 1.2	Roche	< 40	≥ 40	no Ct
ABI 7500	Applied Biosystems	< 40	≥ 40	no Ct
Rotorgene 6000	Corbett	< 40	≥ 40	no Ct
Mx3005P	Agilent	< 40	≥ 40	no Ct

### NOTES ON THE TEST PROCEDURE

1. This leaflet must be widely understood for a successful use of Onar®*Pertussis*. The reagents supplied should not be mixed with reagents from different lots and used as an integral unit. The reagents of the kit should not be used beyond its shelf life.
2. Any deviation from the test method can affect the results.
3. When using other than the validated MB Taq DNA polymerase please note the instructions outlined in the section "Required but not provided material". The amount of polymerase can be increased to 2.5 U/ reaction. Please note that the pipetting scheme of the reaction mix needs to be recalculated.
4. Inhibition may be caused by the sample matrix, but also by sample elution buffer of DNA extraction kits not recommended or validated. Negative controls should always be completed with the use sample elution buffer.
5. For each test setup, at least one negative control may be included also including sample preparation. Positive controls facilitate the evaluation of the test. Typical Ct values for the internal control and positive control are shown on the Certificate of Analysis and can be used for orienting quality control.
6. The use of control samples is advised to secure the day-to-day validity of results. The controls should be carried out in the same manner as the samples. It is recommended to run laboratory specific control samples with a high, medial and low (e.g. 3x LOD<sub>95</sub>) level or establish commercial controls, for example, MB Quantification Standard *B. pertussis/parapertussis* (Order No. 52-0571). Participation in external quality control programs, such as offered by the INSTAND e.V., the Society for the promotion of quality assurance in medical laboratories, is recommended.

### INTERPRETATION OF RESULTS

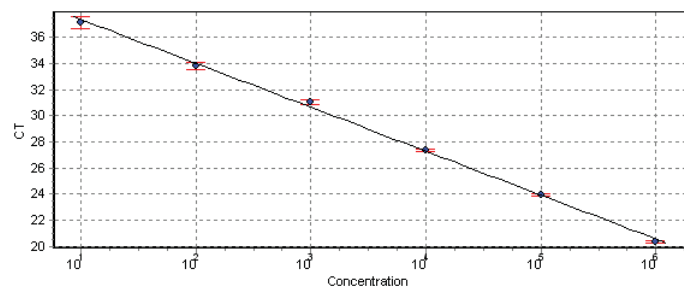
As with all diagnostic tests the final clinical assessment should not be based on the results of a single test, but should be done by doctors only after the evaluation of all clinical and laboratory findings. The values given here are only a guide. Each laboratory should establish its own reference range for the Ct values of controls and samples.

Detection of <i>B. pertussis/parapertussis</i> FAM channel	Internal control ROX channel	Interpretation
positive	irrelevant	<i>B. pertussis/parapertussis</i> positive
negative	negative	PCR inhibition
negative	positive	<i>B. pertussis/parapertussis</i> negative

The presence of *B. pertussis* or *B. parapertussis* in the sample is indicated by an increasing fluorescence signal in the target channel. When using the internal control, an error-free PCR is indicated by an increasing fluorescence signal in the channel for internal control. The Internal control is present at a very low concentration that it is no longer amplified at high concentrations of target DNA. A successful PCR is then detected by the signal in the target channel.

## ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THE TEST

A typical standard curve for Onar®*Pertussis* is shown below. The linear regression was determined from 4 replicates of each dilution step with a RotorGene 6000.



## Precision

The precision of the Onar®*Pertussis* was determined using genomic DNA preparations (*Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*) at three different concentrations at a Rotorgene 6000 instrument.

Target level	Genome Units/reaction	Intra-assay variation [% CV]	Inter-assay variation [% CV]
low	100	1.71	1.81
middle	1,000	0.82	0.86
high	10,000	0.30	0.45

The intra-assay variation shown is based on the variability in the Ct values of samples with the same concentrations (100 GU/PCR, 1000 GU/PCR, 100000 GU/PCR) in a test batch with 4 replicates per concentration. Reported is the mean coefficient of variation (CV) from 4 replicates. The inter-assay variation shown is based on the variability in the Ct values of samples with the same concentrations (100 GU/PCR, 1000 GU/PCR, 100000 GU/PCR) from two independent assays, each with 4 replicates per concentration. Reported is the average of 2 repetitions.

## Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity is typically better than 20 GU/test (n = 24).

## Recovery

Spiked swab samples were prepared by extracting native throat swabs with a swab wash buffer adding a defined concentration of *Bordetella* particles. The recoveries were 100 % in all tests (n = 24).

## Cross-reactivity

A cross-reactivity with microorganisms of the respiratory flora (*Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*) or human DNA origin could not be found.

