

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Respiratory Virus Mix I
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Le presenti istruzioni per l'uso si applicano al seguente prodotto:

PRODUCT / PRODOTTO	REFERENCE / CODICE
VIASURE Respiratory Virus Mix / Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444219 / VS-SFR124

Table A 1. Reference for product to be used with the BD MAX™ System. / Codice del prodotto da usare con il BD MAX™ System.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Le istruzioni per l'uso (IFU) sono incluse nel kit nelle lingue inglese/spagnolo.

EN For download IFUs from other languages, please enter in **certest.es/viasure/labeling**. Once you be there, follow the instructions for access to the language that you need. If you need additional information, please contact: viasure@certest.es.

ES Para descargar las IFUS en otros idiomas, por favor, entre en **certest.es/viasure/labeling**. Una vez esté allí, siga las instrucciones para acceder al idioma que necesite. Si necesita información adicional, contacte: viasure@certest.es.

DA For at downloade IFUS fra andre sprog, skal du gå ind på **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, skal du følge instruktionerne for at få adgang til det sprog, du har brug for. Hvis du har brug for yderligere oplysninger, bedes du kontakte: viasure@certest.es.

DE Um den IFUS in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu **certest.es/viasure/labeling**. Wenn Sie dort sind, folgen Sie den Anweisungen, um auf die gewünschte Sprache zuzugreifen. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich an: viasure@certest.es.

FR Pour télécharger l'IFUS dans d'autres langues, veuillez vous rendre sur **certest.es/viasure/labeling**. Une fois sur place, suivez les instructions pour accéder à la langue dont vous avez besoin. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, contactez: viasure@certest.es.

IT Per scaricare l'IFUS in altre lingue, vai su **certest.es/viasure/labeling**. Una volta che sei lì, segui le istruzioni per accedere alla lingua di cui hai bisogno. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta: viasure@certest.es.

NO For å laste ned IFUS fra andre språk, vennligst skriv inn i **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, følg instruksjonene for tilgang til språket du trenger. Hvis du trenger ytterligere informasjon, vennligst kontakt: viasure@certest.es.

PT Para baixar o IFUS em outros idiomas europeus, acesse **certest.es/viasure/labeling**. Uma vez lá, siga as instruções para acessar o idioma que você precisa. Se você precisar de informações adicionais, entre em contato: viasure@certest.es.

SV För att ladda ner IFUS från andra språk, vänligen gå in på **certest.es/viasure/labeling**. När du är där följer du instruktionerna för att få tillgång till det språk du behöver. Om du behöver ytterligare information kan du kontakta: viasure@certest.es.

TR IFUS'u diğer dillerden indirmek için lütfen **certest.es/viasure/labeling** adresine girin. Oraya girdikten sonra, lütfen ihtiyacınız olan dile erişim için talimatları takip edin. Daha fazla bilgiye ihtiyacınız varsa, lütfen viasure@certest.es adresinden iletişime geçin.

Contact viasure@certest.es if your language is not on the list / Contattare viasure@certest.es se la propria lingua non è presente nell'elenco.

Note: The user should notify the manufacturer and the competent authority of the Member State in which he is established as a user and/or patient of any serious incident related to the product.

Nota: L'utente deve segnalare al produttore e alle autorità competenti dello Stato membro in cui si trova come utente e/o paziente qualunque grave incidente relativo al prodotto.

Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	6
4.	Reagents provided	7
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	7
6.	Transport and storage conditions.....	8
7.	Precautions for users	8
8.	Test procedure	9
8.1.	Sample collection, storage and transport.....	9
8.2.	Sample preparation and DNA extraction	10
8.3.	PCR protocol	10
9.	Result interpretation	13
10.	Limitations of the test	15
11.	Quality control	16
12.	Performance characteristics.....	16
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	16
12.2.	Analytical sensitivity	17
12.3.	Analytical specificity	19
12.4.	Analytical reactivity	19

Contenuto

1.	Uso previsto	21
2.	Introduzione e spiegazione	21
3.	Principi del procedimento.....	22
4.	Reagenti forniti	23
5.	Reagenti e strumenti necessari e non inclusi	23
6.	Condizioni di trasporto e conservazione	24
7.	Precauzioni per gli utenti	24
8.	Procedura di test.....	25
8.1.	Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni.....	25
8.2.	Preparazione del campione ed estrazione del DNA	26
8.3.	Protocollo PCR.....	26

9.	Interpretazione dei risultati	29
10.	Limiti del test	31
11.	Controllo di qualità	32
12.	Caratteristiche del test	32
12.1.	Sensibilità e specificità clinica	32
12.2.	Sensibilità analitica.....	33
12.3.	Specificità analitica	35
12.4.	Reattività analitica	35
	Bibliography/ Bibliografia	37
	Symbols for IVD components and reagents/ Simboli per reagenti e componenti IVD	38
	Trademarks.....	38

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated real-time RT-PCR test designed for the qualitative detection of RNA from SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B) in respiratory samples (nasopharyngeal swabs) from patients suspected of respiratory infection by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used as an aid in the identification of SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B) infection in combination with patient's clinical signs and symptoms and epidemiological risk factors. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of RNA and subsequent real-time RT-PCR, employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. RNA is extracted from specimens, and complementary DNA (cDNA) is synthesized and amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B).

2. Summary and Explanation

Coronavirus are enveloped non-segmented positive-sense RNA viruses and belong to Coronaviridae family. There are six coronavirus species known to cause human diseases. Four viruses (229E, OC43, NL63 and HKU1) cause common cold symptoms and the other two (severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)) are zoonotic and producing more severe complications. SARS-CoV and MERS-CoV have caused more than 10,000 cumulative cases in the past two decades, with mortality rates of 34% MERS-CoV and 10% SARS-CoV.

In December 2019, some people that worked at or lived around the Huanan seafood market in Wuhan, Hubei Province, China, have presented pneumonia of unknown cause. Deep sequencing analysis of the respiratory samples indicated a novel coronavirus, which was named firstly 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and lately SARS-CoV-2.

Human-to-human transmission of the SARS-CoV-2 has been confirmed, even in the incubation period without symptoms, and the virus causes severe respiratory illness like those SARS-CoV produced. Although the pneumonia is the principal illness associated, a few patients have developed severe pneumonia, pulmonary edema, acute respiratory distress syndrome, or multiple organ failure and death. Centers of Disease Control and Prevention (CDC) believes that symptoms of SARS-CoV-2 may appear in as few as 2 days or as long as 14 days after exposure, being the most common fever or chills, cough, fatigue, anorexia, myalgia and dyspnea. Less common symptoms are sore throat, nasal congestion, headache, diarrhea, nausea and vomiting. Loss of smell (anosmia) or loss of taste (ageusia) preceding the onset of respiratory symptoms has also been reported. Older adults and people who have severe underlying medical conditions like heart or lung disease or diabetes seem to be at higher risk for developing more serious complications from COVID-19 illness.

CDC recommends upper respiratory tract specimens (nasopharyngeal (NP) and oropharyngeal (OP) swabs, nasal mid-turbinate swab, nasal swab, nasopharyngeal wash/aspirate or nasal wash/aspirate (NW) specimens collected mainly by a healthcare provider) and/or lower respiratory specimens (sputum, endotracheal aspirate, or bronchoalveolar lavage in patients with more severe respiratory disease) for the identification of SARS-CoV-2 and

other respiratory viruses, such as Influenza and RSV.

Influenza viruses belong to the Orthomyxoviridae family and cause the majority of viral lower respiratory tract infections. Influenza A and B are a significant cause of morbidity and mortality worldwide, considering that elderly and compromised individuals are especially at risk of developing severe illness and complications such as pneumonia. People feel some or all of these symptoms: fever or feeling feverish/chills, cough, sore throat, nasal stuffiness and discharge, myalgia, headaches, and anorexia. The influenza viruses can be spread from person to person in two different ways: through the air (large droplets and aerosols from sneezing and coughing), and by direct or indirect contact.

Influenza A and B are an enveloped, single stranded RNA viruses that containing eight segmented strands of genome RNA, which typically encodes 11 or 12 viral proteins. The viral envelope, derived from the host plasma membrane, consists of a lipid bilayer containing transmembrane proteins, like hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), and matrix proteins M1 and M2. Influenza A viruses are further classified into subtypes based on the antigenicity of their “HA” and “NA” molecules, whereas Influenza B is divided into 2 antigenically and genetically distinct lineages, Victoria and Yamagata.

Human respiratory syncytial viruses A and B (RSV) belong to the Paramyxoviridae family and are the most important viral agents of acute respiratory infections. RSV is an enveloped, nonsegmented, negative, single stranded linear RNA genome virus. Respiratory syncytial virus is a common contributor of respiratory infections causing bronchitis, pneumonia, and chronic obstructive pulmonary infections in people of all ages. People often feel some or all of these symptoms: rhinorrhea, low-grade fever, cough, sore throat, headache, and wheezing. RSV is transmitted via large nasopharyngeal secretion droplets from infected individuals, close contact, or self-inoculation after touching contaminated surfaces.

Diagnosis can be problematic, as a wide range of pathogens can cause acute respiratory infections presenting with similar clinical syndromes. Real-time PCR assays have been shown to be a sensitive and specific diagnostic tool for the detection of SARS-CoV-2, Flu A, Flu B and RSV viruses.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the qualitative detection of RNA from SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B) in nasopharyngeal swabs. The detection is done in one step real-time RT-PCR format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction tube. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase, which is followed by the amplification of a conserved region of *N* and *ORF1ab* genes of SARS-CoV-2, *M1* gene of Influenza B, *M1* gene of Influenza A and *N* gene of RSV (types A and B) using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence is measured on the BD MAX™ System.

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains in each tube all the components necessary for real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase and reverse-transcriptase) in a stabilized format, as well as an endogenous internal control to monitor the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an Endogenous Internal Control (EIC) (human *RNase P* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

Target	Channel	Gene
SARS-CoV-2	475/520	<i>N</i> and <i>ORF1ab</i> gene
Influenza B	530/565	<i>Matrix</i> gene (<i>M1</i>)
Influenza A	585/630	<i>Matrix</i> gene (<i>M1</i>)
RSV (A/B)	630/665	<i>N</i> gene
Endogenous Internal Control (EIC)	680/715	Human <i>RNase P</i> gene

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System includes the following materials and reagents detailed in Table 2:

Reagent/Material	Description	Barcode	Amount
<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube	A mix of enzymes, primers-probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	1K foil	2 pouches of 12 transparent tubes
Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	11 foil	1 pouch of 24 transparent tubes

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°. VS-SFR124 (444219).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442828 or 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).
- Nuclease-free water.
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- After opening the aluminum pouches which contain the reaction tubes, the product can be used up to 28 days.

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health care professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing and the BD MAX™ System are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges (BD MAX™ PCR Cartridge).
- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.

- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. Sample collection, storage and transport

The VIASURE *Respiratory Virus Mix 1* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been tested on nasopharyngeal swabs collected in sterile Vircell® transport medium or in sterile Virus transport and preservation medium (Biocomma®), and in Universal Transport Medium, depending on the sample. Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 72 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 72 hours), we recommend shipping at ≤ -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 72 hours or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The clinical samples must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94) and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. Sample preparation and DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations in the instructions for use of extraction kit used, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Note that some other samples may require pre-processing. Application-specific extraction preparation procedures should be developed and validated by the user.

1. Pipette 400-750 µL of nasopharyngeal samples into a BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR protocol

Note: Please, refer to the BD MAX™ System User's Manual for detailed instructions.

8.3.1. Creating PCR test program for VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Note: If you have already created the test for the VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the Basic Information tab, within the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE Respiratory Virus Mix I.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to 950 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) If running software version 5.00 or higher and have barcoded foil snap-in tubes, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
 - a. Snap-In 2 Barcode: 1K (concerning Respiratory Virus Mix I reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 Barcode: another reaction tube (different foil) if you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1).
- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Influenza B	80	150	0	40
585/630 (ROX)	Influenza A	80	150	0	40
630/665 (Cy5)	RSV (A/B)	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	EIC	80	150	0	35

Table 3. PCR settings.

Note: It is recommended to set the minimum threshold values listed above for each channel as a starting point, but the final settings must be determined by the end-user during the result interpretation, in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

10) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 4), as well.

		False Receiving Channel					
		Channel	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel	475/520	-	4.0	0.0	0.0	0.0	
	530/565	1.0	-	0.0	0.0	0.0	
	585/630	0.0	0.0	-	1.0	0.0	
	630/665	0.0	0.0	3.0	-	18.0	
	680/715	0.0	0.0	0.0	1.5	-	

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

11) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 5).

Step Name	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Reverse transcription	Hold	1	900	45°C	-
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

Table 5. PCR protocol.

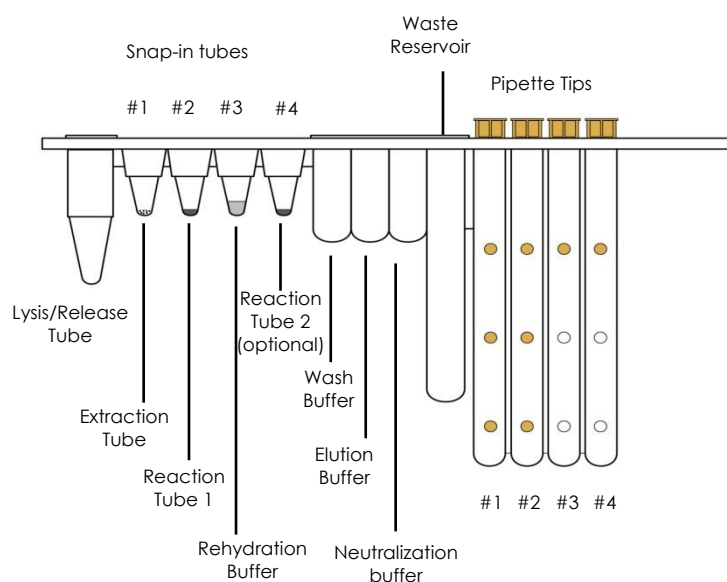
12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- Determine and separate the appropriate number of *Respiratory Virus Mix 1* reaction tubes (1K foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
 - Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.

- b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- i. Note: If you choose the format “Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (11 foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
- a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the “Work List” tab on the “Run” screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the “Test” drop down menu, select VIASURE *Respiratory Virus Mix 1* (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull-down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Work List, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Work List and click the “Save” button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).

- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

8.3.4. BD MAX™ report

- 1) In main menu, click the "Results" button.
- 2) Either double click on your run in the list or press the "view button".
- 3) Click on "Print", select: "Run Details, Test Details and Plot...".
- 4) Click on "Print or Export button" on the "Run Reports" screen.

9. Result interpretation

For a detailed description on how to analyze data, refer to the BD MAX™ System User's manual.

The analysis of the data is done by the BD MAX™ software according to the manufacturer's instructions. The BD MAX™ software reports Ct values and amplification curves for each detector channel of each sample tested in the following way:

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 3). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred that meets the setting criteria.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 6.

Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. In addition, check that there is no report of BD MAX™ System failure.

Results should be read and analyzed using the following table:

SARS-CoV-2 (475/520)	Flu B (530/565)	Flu A (585/630)	RSV (A/B) (630/655)	Endogenous Internal Control (680/715)	Interpretation
+	+	+	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A and RSV (A/B) RNA detected ¹
-	+	+	+	+/- ¹	Flu B, Flu A, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2 RNA not detected ¹
+	-	+	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu A, RSV (A/B) RNA detected and Flu B RNA not detected ¹
+	+	-	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B, RSV (A/B) RNA detected and Flu A RNA not detected ¹
+	+	+	-	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A RNA detected and RSV (A/B) RNA not detected ¹
+	+	-	-	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B RNA detected and Flu A, RSV (A/B) RNA not detected ¹
+	-	+	-	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu A RNA detected and Flu B, RSV (A/B) RNA not detected ¹
+	-	-	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, RSV (A/B) RNA detected and Flu B, Flu A RNA not detected ¹
-	+	+	-	+/- ¹	Flu B, Flu A RNA detected and SARS-CoV-2, RSV (A/B) RNA not detected ¹
-	+	-	+	+/- ¹	Flu B, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2, Flu A RNA not detected ¹
-	-	+	+	+/- ¹	Flu A, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2, Flu B RNA not detected ¹
+	-	-	-	+/- ¹	SARS-CoV-2 RNA detected ¹
-	+	-	-	+/- ¹	Influenza B RNA detected ¹
-	-	+	-	+/- ¹	Influenza A RNA detected ¹
-	-	-	+	+/- ¹	RSV RNA detected ¹
-	-	-	-	+ ²	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A and RSV (A/B) RNA not detected ²
-	-	-	-	- ²	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs. ²
IND	IND	IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

1 A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40. The Endogenous Internal Control (EIC) may or may not show an amplification signal. Sometimes, the EIC detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 A sample is considered negative if the sample shows no amplification signal in the detection system, but the endogenous internal control is positive (Ct less than 35). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control. In case of unresolved results (UNR), absence of internal control signal in negative sample it is recommended to repeat the assay following the indications below.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user; to verify the correct performance of each PCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

NOTE: New samples may be tested in the same run with repeat samples.

The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with nasopharyngeal swabs.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from respiratory samples must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B), either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for detection of the *N* and *ORF1ab* genes of SARS-CoV-2, *M1* gene of Influenza B, *M1* gene of Influenza A and *N* gene of RSV (types A and B) used in VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, or other respiratory microorganisms, which might result in predictable false positive.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including RNA extraction).
 - Degradation of the RNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) strains.
 - Organism levels in the specimen below the limit of detection or cutoff for the assay.

- The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent COVID-19, gripe and RSV or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
- Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Some samples may fail to exhibit *RNase P* amplification curves due to low human cell numbers in the original clinical sample. A negative IC signal does not preclude the presence of SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable virus and does not imply that these virus are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of target viral sequences.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- A negative result does not preclude the presence of target *RNA* in a clinical specimen. If clinical observations, patient history and epidemiological information suggest SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) infection, re-testing increasing sample volume should be considered.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample, or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

11. Quality control

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains an Endogenous Internal Control (EIC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using clinical samples (nasopharyngeal swabs) from patients with clinical suspicion of SARS-CoV-2, Flu A/B and or RSV A/B infection. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	CerTest Biotec S.L. in collaboration with the Biobank of the Sistema de Salud de Aragón (BSSA) and the Microbiology and Parasitology Department of Hospital Universitario Central de Asturias	Nasopharyngeal swabs	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
				Influenza B
				Influenza A
				RSV (A/B)

Table 7. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, and specificity for VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) or VIASURE SARS-CoV-2 Real time PCR Detection Kit, + subsequent whole genome sequencing	SARS-CoV-2	127	625	1	3	0.977 (0.934-0.995)	0.998 (0.991-1)
	Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic acid test for use on the cobas® Liat® System (cobas® Influenza A/B & RSV)	Influenza B	18	738	0	0	1 (0.815-1)	1 (0.995-1)
		Influenza A	49	704	1	2	0.961 (0.865 – 0.995)	0.999 (0.992-1)
		RSV (A/B)	50	706	0	0	1 (0.929-1)	1 (0.995-1)

Table 8. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity for VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Result show agreement to detect SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (A/B) using VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System detection limit (LoD) results on nasopharyngeal samples with a positive rate of $\geq 95\%$ are as follows:

- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of 5.01 IU (International Units)/ μl for SARS-CoV-2.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of 1.8×10^2 CEID₅₀ (Median Chicken Embryo Infectious Dose)/ml for Influenza B.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of $10^{-0.5}$ TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose) /ml for Influenza A.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of 4 genome copies/ μl for RSVA and RSVB.