## Appendix: Programming and data recording devices of different qPCR

### 1. LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0

#### Program 1: Pre-incubation

Cycles	1
Analysis Mode	None
<b>Temperature Targets [°C]</b>	
Target Temperature [°C]	95
Incubation time [min]	2:00
Temperature Transition Rate [°C/s]	20.0
Secondary Target Temperature [°C]	0
Step Size [°C]	0.0
Step Delay [Cycles]	0
Acquisition Mode	None

#### LightCycler® 2.0:

Please check the correct settings for the „seek temperature“ of at least 90 °C.

The pre-incubation time depends on the polymerase used. Hot start enzymes need to be activated at 95°C. Please see polymerase data sheet for duration

#### Program 2: Amplification

Cycles	45	
Analysis Mode	Quantification	
<b>Temperature Targets [°C]</b>		<b>Segment 1</b>
Target Temperature [°C]	95	60
Incubation time [s]	5	30
Temperature Transition Rate [°C/s]	20.0	20.0
Secondary Target Temperature [°C]	0	0
Step Size [°C]	0.0	0.0
Step Delay [Cycles]	0	0
Acquisition Mode	None	Single

#### Program 3: Cooling

Cycles	1
Analysis Mode	None
<b>Temperature Targets [°C]</b>	
Target Temperature [°C]	40
Incubation time [s]	30
Temperature Transition Rate [°C/s]	20.0
Secondary Target Temperature [°C]	0
Step Size [°C]	0.0
Step Delay [Cycles]	0
Acquisition Mode	None

Result Reading:

- Select the fluorescence channels F1 and F2 or Channel 1 and 3 at the LC 2.0
- Click on *Quantification* to generate the amplification plots and the specific Ct-values
- The threshold will be generated automatically.
- Samples showing no significant increase in the amplification plot can be considered as negative.

	<i>Bordetella</i>	Internal Control
channel for LC 1.2, 1.5	F1 (520)	F2 (610)
channel for LC 2.0	channel 1 (520)	channel 3 (610)

**2. Rotorgene 6000 (5-plex)**

Program Step 1: Pre-incubation

Setting	Hold
Hold Temperature	95 °C
Hold Time	3 min 0 sec

Program Step 2: Amplification

Setting	Cycling
Cycles	45
Denaturation	95°C for 10 sec
Annealing/Elongation	60°C for 45 sec —> <b>acquiring to Cycling A (green and orange)</b>
Gain setting	automatic (auto Gain)
Slope Correct	activated
Ignore First	deactivated

**Please check the correct settings for the filter combination:**

**green filter (470-510): *Bordetella***  
**filter orange (585-610): Internal Control**

**The pre-incubation time depends on the polymerase used. Hot start enzymes need to be activated at 95°C. Please see polymerase data sheet for duration**

Result Reading:

- Open the menu *Analysis*
- Select *Quantitation*
- Check the required filter set (green and orange) according to the following table and start data analysis by double click.
- The following windows will appear:  
*Quantitation Analysis - Cycling A (green or orange)*  
*Quant. Results - Cycling A (green or orange)*  
*Standard Curve - Cycling A (green or orange)*
- In window *Quantitation Analysis*, select first *linear scale* and then *slope correct*  
Threshold setup (not applicable if a standard curve was carried with the samples and auto threshold was selected)  
- In window *CT Calculation* set the threshold value to 0-1  
- Pull the threshold line into the graph. Adapt the threshold line to the initial linear section of the positive control reaction.
- The ct-values can be taken from the window *Quant. Results*.
- Samples showing no ct-value can be considered as negative.

	<i>Bordetella</i>	Internal Control
channel	green	orange

**3. ABI 7500**

Detector Settings:

<i>Bordetella</i> Target Probe:	Reporter - FAM	Quencher - none
Internal Control Probe:	Reporter - ROX	Quencher - none

**The ROX Reference needs to be disabled. Activate both detectors for each well.**

**Measurement of fluorescence during extension.**

Program Step 1: Pre-incubation

Setting	Hold
Temperature	95 °C
Incubation time	3:00 min

**The pre-incubation time depends on the polymerase used. Hot start enzymes need to be activated at 95 °C. Please see polymerase data sheet for duration.**

Program Step 2: Amplification

Cycles	45
Setting	Cycle
Denaturing	95 °C für 15 sek
Annealing/Extension	60 °C für 60 sek

Result Reading:

- Enter the following basic setting at the right task bar:  
Data: Delta RN vs. Cycle  
Detector: FAM and ROX  
Line Color: Well Color

	<i>Bordetella</i>	Internal control
channel	FAM	ROX

- Open a new window with for the *Graph settings* by clicking the right mouse button  
Select the following setting and confirm with *ok*:  
Real Time Settings: Linear  
Y-Axis Post Run Settings: Linear and Auto Scale  
X-Axis Post Run Settings: Auto Scale  
Display Options: 2
- Initiate the calculation of the ct-values and the graph generation by clicking on *Analyze* within the report window.
- Pull the threshold line into the graph. Adapt the threshold line to the initial linear section of the positive control reaction.
- Samples showing no ct-value can be considered as negative.