Note: The detection limit was calculated using a sample volume of 400 μl .

Examples of the amplification plots resulting from running an assay on the BD MAX™ System are shown below

Figure 2. Dilution series of SARS-CoV-2 (5×10^5 - 5×10^0 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

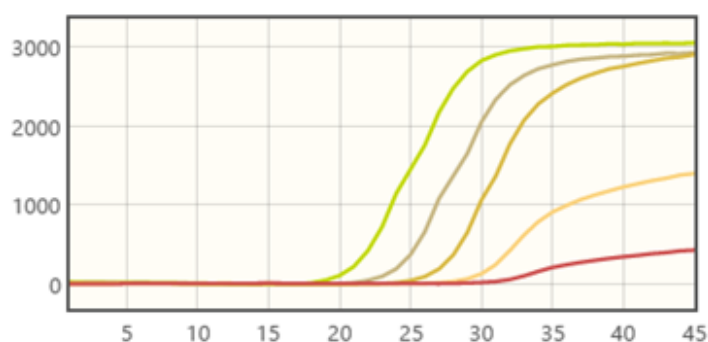


Figure 3. Dilution series of Influenza B (5×10^5 - 5×10^0 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).

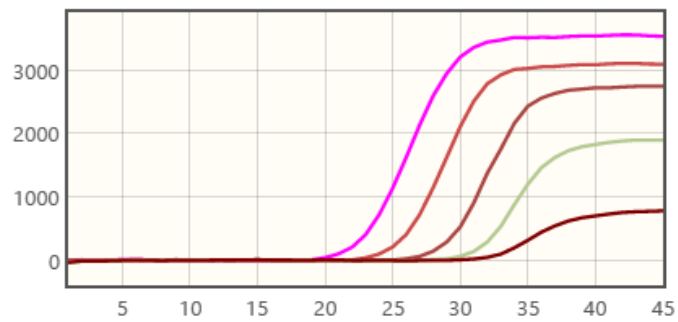


Figure 4. Dilution series of Influenza A (5×10^5 - 5×10^0 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

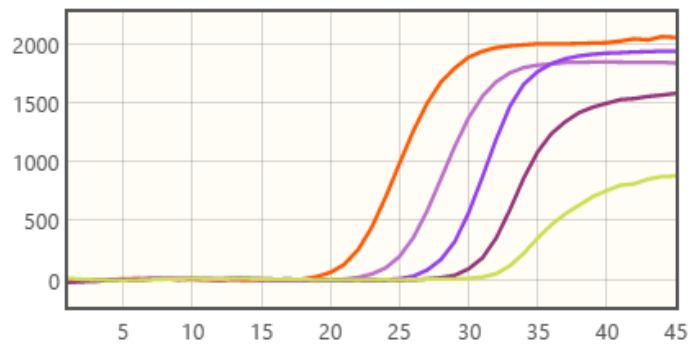


Figure 5. Dilution series of RSVA (5×10^5 - 5×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (CY5) channel).

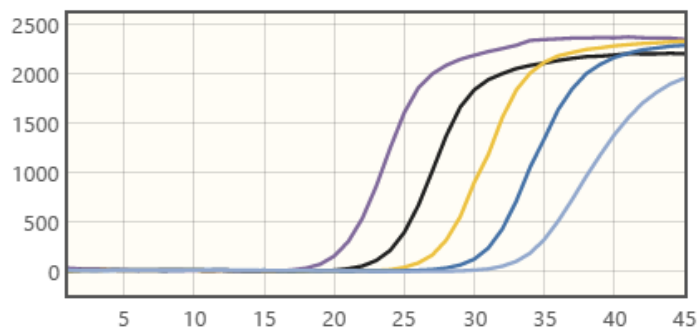
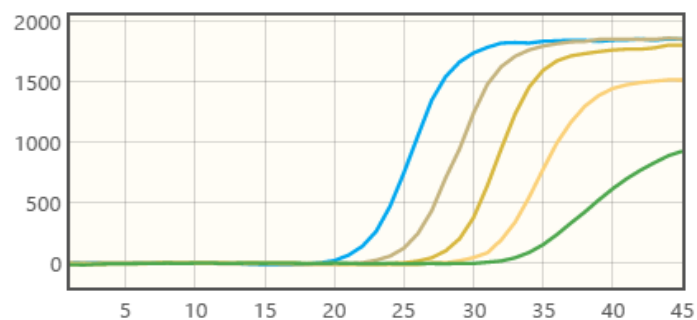


Figure 6. Dilution series of RSVB (5×10^5 - 5×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (CY5) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Respiratory Virus Mix I* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Bocavirus	-	Enterovirus Echovirus 30	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Enterovirus 68, 71	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Human rhinovirus	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Human metapneumovirus A and B	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
MERS Coronavirus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **SARS-CoV-2** was evaluated against RNA extracted from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1, synthetic RNA controls for MT007544.1 variant (SARSCoV2 isolate Australia/VIC01/2020), MN908947.3 variant (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), alpha variant (B.1.1.7 England/MILK-9E05B3/2020), Beta variant (B.1.351 South Africa/KRISP-EC-K005299/2020), Gamma variant (P.1 Japan (Brazil) /IC-0564/2021) and Kappa variant (B.1.617.1 India/CT-ILSGS00361/2021), and heat inactivated SARSCoV-2 strain 2019nCoV/USAWA1/2020 (ATCC® VR1986HK™), and irradiated cell lysate from 2019-nCoV/USA-WA1/2020, and lyophilized cell lysates from BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER, BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 and BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **Influenza B** was evaluated against RNA extracted from the following strains: B/Phuket/3073/2013 virus, B/Brisbane/60/2008 virus, Influenza B/Florida/04/06 virus, B/Pennsylvania/7/2007 (Yamagata Lineage), B/Santiago/4364/2007 (Yamagata Lineage) virus, B/Brisbane/3/2007 (Yamagata Lineage) virus, B/Pennsylvania/5/2007 (Victoria Lineage), B/Victoria/304/2006 (Victoria Lineage) virus, B/Bangladesh/3333/2007 (Yamagata Lineage) virus, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **Influenza A** was evaluated against RNA extracted from the following strains: A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016(H5N8) virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus,

A/Michigan/45/2015 (H1N1 pdm09) virus, A/California/7/2009 (H1N1) virus, A/California/7/2009 (H1N1pdm09) virus, A/South Australia/55/2014 virus, Switzerland/9715293/2013 (H3N2) IVR-175 virus, A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 virus, A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B virus, Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) virus, A/Brisbane/59/2007 (H1N1) virus, A/South Dakota/6/2007 (H1N1) virus, A/Hawaii/31/2007 (H1N1) virus, A/Qatar/1123/2007 (H1N1) virus, A/Cambodia/0371/2007 (H1N1) virus, Influenza A Virus, A/Brisbane/10/2007 (H3N2) virus, Influenza A Virus, A/Taiwan/760/2007 (H3N2) virus, Influenza A Virus, A/Texas/71/2007 (H3N2) virus, A/Brisbane/10/2007 (H3N2) IVR-147 virus, A/Brisbane/59/2007 (H1N1) IVR-148 virus, A/South Dakota/6/2007 (H1N1) X-173 virus, A/California/07/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/California/08/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/Mexico/4108/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/California/07/2009 (H1N1 pdm09) NYMC X-179A virus, A/Victoria/2570/2019 IVR-215 virus and A/Cambodia/e0826360/2020 IVR-224 virus, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **RSV** was evaluated against RNA extracted from Respiratory Syncytial Virus A (strain A-2) and Respiratory Syncytial Virus B (strain 9320), showing positive results.

ITALIANO

1. Uso previsto

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è un test automatizzato di real-time RT-PCR realizzato per il rilevamento qualitativo di RNA da SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A ed RSV (tipi A e B) in campioni respiratori (tamponi nasofaringei) di pazienti con sospetta infezione respiratoria segnalati dai loro medici curanti. Questo test è pensato per essere utilizzato come supporto nell'identificazione dell'infezione da SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A ed RSV (tipi A e B) quando associata a segni clinici e sintomi del paziente, e a fattori di rischio epidemiologico. Questo test utilizza il BD MAX™ System per l'estrazione automatica dell'RNA e la successiva real-time RT-PCR, utilizzando i reagenti forniti insieme ai reagenti universali e agli articoli monouso del BD MAX™ System. L'RNA viene estratto dai campioni, mentre il DNA complementare (cDNA) viene sintetizzato e amplificato utilizzando l'RT-PCR e rilevato utilizzando sonde marcate da un colorante fluorescente specifiche per SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A ed RSV (tipi A e B).

2. Introduzione e spiegazione

I Coronavirus sono composti da virus a RNA con involucro a polarità positiva e appartengono alla famiglia dei Coronaviridae. Esistono sei specie di coronavirus noti per causare malattie nell'uomo. Quattro virus (229E, OC43, NL63 e HKU1) causano i sintomi della comune influenza e altri due [sindrome respiratoria acuta grave da Coronavirus (SARS-CoV) e sindrome respiratoria mediorientale da Coronavirus (MERS-CoV)] sono zoonosici e causano complicanze più gravi. Il SARS-CoV e il MERS-CoV hanno causato oltre 10.000 casi cumulativi negli ultimi due decenni, con un tasso di mortalità del 34% per il MERS-CoV e del 10% per il SARS-CoV.

Nel dicembre 2019, alcune persone che lavoravano o vivevano nella zona intorno al mercato del pesce Huanan di Wuhan, nella provincia di Hubei, in Cina, hanno riportato una polmonite di origine sconosciuta. Le accurate analisi di sequenziamento dei campioni respiratori indicavano un nuovo coronavirus, denominato inizialmente nuovo Coronavirus 2019 (2019-nCoV) e successivamente SARS-CoV-2.

È stato dimostrato che il SARS-CoV-2 è trasmissibile da uomo a uomo, anche durante il periodo di incubazione in cui non si manifestano i sintomi, e che causa una malattia respiratoria grave simile a quelle prodotte dal SARS-CoV. Nonostante la polmonite sia la principale malattia associata, alcuni pazienti hanno sviluppato polmonite grave, edema polmonare, sindrome da distress respiratorio acuto, insufficienza multiorganica e morte. I Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie (*Centers of Disease Control and Prevention*, CDC) ritengono che i sintomi del SARS-CoV-2 compaiano tra i 2 e i 14 giorni dopo l'esposizione, con febbre o brividi, tosse, spossatezza, anoressia, mialgia e dispnea tra i sintomi più comuni. Sintomi meno comuni sono infiammazione della gola, congestione nasale, cefalea, diarrea nausea e vomito. È stata inoltre riportata la perdita dell'odorato (anosmia) o la perdita del gusto (ageusia) che precedono l'insorgenza dei sintomi respiratori. I soggetti in età avanzata e le persone con patologie mediche concomitanti, come ad esempio patologie cardiache o polmonari o diabete, sembrano avere un rischio maggiore di sviluppare complicazioni più gravi associate alla COVID-19.

Per l'identificazione del SARS-CoV-2 e di altri virus respiratori, come l'Influenza e l'RSV, il CDC raccomanda di utilizzare campioni delle prime vie respiratorie [tamponi nasofaringei (NP) e orofaringei (OP), tampone dei turbinati centrali nasali, tamponi nasali, lavaggio/aspirato nasofaringeo o lavaggio/aspirato nasale (NW) prelevati

principalmente da un medico) e/o campioni delle vie respiratorie profonde (espettorato, aspirato endotracheale o lavaggio broncoalveolare nei pazienti con patologie respiratorie più gravi).

I virus dell'Influenza appartengono alla famiglia Orthomyxoviridae e sono responsabili della maggior parte delle infezioni virali del tratto respiratorio inferiore. I virus dell'Influenza A e B sono una causa significativa di morbilità e mortalità a livello mondiale, considerando che gli anziani e i soggetti compromessi hanno un rischio particolarmente elevato di sviluppare una forma grave della malattia e complicanze come la polmonite. Le persone possono avere alcuni o tutti i sintomi seguenti: febbre o sentirsi febbricitanti/avere i brividi, tosse, mal di gola, naso pieno e scolo nasale, mialgia, cefalea e anoressia. I virus influenzali possono trasmettere da persona a persona in due modi diversi: attraverso l'aria (goccioline e aerosol da starnuti e tosse) e mediante contatto diretto o indiretto.

I virus dell'Influenza A e B sono virus a singolo filamento di RNA con envelope contenenti otto filamenti segmentati di RNA genomico, che generalmente codifica 11 o 12 proteine virali. L'envelope virale, derivato dalla membrana plasmatica dell'ospite, è formato da un doppio strato lipidico contenente proteine transmembrana, come l'emoagglutinina (HA) e la neuraminidasi (NA) e le proteine della matrice M1 e M2. I virus dell'Influenza A sono ulteriormente classificati in sottotipi in base all'antigenicità delle loro molecole "HA" e "NA", mentre il virus dell'Influenza B è diviso in 2 linee distinte punto di vista antigenico e genetico: Victoria e Yamagata.

I virus respiratori sinciziali umani A e B (RSV) appartengono alla famiglia Paramyxoviridae e sono gli agenti virali più importanti delle infezioni respiratorie acute. L'RSV è un virus genomico a singolo filamento lineare di RNA con envelope, negativo e non segmentato. Il virus sinciziale respiratorio è una causa comune delle infezioni respiratorie e causa bronchite, polmoniti e infezioni polmonari ostruttive croniche in persone di tutte le età. Le persone spesso hanno alcuni o tutti i sintomi seguenti: rinorrea, leggera febbre, tosse, mal di gola, cefalea e sibili respiratori. L'RSV si trasmette attraverso grosse goccioline delle secrezioni nasofaringee di soggetti infetti e a stretto contatto o tramite il contatto con superfici contaminate.

La diagnosi può essere problematica, poiché un'ampia gamma di patogeni può causare infezioni respiratorie acute con presentazione di sintomi clinici simili. I dosaggi PCR temporale si sono dimostrati essere uno strumento diagnostico sensibile e specifico per il rilevamento dei virus di SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B e RSV.

3. Principi del procedimento

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è realizzato per il rilevamento qualitativo di RNA da SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A ed RSV (tipi A e B) in campioni nasofaringei. Il rilevamento si esegue con un test di real-time RT-PCR in un solo passaggio, in cui la trascrizione inversa e la successiva amplificazione della specifica sequenza target avvengono nella stessa provetta di reazione. L'RNA bersaglio isolato viene trascritto generando un DNA complementare mediante trascrittasi inversa, a cui segue l'amplificazione di una regione conservata dei geni *N* e *ORF1ab* del SARS-CoV-2, del gene *M1* dell'Influenza B, del gene *M1* dell'Influenza A e del gene *N* dell'RSV (tipi A e B) utilizzando primer specifici e una sonda marcata a fluorescenza.

Il VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System si basa sull'attività esonucleasica 5' delle DNA polimerasi. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima idrolizza la sonda legata alla sequenza complementare di DNA, separando il quencher dal marcatore. Questa reazione genera un aumento del segnale

fluorescente proporzionale alla quantità del modello target. Questa fluorescenza viene misurata sul BD MAX™ System.

Il VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene in ciascuna provetta tutti i componenti necessari per un test di PCR in tempo reale (primer/sonde specifici, dNTP, tampone, polimerasi e trascrittasi inversa) in formato stabilizzato e un controllo interno endogeno per monitorare il processo di estrazione e/o l'inibizione dell'attività della polimerasi. Il test utilizza un gene umano costitutivo come Controllo interno endogeno (EIC) (gene umano *RNase P*). I geni costitutivi umani sono coinvolti nel mantenimento di base delle cellule e, pertanto, ci si aspetta che siano presenti in tutte le cellule umane nucleate e che mantengano livelli di espressione relativamente costanti.

Target	Canale	Gene
SARS-CoV-2	475/520	Gene <i>N</i> e <i>ORF1ab</i>
Influenza B	530/565	Gene <i>Matrix (M1)</i>
Influenza A	585/630	Gene <i>Matrix (M1)</i>
RSV (A/B)	630/665	Gene <i>N</i>
Controllo interno endogeno (EIC)	680/715	Gene umano <i>RNase P</i>

Tabella 10. Target, canale e geni.

4. Reagenti forniti

Il VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System include i seguenti materiali e reagenti illustrati nella Tabella 2:

Reagente/Materiale	Descrizione	Codice a barre	Quantità
<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube	Una miscela di enzimi, sonde/primer, tampone, dNTP, stabilizzatori e controllo interno endogeno in un formato stabilizzato	sigillo 1K	2 confezioni da 12 provette trasparenti
Rehydration Buffer tube	Soluzione per ricostituire il prodotto stabilizzato	Sigillo 11	1 confezione da 24 provette trasparenti

Tabella 11. Reagenti e materiali forniti nel VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con num. di catalogo VS-SFR124 (444219).

5. Reagenti e strumenti necessari e non inclusi

Il seguente elenco include i materiali e gli strumenti richiesti per l'uso e che non sono inclusi nel VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Strumento per Real-time PCR: BD MAX™ System (Cod.: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Cod.:442828 o 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Cod.: 437519).
- Vortex.
- Micropipette (tra i 2 e i 1000 µL).
- Acqua priva di nucleasi.
- Punte con filtro.
- Guanti monouso privi di talco.

6. Condizioni di trasporto e conservazione

- I kit possono essere spediti e conservati a 2-40 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Dopo l'apertura delle confezioni in alluminio che contengono le provette di reazione, il prodotto può essere utilizzato fino a un massimo di 28 giorni.

7. Precauzioni per gli utenti

- Il prodotto è destinato all'uso esclusivamente da parte di utilizzatori professionali, come professionisti sanitari e tecnici di laboratorio, formati nell'impiego di tecniche di biologia molecolare.
- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Non utilizzare reagenti e/o materiali scaduti.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la scatola protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la confezione protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'interno della loro confezione il materiale essiccante non è presente o è rotto.
- Non rimuovere il materiale essiccante dalla confezione dei reagenti.
- Chiudere la confezione protettiva dei reagenti con la cerniera subito dopo ogni utilizzo. Rimuovere l'aria in eccesso dalle confezioni prima di sigillarle.
- Non utilizzare reagenti se il sigillo metallico è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti.
- Proteggere i reagenti dall'umidità. L'esposizione prolungata all'umidità può influire sulle prestazioni del prodotto.
- Tenere i componenti lontano dalla luce.
- Nel caso in cui vengano eseguiti altri test di PCR nella stessa area del laboratorio, assicurarsi che il VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, il kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3, i reagenti aggiuntivi richiesti per il test e il sistema BD MAX™ non siano contaminati. Evitare sempre la contaminazione dei reagenti con microbi e ribonucleasi (RNasi)/desossiribonucleasi (DNasi). Si consiglia l'uso di puntali per pipette di trasferimento positivi o resistenti agli aerosol e privi di RNasi/DNasi. Usare un nuovo puntale per ogni campione. È necessario cambiarsi i guanti prima di manipolare reagenti e cartucce (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Per evitare la contaminazione dell'ambiente da parte di amplicon, non disassemblare la BD MAX™ PCR Cartridge dopo l'uso. I sigilli della BD MAX™ PCR Cartridge sono progettati per prevenire la contaminazione.
- Progettare un flusso di lavoro unidirezionale. Deve iniziare nell'area di estrazione e poi spostarsi nell'area di amplificazione e rilevamento. Non riportare campioni, strumenti e reagenti nell'area in cui è stato eseguito il passaggio precedente.
- Rispettare le buone pratiche di laboratorio. Indossare abiti protettivi e utilizzare guanti monouso, occhialini e mascherina. Non mangiare, bere, fumare o applicare prodotti cosmetici all'interno dell'area di lavoro. Lavarsi le mani al termine del test.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi e/o a rischio biologico, così come i reagenti e i materiali che sono stati esposti ai campioni e devono essere gestiti nel rispetto delle normative di sicurezza

nazionali. Prendere le precauzioni necessarie durante la raccolta, il trasporto, la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento dei campioni.