#### 4. Mx3005P

- Go to the setup menu, click on „Plate Setup“, check all positions which apply
- Click on „Collect Fluorescence Data“ and check FAM and ROX
- Corresponding to the basic settings the „Reference Dye“ function should be deactivated
- Specify the type of sample (negative or positive control, sample, standard) at „well type“
- Edit the temperature profile at „Thermal Profile Design“:
  - Segment 1 (Pre-Melt): 3 min, 95 °C
  - Segment 2: 15 sec, 95 °C  
1 min, 60 °C  
data collection end, 45 cycles
- at menu „Run Status“ select „Run“ and start the cycler by pushing „Start“

#### Analysis of raw data:

- In the window "Analysis" tab on "Analysis Selection / Setup" to analyze the marked positions
- Ensure that in window „algorithm enhancement“ all options are activated:
  - Amplification-based threshold
  - Adaptive baseline
  - Moving average
- Click on „Results“ and „Amplification Plots“ for an automatic threshold
- Read the Ct values at „Text Report“

#### APPENDIX

##### *Limited Product Warranty*

This warranty limits our liability for replacement of this product. No warranties of any kind, express or implied, including, without limitation, implied warranties of merchantability or fitness for a particular purpose, are provided. Minerva Biolabs shall have no liability for any direct, indirect, consequential, or incidental damages arising out of the use, the results of use, or the inability to use this product.

##### *Limited License*

The use of this product for clinical diagnostics of pathogens is covered by a Scorpions license from DxS Ltd. Further information on Scorpions licenses can be obtained from DxS Ltd, 48 Grafton St, Manchester, UK M13 9XX.

##### *Trademarks*

LightCycler is a registered trademark of a member of the Roche Group. ABI Prism is a registered trademark of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and certain other countries. FAM™ and ROX™ are trademarks of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and certain other countries. Mx3005P is a trademark of Agilent Technologies. Dacron® is a registered trademark of DuPont. Onar is registered trademarks of Minerva Biolabs GmbH.

Letzte fachliche Überarbeitung: September 2010

Last technical revision: September 2010

## Related Products

### MB Taq DNA Polymerase

53-0050/-0100/-0200/-0250	MB Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	50/100/200/250 units
53-1050/-1100/-1200/-1250	MB Taq DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ l)	50/100/200/250 units

### Clinical Diagnostic Kits for qPCR

20-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Mp <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25/100/250 tests
21-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Ls <i>Legionella species</i>	25/100/250 tests
21-3025/-3100/-3250	Onar <sup>®</sup> Lp <i>Legionella pneumophila</i>	25/100/250 tests
22-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> MRSA Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	25/100/250 tests
23-2025/-2100	Onar <sup>®</sup> Syphilis <i>Treponema pallidum</i>	25/100 tests
24-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Ct <i>Chlamydia trachomatis</i>	25/100/250 tests
25-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Pertussis <i>Bordetella pertussis/parapertussis</i>	25/100/250 tests

### Quantification Standards, 100 $\mu$ l each, 1x10<sup>6</sup> genomes/ $\mu$ l

52-0101	<i>Legionella pneumophila</i>
52-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
52-5571	<i>Bordetella pertussis</i>

### Genomic DNA Extracts, 100 $\mu$ l each, +/- 10 ng / 100 $\mu$ l

51-0566	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , DSMZ 20566
51-5571	<i>Bordetella pertussis</i> , DSMZ 5571
51-3415	<i>Bordetella parapertussis</i> , DSMZ 13415
51-0177	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , NC 10177
51-0111	<i>Mycoplasma hominis</i> , NC 010111
51-0112	<i>Mycoplasma orale</i> , NC 010112
51-0117	<i>Mycoplasma fermentans</i> PG19, NC 010117
51-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , NC 010119
51-0129	<i>Mycoplasma arginini</i> , NC 010129
51-0162	<i>Mycoplasma arthritidis</i> , NC 010162
51-0195	<i>Mycoplasma genitalium</i> , NC 010195
51-1746	<i>Mycoplasma penetrans</i> , NC 11746

### DNA Remover™

15-2025	DNA Decontamination Reagent, spray bottle	250 ml
15-2200	DNA Decontamination Reagent, refill bottles	4 x 500 ml

### Extraktion Kit

56-1100	MB DNA Extraction Kit	100 extractions
---------	-----------------------	-----------------



### Manufacturer

Minerva Biolabs GmbH  
Koepenicker Str. 325  
D-12555 Berlin  
Germany



### Ordering

Tel. +49 (0)30 2000 437-0  
Fax +49 (0)30 2000 437-9  
order@minerva-biolabs.com



### Product Information

www.minerva-biolabs.com  
info@minerva-biolabs.com



### Technical Service

Tel. +49 (0)30 2000 437-0  
support@minerva-biolabs.com

### Made in Germany

Minerva Biolabs GmbH develops and manufactures products in accordance with EN ISO 9001:2008 and EN ISO 13485:2003 quality system requirement.  
Reg.No. SY 60026567 0001 & SX 60025009 0001



...as precise as diagnostics should be™