- I campioni e i reagenti devono essere manipolati in una cappa di biosicurezza. Usare personal protective equipment (PPE) compatibili con le linee guida correnti per la manipolazione dei campioni potenzialmente infettivi. Smaltire i rifiuti in conformità ai regolamenti locali e nazionali.
- Si raccomanda una decontaminazione degli strumenti utilizzati abitualmente, soprattutto le micropipette e le superfici di lavoro.
- In conformità con il regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kit non richiede una scheda dati sulla sicurezza (Safety Data Sheet) dei materiali a causa della sua classificazione come non pericoloso per la salute e per l'ambiente, perché non contiene sostanze e/o miscele che soddisfano i criteri di classificazione dei rischi riportati nel Regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP) o presenti a concentrazioni superiori al valore definito nel regolamento sopra menzionato in base alla relativa dichiarazione.
- Consultare il manuale utente del BD MAX™ System per maggiori informazioni su avvertenze, precauzioni e procedure.

8. Procedura di test

8.1. Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni

Il VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stato testato su tamponi nasofaringei raccolti utilizzando il mezzo di trasporto sterile Vircell® o il mezzo di trasporto e conservazione sterile Virus (Biocomma®), e lo Universal Transport Medium, in base al campione. Altri tipi di campioni devono essere convalidati dall'utente.

La raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni devono rispettare le condizioni convalidate dall'utente. In generale, i tamponi respiratori devono essere raccolti ed etichettati adeguatamente con o senza mezzo di trasporto (in base alla tipologia di campione) ed esaminati il prima possibile per garantire la qualità del test. I campioni devono essere trasportati tra i 2 e gli 8 °C entro le prime 72 ore, nel rispetto delle normative locali e nazionali per il trasporto di materiale patogeno. Per i trasporti di lunga durata (oltre 72 ore), raccomandiamo una spedizione a ≤ -20 °C o a temperatura inferiore. Per effettuare il test, è consigliato l'utilizzo di campioni appena raccolti. I campioni possono essere conservati da 2 a 8 °C fino a un massimo di 72 ore oppure congelati a -20 °C o idealmente a -70 °C. Devono essere evitati cicli ripetuti di congelamento-scongelo per evitare il deterioramento dei campioni e degli acidi nucleici.

I campioni clinici devono essere raccolti, trasportati e conservati secondo le linee guida appropriate del laboratorio. Per i dettagli, consultare le linee guida CDC (linee guida per la raccolta dei campioni). Sito web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>, e linee guida IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94) and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. Preparazione del campione ed estrazione del DNA

Preparare il campione nel rispetto delle raccomandazioni presenti nelle istruzioni d'uso del kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3. Si prega di notare che altri tipi di campioni possono richiedere un pretrattamento. Le procedure di preparazione dell'estrazione per applicazioni specifiche devono essere sviluppate e convalidate dall'utente.

1. Pipettare 400-750 µL di campione nasofaringeo in una provetta di tampone campione del kit BD MAX™ ExK™ TNA-3 e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Effettuare una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con l'azionamento del BD MAX™ System.

8.3. Protocollo PCR

Nota: consultare il manuale utente del BD MAX™ System per istruzioni dettagliate.

8.3.1. Creare il programma di test di PCR per il VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: Se avete già creato il test per il VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, potete saltare il passaggio 8.3.1 e passare direttamente all'8.3.2.

- 1) Nella schermata "Run" (Esegui) del BD MAX™ System, selezionare la scheda "Test Editor" (Modifica test).
- 2) Cliccare sul pulsante "Create" (Crea).
- 3) Nella scheda "Basic Information" (Informazioni di base), all'interno della finestra "Test Name" (Nome test), nominare il vostro test: es. VIASURE Respiratory Virus Mix I.
- 4) Nel menu a tendina "Extraction Type" (Tipo di estrazione), selezionare "ExK TNA-3".
- 5) Nel menu a tendina "Master Mix Format" (Formato master mix), scegliere "Type 5" (Tipo 5).
 - a. Nota: il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE per BD MAX. In questo caso selezionare "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato master mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5).
- 6) In "Sample extraction parameters" (Parametri di estrazione campione) selezionare "User defined" (Definito dall'utente) e regolare il volume del campione a 950 µL.
- 7) In "Ct Calculation" (Calcolo Ct) selezionare "Call Ct at Threshold Crossing" (Chiamare Ct al superamento del limite).
- 8) Se si utilizza un software versione 5.00 o superiore e si dispone di provette snap-in di alluminio con codice a barre, in "Custom Barcodes" (Codici a barre personalizzati) scegliere la seguente configurazione:
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Codice a barre Snap-In 2): 1K (riferito alla provetta di reazione del *Respiratory Virus Mix I* reaction tube).
 - b. "Snap-In 3 Barcode" (Codice a barre Snap-In 3): 11 (per la provetta del tampone di reidratazione)
 - c. "Snap-In 4 Barcode" (Codice a barre Snap-In 4): un'altra provetta di reazione (sigillo diverso) se scegliete il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type

5) (MM liofilizzato concentrato Master Mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1).

9) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni di PCR) inserire i seguenti parametri: "Channel Settings" (Impostazioni canale), "Gains" (Guadagni) e "Threshold" (Limite) (Tabella 3).

a. Nota: il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE for BD MAX™. In questo caso "PCR Settings" (Impostazioni PCR) e "Test Steps" (Fasi del test) devono essere completate per entrambe le posizioni 2 (verde) e 4 (blu).

Channel (Canale)	Alias (Alias)	Gain (Guadagno)	Threshold (Soglia)	Ct Min (Ct min)	Ct Max (Ct max)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Influenza B	80	150	0	40
585/630 (ROX)	Influenza A	80	150	0	40
630/665 (Cy5)	RSV (A/B)	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	EIC	80	150	0	35

Tabella 12. "PCR settings" (Impostazioni di PCR).

Nota: come punto di partenza, si consiglia di impostare i valori soglia minimi sopraelencati per ciascun canale; tuttavia, le impostazioni finali devono essere stabilite dall'utente finale durante l'interpretazione dei risultati in modo da assicurarsi che le soglie rientrino nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza e che siano al di sopra di qualsiasi segnale di fondo. Il valore soglia per i diversi strumenti può variare a causa delle diverse intensità del segnale.

10) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni di PCR) inserire anche i seguenti parametri "Spectral Cross Talk" (Cross talk spettrale) (Tabella 4):

		False Receiving Channel (Canale di ricezione falso)					
		Channel (Canale)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canale di eccitazione)	475/520	-	4,0	0,0	0,0	0,0	
	530/565	1,0	-	0,0	0,0	0,0	
	585/630	0,0	0,0	-	1,0	0,0	
	630/665	0,0	0,0	3,0	-	18,0	
	680/715	0,0	0,0	0,0	1,5	-	

Tabella 13. Parametri "Spectral cross-talk" (Cross-talk spettrale).

11) Nella scheda "Test Steps" (Fasi test), inserire il protocollo PCR (Tabella 5).

Step Name (Nome fase)	Profile Type (Tipo profilo)	Cycles (Cicli)	Time (s) (Tempo (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Rilevazione)
Reverse transcription (Trascrizione inversa)	In attesa	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Denaturazione iniziale)	In attesa	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturazione e appaiamento/estensione (raccolta dati))	Temperatura 2	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

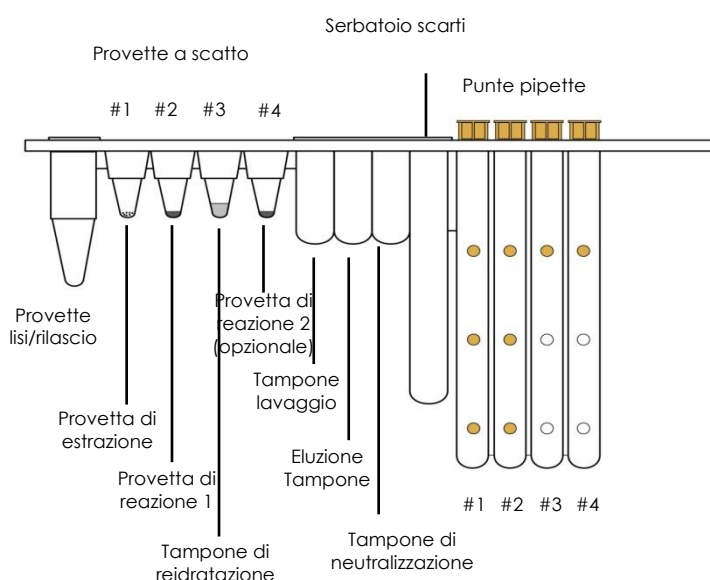
Tabella 14. Protocollo PCR.

12) Cliccare sul tasto "Save Test" (Salva test).

8.3.2. Preparazione della griglia BD MAX™

- 1) Per ogni campione da testare, rimuovere una Unitized Reagent Strip dal BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Picchiettare delicatamente ogni striscia su una superficie dura per assicurarsi che tutti i liquidi si trovino sul fondo delle provette, quindi posizzarle sulla griglia del BD MAX™ System.
- 2) Rimuovere il numero richiesto di provette di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sigillo bianco) dalla loro confezione protettiva. Posizionare la(e) provetta(e) di estrazione (sigillo bianco) nelle posizioni corrispondenti sulla striscia di TNA (posizione 1, codifica di colore bianco sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
- 3) Determinare e separare il numero appropriato di provette di reazione per il *Respiratory Virus Mix I* reaction tubes (sigillo 1K) e posizzarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 2, codifica di colore verde sulla griglia. Vedere Figura 1).
 - a. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
 - b. Per effettuare una corretta reidratazione, assicurarsi che il prodotto liofilizzato si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.
 - i. Nota: Se scegliete il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato Master Mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1), determinare e separare il numero appropriato di provette di reazione VIASURE (sigillo diverso) e posizzarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 4, codifica di colore blu sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
- 4) Rimuovere il numero richiesto di provette di tampone di reidratazione (sigillo 11) e posizzarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 3, nessuna codifica di colore sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
 - a. Per effettuare un trasferimento corretto, assicurarsi che il liquido si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il tampone si trovi in fondo alla provetta.

Figura 1. Striscia di reagente (TNA) BD MAX™ TNA del kit BD MAX™ ExK™ TNA-3.



8.3.3. Configurazione dello strumento BD MAX™

- 1) Selezionare la scheda "Work List" (Lista di lavoro) sulla schermata "Run" (Esegui) del software del BD MAX™ System nella versione v4.50A o superiore.
- 2) Nel menu a tendina "Test" selezionare *VIASURE Respiratory Virus Mix I* (se non è ancora stato creato, vedere paragrafo 8.3.1).
- 3) Selezionare il numero relativo al lotto del kit (si trova sulla confezione esterna del kit di estrazione utilizzato) dal menu a tendina (opzionale).
- 4) Inserire il numero identificativo della Sample Buffer Tube nella finestra "Sample tube" (Provetta campione) dalla "Work List" (Lista di lavoro), manualmente oppure scansionando il codice a barre.
- 5) Compilare il codice campione/paziente e/o la finestra "Accession" (Ingresso) nella "Work List" (Lista di lavoro) e cliccare sul pulsante "Save" (Salva). Continuare fino all'inserimento di tutte le Sample Buffer Tube. Assicurarsi che il codice campione/paziente e le Sample Buffer Tube corrispondano.
- 6) Posizionare la Sample Buffer Tube preparata sulle BD MAX™ Rack(s).
- 7) Caricare le griglie sul BD MAX™ System (la griglia A si trova sul lato sinistro del BD MAX™ System, la griglia B sul lato destro).
- 8) Posizionare il numero richiesto di BD MAX™ PCR Cartridges nel BD MAX™ System.
- 9) Chiudere la porta del BD MAX™ System.
- 10) Cliccare "Start Run" (Inizia operazione) per iniziare la procedura.

8.3.4. Report BD MAX™

- 1) Nel menu principale, cliccare sul pulsante "Results" (Risultati).
- 2) Cliccare due volte sul test in corso nella lista oppure premere il pulsante "View" (Vedi).
- 3) Cliccare su "Print" (Stampa), selezionare: "Run Details, Test Details and Plot..." (Dettagli operazione, dettagli test e grafico...)
- 4) Cliccare su "Print or Export button" (Stampa o esporta) nella schermata "Run Reports" (Esegui report).

9. Interpretazione dei risultati

Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, fare riferimento al manuale utente del BD MAX™ System.

L'analisi dei dati viene svolta dal software del sistema BD MAX™, sulla base delle istruzioni del produttore. Il software del sistema BD MAX™ riporta i valori di Ct e le curve di amplificazione per tutti i canali di rilevazione di ciascun campione testato nel seguente modo:

- Valore di Ct pari a 0: indica che il software non ha calcolato nessun valore di Ct nei limiti specificati (vedere Tabella 3). La curva di amplificazione del campione che presenta un valore di Ct pari a 0 deve essere controllata manualmente.

- Valore di Ct pari a -1: non si è verificato nessun processo di amplificazione che soddisfa i criteri di impostazione.

- Qualunque altro valore di Ct deve essere interpretato in correlazione con la curva di amplificazione e nel rispetto delle linee guida di interpretazione del campione riportate nella Tabella 6.

Controllare l'emissione del segnale di controllo interno per verificare il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. Inoltre, controllare che non sia presente nessun guasto al BD MAX™ System.

I risultati devono essere letti e analizzati utilizzando la seguente tabella:

SARS-CoV-2 (475/520)	Influenza B (530/565)	Influenza A (585/630)	RSV (A/B) (630/655)	Controllo interno endogeno (680/715)	Interpretazione
+	+	+	+	+/- ¹	RNA di SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A e RSV (A/B) rilevato ¹
-	+	+	+	+/- ¹	RNA di Influenza B, Influenza A e RSV (A/B) rilevato e RNA di SARS-CoV-2 non rilevato ¹
+	-	+	+	+/- ¹	RNA di SARS-CoV-2, Influenza A e RSV (A/B) rilevato e RNA di Influenza B non rilevato ¹
+	+	-	+	+/- ¹	RNA di SARS-CoV-2, Influenza B e RSV (A/B) rilevato e RNA di Influenza A non rilevato ¹
+	+	+	-	+/- ¹	RNA di SARS-CoV-2, Influenza B e Influenza A non rilevato e RNA di RSV (A/B) non rilevato ¹
+	+	-	-	+/- ¹	RNA di SARS-CoV-2 e Influenza B rilevato, RNA di Influenza A e RSV (A/B) non rilevato ¹
+	-	+	-	+/- ¹	RNA di SARS-CoV-2 e Influenza A rilevato e RNA di Influenza B e RSV (A/B) non rilevato ¹
+	-	-	+	+/- ¹	RNA di SARS-CoV-2 e RSV (A/B) rilevato e RNA di Influenza B e Influenza A non rilevato ¹
-	+	+	-	+/- ¹	RNA di Influenza B e Influenza A rilevato e RNA di SARS-CoV-2 e RSV (A/B) non rilevato ¹
-	+	-	+	+/- ¹	RNA di Influenza B e RSV (A/B) rilevato e RNA di SARS-CoV-2 e Influenza A e non rilevato ¹
-	-	+	+	+/- ¹	RNA di Influenza A, RSV (A/B) rilevato e RNA di SARS-CoV-2 e Influenza B non rilevato ¹
+	-	-	-	+/- ¹	RNA di SARS-CoV-2 rilevato ¹
-	+	-	-	+/- ¹	RNA di Influenza B rilevato ¹
-	-	+	-	+/- ¹	RNA di Influenza A rilevato ¹
-	-	-	+	+/- ¹	RNA di RSV rilevato ¹
-	-	-	-	+ ²	RNA di SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A e RSV (A/B) non rilevato ²
-	-	-	-	- ²	Un risultato non risolto (UNR) ottenuto in presenza di inibitori nella reazione PCR o quando si verifica un problema generale (non segnalato da un codice di errore) con le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione. ²
IND	IND	IND	IND	IND	Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel BD MAX™ System. Visualizzazione del risultato del test in caso di guasto dello strumento collegato ad un codice di errore.
INC	INC	INC	INC	INC	Risultato test incompleto (INC). Dovuto a guasto nel BD MAX™ System. Visualizzazione del risultato del test in caso di mancato completamento del test.

Tabella 15. Interpretazione del campione.

+: Curva di amplificazione presente.

-: Senza curva di amplificazione.

1 Un campione viene considerato positivo se il valore ottenuto di Ct è inferiore a 40. Il Controllo interno endogeno (EIC) può o può non mostrare un segnale di amplificazione. Il rilevamento dell'EIC a volte non è necessario a causa di un elevato numero di copie del bersaglio, che causa un'amplificazione preferenziale degli acidi nucleici specifici.

2 Un campione viene considerato negativo se non mostra un segnale di amplificazione nel sistema di rilevamento ma il controllo interno endogeno è positivo (Ct inferiore a 35). Un'inibizione della reazione di PCR può essere esclusa dall'amplificazione del controllo interno. In caso di risultati non risolti (UNR) con assenza di un segnale di controllo interno in un campione negativo, è raccomandabile ripetere il test seguendo queste indicazioni.

In caso di un risultato ambiguo continuo, si raccomanda di rileggere le istruzioni per l'uso e la procedura di estrazione usata dall'utente, di verificare la corretta esecuzione di ciascun passaggio del test PCR e di rivedere i parametri. Infine, si raccomanda di verificare la forma sigmoide della curva e l'intensità della fluorescenza.

NOTA: i nuovi campioni possono essere testati nella stessa operazione con campioni ripetuti.

I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.

10. Limiti del test

- I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.
- Nonostante questo test possa essere utilizzato con altri tipi di campioni, è stato convalidato con tamponi nasofaringei.
- Per prestazioni del test ottimali, il prodotto liofilizzato deve trovarsi in fondo alla provetta e non deve aderire alla parte superiore della provetta o del sigillo di alluminio. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.
- Se la miscela di reazione in formato stabilizzato, normalmente presente in fondo alla provetta, ha un aspetto diverso da quello solito (senza forma conica, non omogenea, più piccola/più grande e/o di colore differente dal biancastro) non altera la funzionalità del test.
- La qualità del test dipende dalla qualità del campione: gli acidi nucleici devono essere estratti in modo appropriato da campioni respiratori.
- Questo test è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi né indica il numero di microrganismi presenti.
- Possono essere rilevati livelli estremamente bassi al di sotto del limite di rilevamento, ma i risultati non possono essere riproducibili.
- Esiste la possibilità di falsi positivi a causa della contaminazione incrociata con SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A o RSV (A/B), o a campioni contenenti elevate concentrazioni di RNA bersaglio o alla contaminazione dovuta ai prodotti della PCR provenienti da reazioni precedenti.
- Le combinazioni specifiche di primer e sonda per il rilevamento dei geni *N* e *ORF1ab* del SARS-CoV-2, del gene *M1* dell'Influenza B, del gene *M1* dell'Influenza A e del gene *N* dell'RSV (tipi A e B) utilizzate in VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System non mostrano significative omologie combinate con il genoma umano, con la microflora umana o altri microrganismi respiratori, che potrebbero portare ad un falso positivo prevedibile.
- I risultati falsi negativi possono essere dovuti a diversi fattori e a combinazioni di essi; questi includono:

- Metodi di prelievo, trasporto, considerazione e/o manipolazione dei campioni in corretto.
 - Procedure di preparazione incorrette (inclusa l'estrazione di RNA).
 - Degradazione del RNA durante l'invio/la conservazione e/o la preparazione dei campioni.
 - Mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono influenzare il rilevamento di ceppi nuovi o sconosciuti di SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A o RSV (A/B).
 - Livelli di organismi nel campione al di sotto del limite di rilevamento o della soglia del test.
 - Presenza di inibitori della qPCR o di altri tipi di sostanze interferenti. Non è stato valutato l'impatto di vaccini, terapie antivirali, antibiotici, chemioterapici o farmaci immunosoppressori utilizzati per prevenire COVID-19, Influenza e RSV o utilizzati durante il trattamento dell'infezione.
 - Mancata aderenza alle istruzioni per l'uso e alla procedura per il test.
- Alcuni campioni possono non mostrare curve di amplificazione dell'*RNasi P* a causa del basso numero di cellule umane nel campione clinico originale. Un segnale negativo di IC non preclude la presenza di SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A o RSV (A/B) in un campione clinico.
 - Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di un virus vitale e non implica che questo virus sia infettivo o sia l'agente eziologico dei sintomi clinici. Tuttavia, un risultato positivo indica la presenza delle sequenze virali bersaglio.
 - Se i test diagnostici per altre malattie respiratorie risultano negativi e le informazioni epidemiologiche e la presentazione clinica del paziente suggeriscono la possibilità di un'infezione da SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A o RSV (A/B), deve essere valutata la possibilità di un risultato falso negativo e di testare nuovamente il paziente.
 - Un risultato negativo non preclude la presenza di RNA bersaglio in un campione clinico. Se l'osservazione clinica, l'anamnesi del paziente e le informazioni epidemiologiche suggeriscono un'infezione da SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A o RSV (A/B), deve essere valutata la possibilità di rivalutare un volume maggiore di campione.
 - È richiesto un nuovo test nel caso in cui si ottengano risultati non risolti, indeterminati o incompleti utilizzando il VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. I risultati non risolti possono essere dovuti alla presenza di inibitori nel campione o a una reidratazione non corretta della provetta di miscela di reazione liofilizzata. Un danno agli strumenti può comportare risultati indeterminati o incompleti.

11. Controllo di qualità

Il VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene un controllo interno endogeno (EIC) in ogni provetta di reazione che conferma il funzionamento corretto della tecnica.

12. Caratteristiche del test

12.1. Sensibilità e specificità clinica

Le prestazioni cliniche di VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono state testate utilizzando campioni clinici (tamponi nasofaringei) provenienti da pazienti con sospetto clinico di infezione da SARS-CoV-2, Influenza A/B e/o RSV (A/B). I risultati sono stati i seguenti:

	Sito	Tipo di campione	Flusso di lavoro	Target
1	CerTest Biotec S.L. in collaborazione con la Biobanca del Sistema de Salud de Aragón (BSSA) e il Dipartimento di Microbiologia e Parassitologia dell'Hospital Universitario Central de Asturias	Tamponi nasofaringei	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
				Influenza B
				Influenza A
				RSV (A/B)

Tabella 16. Sede, tipo di campione, flusso di lavoro e target.

I valori dei veri positivi e dei veri negativi, i valori dei falsi positivi e dei falsi negativi, la sensibilità e la specificità di VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono stati calcolati in relazione a ciascun test di confronto come mostrato nella seguente tabella:

Sito	Test di confronto	Target	TP	TN	FP	FN	Sensibilità	Specificità
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) o VIASURE SARS-CoV-2 Real time PCR Detection Kit, + conseguente sequenziamento dell'intero genoma	SARS-CoV-2	127	625	1	3	0,977 (0,934-0,995)	0,998 (0,991-1)
	Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic acid test da utilizzare con il cobas® Liat® System (cobas® Influenza A/B & RSV)	Influenza B	18	738	0	0	1 (0,815-1)	1 (0,995-1)
		Influenza A	49	704	1	2	0,961 (0,865-0,995)	0,999 (0,992-1)
		RSV (A/B)	50	706	0	0	1 (0,929-1)	1 (0,995-1)

Tabella 17. Valori dei TP (veri positivi) e dei TN (veri negativi), i valori di FP (falsi positivi) e di FN (falsi negativi), sensibilità e specificità di VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Il risultato mostra un accordo nella rilevazione di SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A ed RSV (A/B) utilizzando il VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilità analitica

I risultati del limite di rilevamento (LoD) di VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System su campioni nasofaringei con tasso positivo $\geq 95\%$ sono i seguenti:

- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ha un limite di rilevamento (LoD) di 5,01 unità internazionali (IU)/ μ l per SARS-CoV-2.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ha un limite di rilevamento (LoD) di $1,8 \times 10^2$ CEID₅₀ (dose infettante mediana di un embrione di pollo)/ml per l'Influenza B.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ha un limite di rilevamento (LoD) di $10^{0.5}$ TCID₅₀ (dose infettante mediana di una coltura tissutale)/ml per l'Influenza A.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ha un limite di rilevamento (LoD) di 4 copie di genomi/ μ l per RSVA e RSVB.

Nota: Il limite di rilevamento è stato calcolato utilizzando un volume di campione di 400 μ l.

Di seguito vengono mostrati alcuni esempi di diagrammi di amplificazione risultati da un test sul BD MAX™ System.

Figura 2. Serie di diluizioni di SARS-CoV-2 (5×10^5 - 5×10^0 copie per reazione) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 475/520 (FAM)).

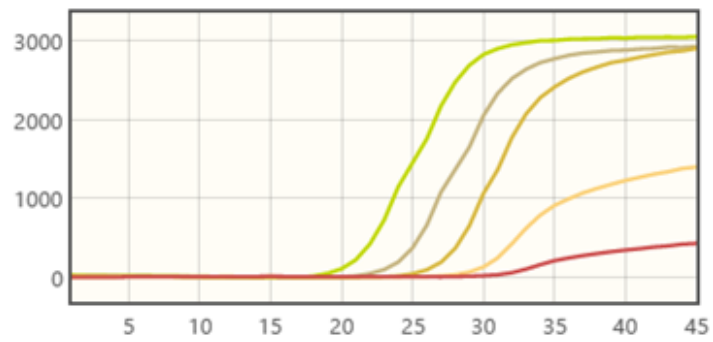


Figura 3. Serie di diluizioni dell'Influenza B (5×10^5 - 5×10^0 copie per reazione) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 530/565 (HEX)).

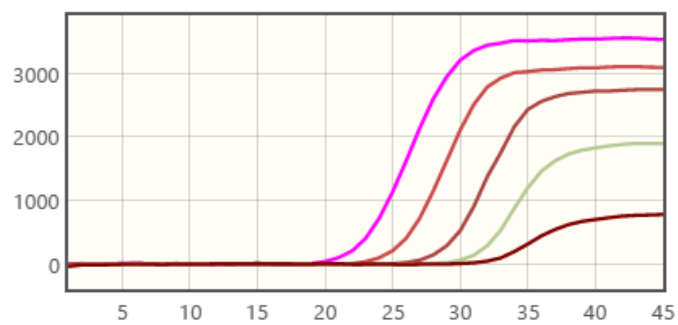


Figura 4. Serie di diluizioni dell'Influenza A (5×10^5 - 5×10^0 copie per reazione) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 585/630 (ROX)).

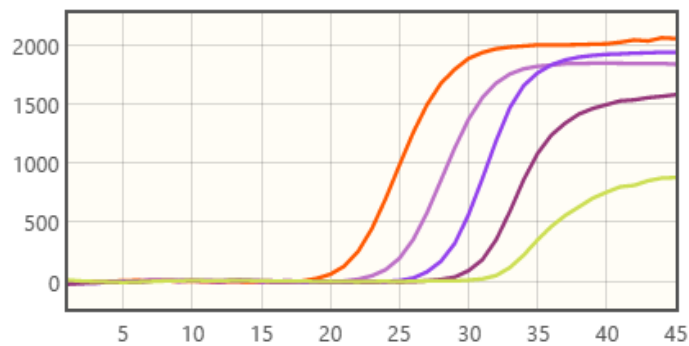


Figura 5. Serie di diluizioni di RSVA (5×10^5 - 5×10^0 copie di genoma per reazione) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 630/665 (CY5)).

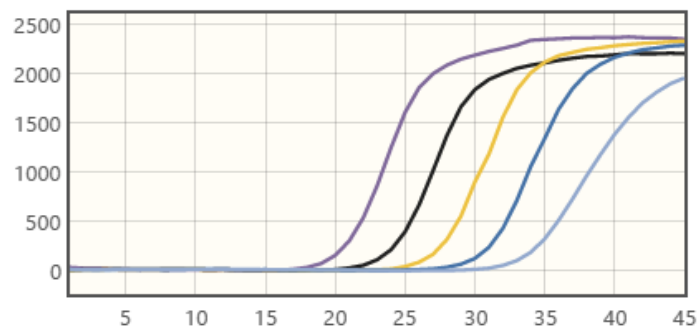
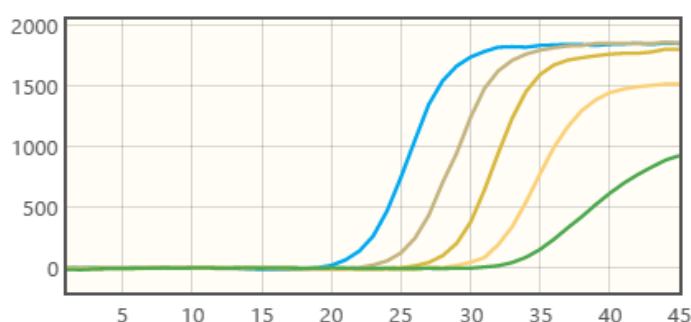


Figura 6. Serie di diluizioni di RSVB (5×10^5 - 5×10^0 copie di genoma per reazione) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 630/665 (CY5)).

12.3. Specificità analitica

La specificità del test *Respiratory Virus Mix I* è stata confermata testando un pannello formato da diversi microrganismi che rappresentano i più comuni patogeni respiratori. Non è stata rilevata alcuna reattività crociata tra i seguenti microrganismi testati:

Test di reattività crociata					
Adenovirus umano tipi 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 e B3	-	Mycoplasma pneumoniae	-
Bocavirus	-	Enterovirus Echovirus 30	-	Mycobacterium tuberculosis	-
Bordetella bronchiseptica	-	Enterovirus 68, 71	-	Virus parainfluenzali umani 1, 2, 3 e 4	-
Bordetella holmesii	-	Haemophilus influenzae MinnA	-	Pneumocystis jirovecii tipo A1 e g885652	-
Bordetella parapertussis	-	Legionella bozemanii	-	Rhinovirus umano	-
Bordetella pertussis	-	Legionella dumoffii	-	SARS Coronavirus ceppo Frankfurt 1	-
Chlamydia caviae	-	Legionella longbeachae	-	Staphylococcus aureus	-
Chlamydia psittaci genotipo A e C	-	Legionella micdadei	-	Staphylococcus epidermidis	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Legionella pneumophila	-	Streptococcus pneumoniae	-
Coronavirus umani 229E, OC43, NL63 e HKU1	-	Metapneumovirus umano A e B	-	Streptococcus pyogenes	-
Coronavirus MERS	-	Moraxella catarrhalis	-	Streptococcus salivarius	-

Tabella 18. Microrganismi patogeni di riferimento utilizzati in questo studio.

12.4. Reattività analitica

La reattività di VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per il **SARS-CoV-2** è stata valutata sulla base dell'RNA estratto dal 2019-nCoV umano ceppo BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, 2019-nCoV umano ceppo 2019-nCoV/Italy-INM11, controlli dell'RNA sintetico per la variante MT007544.1 (SARSCoV2 isolato Australia/VIC01/2020), MN908947.3 variante (SARS-CoV-2 isolato Wuhan-Hu-1), variante alpha (B.1.1.7 England/MILK-9E05B3/2020), variante Beta (B.1.351 South Africa/KRISP-EC-K005299/2020), variante Gamma (P.1 Japan (Brazil) /IC-0564/2021) e variante Kappa (B.1.617.1 India/CT-ILSGS00361/2021), e SARSCoV-2 inattivato con il calore ceppo 2019nCoV/USAWA1/2020 (ATCC® VR1986HK™), e lisato cellulare irradiato da 2019-nCoV/USA-

WA1/2020, e lisati cellulari liofilizzati da BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER, BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 e BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER, mostrando risultati positivi.

La reattività di VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per l'**Influenza B** è stata valutata sulla base dell'RNA estratto dai seguenti ceppi: B/Phuket/3073/2013 virus, B/Brisbane/60/2008 virus, Influenza B/Florida/04/06 virus, B/Pennsylvania/7/2007 (Yamagata Lineage), B/Santiago/4364/2007 (Yamagata Lineage) virus, B/Brisbane/3/2007 (Yamagata Lineage) virus, B/Pennsylvania/5/2007 (Victoria Lineage), B/Victoria/304/2006 (Victoria Lineage) virus e B/Bangladesh/3333/2007 (Yamagata Lineage) virus mostrano risultati positivi.

La reattività di VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per l'**Influenza A** è stata valutata sulla base dell'RNA estratto dai seguenti ceppi: A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016(H5N8) virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1 pdm09) virus, A/California/7/2009 (H1N1) virus, A/California/7/2009 (H1N1pdm09) virus, A/South Australia/55/2014 virus, Switzerland/9715293/2013 (H3N2) IVR-175 virus, A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 virus, A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B virus, Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) virus, A/Brisbane/59/2007 (H1N1) virus, A/South Dakota/6/2007 (H1N1) virus, A/Hawaii/31/2007 (H1N1) virus, A/Qatar/1123/2007 (H1N1) virus, A/Cambodia/0371/2007 (H1N1) virus, Influenza A Virus, A/Brisbane/10/2007 (H3N2) virus, Influenza A Virus, A/Taiwan/760/2007 (H3N2) virus, Influenza A Virus, A/Texas/71/2007 (H3N2) virus, A/Brisbane/10/2007 (H3N2) IVR-147 virus, A/Brisbane/59/2007 (H1N1) IVR-148 virus, A/South Dakota/6/2007 (H1N1) X-173 virus, A/California/07/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/California/08/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/Mexico/4108/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/California/07/2009 (H1N1 pdm09) NYMC X-179A virus, A/Victoria/2570/2019 IVR-215 virus e A/Cambodia/e0826360/2020 IVR-224 virus mostrano risultati positivi.











La reattività di VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per l'**RSV** è stata valutata sulla base dell'RNA estratto dal virus respiratorio sinciziale A (ceppo A-2) e dal virus respiratorio sinciziale B (ceppo 9320), mostrando risultati positivi.

Bibliography/ Bibliografia

1. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMod2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1>
4. Chen N. et al. Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
5. Lv D.F. et al. Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* 2020; 506: 172-175.
6. World Health Organization. Clinical management of COVID-19 disease" Interim guidance 27 May 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19>
7. Lu R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
8. Rothe C. et al. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMc2001468.
9. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Symptoms of Coronavirus. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>
10. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Older Adults. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html>
11. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>
12. Yan Y et al. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology* 2020; 30(3):e2106.
13. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primerprobes.pdf>
14. Chu D.K.W. et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry* 2020;66(4): 549-555.
15. Corman V.M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *European communicable disease bulletin* 2020;25(3).
16. European Centre for Disease Prevention and Control. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update – 12 March 2020. Stockholm: ECDC; 2020. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf>
17. Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human coronaviruses: a review of virus–host interactions. *Diseases*, 4(3), 26.
18. McBride R. et al. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014; 6(8):2991-3018.
19. Sheikh A. et al. Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design. *Journal of Virological Methods* 2020; 277:113806.

20. World Health Organization. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19: interim guidance Interim guidance. 21 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testingstrategy-recommendations-for-covid-19-interim-guidance>
21. G. Neumann et al. Transmission of Influenza A viruses. *Virology* 2015; 234-246.
22. Y. Yang et al. Simultaneous typing and HA/NA subtyping of influenza A and B viruses including the pandemic influenza A/H1N1 2009 by multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2010; 167(1): 37-44.
23. R.L. Kuo et al. Influenza A/B virus detection and influenza A virus subtyping with emphasis on the novel H7N9 virus by using multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2014; 208:41-46.
24. World Health Organization. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus—update. Available from: https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/
25. S. Subhash Bawage et al. Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Advances in Virology* 2013.
26. French, et al. Risk of nosocomial respiratory syncytial virus infection and effectiveness of control measures to prevent transmission events: a systematic review. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2016.
27. X. Yu et al. Human respiratory syncytial virus in children with lower respiratory tract infections or influenza-like illness and its co-infection characteristics with viruses and atypical bacteria in Hangzhou, China. *Journal of Clinical Virology* 2015; 69:1-6.
28. N. Mazur et al. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. *The Lancet Respiratory Medicine* 2015; 3: 888-900.
29. F. de-Paris et al. Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *Journal of Virological Methods* 2012; 186(1-2): 189-192.
30. A. Hu et al. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(1): 149-154.
31. M. Hindiyeh et al. Evaluation of Simplexa Flu A/B & RSV for direct detection of influenza viruses (A and B) and respiratory syncytial virus in patient respiratory samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(7): 2421-2424.

Symbols for IVD components and reagents/ Simboli per reagenti e componenti IVD

 <p><i>In vitro</i> diagnostic device Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i>.</p>	 <p>Keep dry Mantenere asciutto</p>	 <p>Use by Usare entro</p>	 <p>Manufacturer Produttore</p>	 <p>Batch code (Lot) Codice lotto</p>
 <p>Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso</p>	 <p>Temperature limitation Limitazione temperatura</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Contains sufficient for <n> test</p>	 <p>Unique Device Identification Unique Device Identification</p>	 <p>Catalognumber Catalognumber</p>

Trademarks

BD MAX™ is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.

Change Control / Controllo modifiche		
Version No. / N. versione	Changes / Modifiche	Date / Data
00	Original version / Versione originale.	25/07/2022
01	"Spectral Cross Talk" values of table 4 have been updated / I valori della tabella 4 "Spectral Cross Talk" sono stati aggiornati	02/08/2022

Table A 2. Control change table/ Tabella di controllo delle modifiche.

Revision: 2nd August 2022.

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev02