

Real Time PCR Detection Kit

Respiratory Virus Extended Mix for BD MAX™ System
Istruzioni per l'uso

CE IVD
2797

Le presenti istruzioni per l'uso si applicano ai seguenti riferimenti:

PRODOTTO	CODICE
VIASURE <i>Respiratory Virus Extended Mix</i> Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444221

Tabella A1. Codice del prodotto da usare con BD MAX™ System.

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

BG За да изтеглите IFUS на други езици, моля, отидете на **certest.es/viasure/labeling**. След това следвайте инструкциите, за да получите достъп до необходимия ви език. Ако имате нужда от допълнителна информация, моля, свържете се с: viasure@certest.es.

CS Chcete-li si stáhnout IFUS v jiných jazycích, přejděte na stránku **certest.es/viasure/labeling**. Jakmile se tam dostanete, postupujte podle pokynů pro přístup k požadovanému jazyku. Pokud potřebujete další informace, kontaktujte prosím: viasure@certest.es.

DA Hvis du vil downloade IFUS på andre sprog, kan du gå til **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, kan 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.

EL Για να κατεβάσετε το IFUS σε άλλες γλώσσες, μεταβείτε στη διεύθυνση **certest.es/viasure/labeling**. Μόλις φτάσετε εκεί, ακολουθήστε τις οδηγίες για να αποκτήσετε πρόσβαση στη γλώσσα που χρειάζεστε. Εάν χρειάζεστε πρόσθετες πληροφορίες, επικοινωνήστε με τη διεύθυνση: 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.

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.

HR Za preuzimanje IFUS-a s drugih jezika unesite **certest.es/viasure/labeling**. Kada ste tamo, slijedite upute za pristup jeziku koji vam je potreban. Ako trebate dodatne informacije, obratite se na: viasure@certest.es.

HU Az IFUS más nyelveken történő letöltéséhez kérjük, látogasson el a **certest.es/viasure/labeling** weboldalra. Ha ott van, kövesse az utasításokat a kívánt nyelv eléréséhez. Ha további információra van szüksége, kérjük, forduljon a következő címre: 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.

LT Norėdami atsisiųsti IFUS kitomis kalbomis, eikite į **certest.es/viasure/labeling**. Ten atlikite nurodymus, kad pasiiektumėte reikiamą kalbą. Jei reikia papildomos informacijos, kreipkitės adresu: viasure@certest.es.

LV Lai lejupielādētu IFUS citās valodās, lūdzu, apmeklējiet **certest.es/viasure/labeling**. Pēc tam izpildiet norādījumus, lai piekļūtu vajadzīgajai valodai. Ja nepieciešama papildu informācija, lūdzu, sazinieties ar: viasure@certest.es.

NB For å laste ned IFUS fra andre språk, gå inn på **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, kan du følge instruksjonene for å få tilgang til det språket du trenger. Hvis du trenger ytterligere informasjon, kan du kontakte: 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.

RO Pentru a descărca IFUS în alte limbi, vă rugăm să accesați **certest.es/viasure/labeling**. Accesat site-ul, urmați instrucțiunile pentru a selecta limba necesară. Pentru informații suplimentare, contactați: 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, vänligen kontakta: viasure@certest.es.

SK Ak si chcete stiahnuť IFUS v iných jazykoch, prejdite na stránku **certest.es/viasure/labeling**. Keď sa tam dostanete, postupujte podľa pokynov a získajte prístup k požadovanému jazyku. Ak potrebujete ďalšie informácie, obráťte sa na: viasure@certest.es.

TR IFU's'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.

FI Lataa suomeksi turvallinen käyttöopas osoitteesta **certest.es/viasure/labeling**. Kun olet siellä, seuraa ohjeita. Jos tarvitset lisätietoja, ota yhteyttä: viasure@certest.es.

Se la propria lingua non è presente nell'elenco, consultare il sito web **certest.es/viasure/labeling**. Se la propria lingua non è presente sul sito web, contattare viasure@certest.es.

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

Sommario

1.	Scopo previsto	6
2.	Introduzione e spiegazione	6
3.	Principio della procedura	9
4.	Reagenti forniti	10
5.	Reagenti e strumenti necessari e non inclusi	11
6.	Condizioni di trasporto, conservazione e utilizzo	11
7.	Precauzioni per gli utilizzatori	12
8.	Procedura di test	14
8.1.	Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni	14
8.2.	Preparazione del campione ed estrazione del NA	16
8.3.	Protocollo PCR	16
8.3.1.	Creazione del programma di test PCR per VIASURE <i>Respiratory Virus Extended Mix</i> Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	16
8.3.2.	Preparazione della griglia BD MAX™	22
8.3.3.	Configurazione dello strumento BD MAX™	23
8.3.4.	Report dei risultati di BD MAX™	24
9.	Interpretazione dei risultati	25
10.	Limiti del test	29
11.	Controllo di qualità	31
12.	Caratteristiche di prestazione analitica	31
12.1.	Linearità analitica	31
12.2.	Sensibilità analitica. Limite di rivelabilità (LoD)	34
12.3.	Intervallo di misurazione	35
12.4.	Esattezza	35
12.4.1.	Affidabilità (Veridicità)	35
12.4.2.	Precisione	42
12.5.	Trascinamento	46
12.6.	Tasso di fallimento dell'intero sistema	47

12.7. Specificità analitica e reattività analitica	47
12.7.1. Specificità analitica	47
12.7.2. Reattività analitica	53
12.8. Tracciabilità metrologica	56
13. Caratteristiche di prestazione clinica	57
Bibliografia.....	59
Simboli per reagenti e componenti IVD	61
Marchi commerciali.....	61

ITALIANO

1. Scopo previsto

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è un test RT-qPCR automatizzato progettato per il rilevamento qualitativo simultaneo di RNA/DNA di SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipi A e B), parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4), coronavirus umano (229E, NL63, HKU1 e OC43), metapneumovirus e adenovirus in tamponi nasofaringei di pazienti sospettati di infezione respiratoria dal loro professionista sanitario (HCP). L'uso previsto di questo test è quello di facilitare la diagnosi di infezione con i microorganismi succitati in combinazione con i segni clinici e i sintomi del paziente e/o i fattori di rischio epidemiologico. I risultati positivi indicano la presenza di un target di acidi nucleici (NA), ma non escludono la presenza di altri patogeni non rilevati dal test. I risultati negativi non escludono la presenza dei target di NA e non devono essere usati come unica base per il trattamento o per altre decisioni riguardanti la gestione del paziente. Questo test utilizza BD MAX™ System per l'estrazione automatizzata di RNA/DNA e la successiva RT-qPCR, avvalendosi dei reagenti forniti in combinazione con i reagenti universali e i materiali monouso per BD MAX™ System. L'RNA/DNA viene estratto dai campioni. Il DNA complementare (cDNA) viene sintetizzato, quindi DNA/cDNA vengono amplificati mediante RT-qPCR e rilevati utilizzando specifici primer e sonde marcate con una molecola fluorescente specifiche per SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipi A e B), parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4), coronavirus umano (229E, NL63, HKU1 e OC43), metapneumovirus e adenovirus.

Il prodotto deve essere utilizzato da personale di laboratorio clinico qualificato e addestrato, con una specifica formazione sulle tecniche di PCR in tempo reale e le procedure diagnostiche *in vitro*; la formazione deve includere anche lo strumento di PCR in tempo reale (termociclatore) e il sistema di estrazione dell'acido nucleico.

2. Introduzione e spiegazione

Il Coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave, comunemente noto come SARS-CoV-2, è il virus respiratorio emerso alla fine del 2019 responsabile della malattia COVID-19, che è stata successivamente caratterizzata come pandemia globale dall'OMS (Fernández-Pérez et al., 2021; Hu et al., 2021; WHO | World Health Organization, 2023a). Questo nuovo coronavirus è un virus a RNA a singolo filamento che è stato incluso nella famiglia *Coronaviridae*, genere beta (Fernández-Pérez et al., 2021). L'infezione da SARS-CoV-2 può colpire sia gli adulti che i bambini, sebbene le persone di età superiore ai 60 anni e coloro che presentano patologie preesistenti siano più inclini a sviluppare una forma più grave di COVID-19 (WHO | World Health Organization, 2023a). L'infezione può essere asintomatica o dare origine a diversi sintomi sia di basso che di alto livello di intensità e gravità, molto simili a quelli dell'influenza (CDC |, 2023; Safiabadi Tali et al., 2021).

L'influenza è l'infezione respiratoria acuta causata dal virus Influenza, che colpisce le vie respiratorie e si può incontrare in circolazione in tutto il mondo (Uyeki et al., 2022; WHO | World Health Organization, 2023b). L'influenza stagionale, in particolare, è quella scatenata dai virus Influenza A e B stagionali, entrambi responsabili delle epidemie stagionali che si verificano normalmente nei periodi invernali nei climi temperati e durante tutto l'anno nelle aree tropicali (Tyrrell et al., 2021; Uyeki et al., 2022; WHO | World Health Organization, 2023b). I virus dell'influenza, parte della famiglia *Orthomyxoviridae*, sono virus a RNA a singolo filamento di otto segmenti a senso negativo che codificano 12 proteine virali (Krammer et al., 2018; Uyeki et al., 2022). Il pericapside virale, derivato dalla membrana plasmatica dell'ospite, è formato da un doppio strato lipidico contenente le proteine transmembrana emoaagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA), la nucleoproteina virale (NP), la proteina di matrice (M1) e la proteina di membrana (M2) (Krammer et al., 2018).

Il virus respiratorio sinciziale (RSV) è un altro virus respiratorio e stagionale che colpisce il tratto respiratorio inferiore in tutte le fasce d'età (WHO | World Health Organization, n.d.). Questo virus a RNA a singolo filamento non segmentato a senso negativo, membro della famiglia *Pneumoviridae*, è noto per colpire principalmente i bambini piccoli di età inferiore ai 2 anni, ma può anche interessare in modo grave gli adulti di età superiore ai 65 anni e/o le persone immunocompromesse o con specifiche comorbidità (Abu-Raya et al., 2023; Bergeron & Tripp, 2021; WHO | World Health Organization, n.d.).

La diagnosi delle suddette malattie respiratorie è difficile, perché in genere sono presenti sintomi comuni (Uyeki et al., 2022). Pertanto, la diagnosi accurata è fondamentale non solo per conoscere la causa della malattia, ma anche per anticipare le ondate epidemiche/pandemiche e per ridurre l'impatto collaterale sui sistemi sanitari ed economici (Safiabadi Tali et al., 2021; Uyeki et al., 2022). Sono disponibili molti tipi di test diagnostici (diagnostica nel punto di assistenza (Point-of-care) o rilevamento rapido dell'antigene); tuttavia, la RT-PCR è più sensibile e specifica, e consente il rilevamento combinato di molti virus respiratori circolanti contemporaneamente, riducendo di fatto i tempi di diagnosi (Uyeki et al., 2022).

Alle malattie del tratto respiratorio inferiore sono da addurre circa quattro milioni di decessi all'anno a livello mondiale. Un'ampia varietà di virus può esserne responsabile, tra questi i coronavirus, che appartengono alla famiglia *Coronaviridae* (Friedman et al., 2018). Si tratta di virus a distribuzione globale di grandi dimensioni dotati di pericapside che contengono un genoma a RNA a singolo filamento di polarità positiva (Lim et al., 2016; Zeng et al., 2018). Sono direttamente correlati a malattie del tratto respiratorio, dell'apparato gastrointestinale e del sistema nervoso centrale. I coronavirus si dividono in tre sierotipi o gruppi: i gruppi 1 e 2, che si riferiscono ai coronavirus dei mammiferi; e il gruppo 3, costituito dai coronavirus aviari. I coronavirus umani più comuni sono i ceppi HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1 (Zeng et al., 2018). I coronavirus umani (HCoV) sono difficili da rilevare con i comuni metodi di diagnosi, perché vengono normalmente rilevati insieme ad altri virus respiratori, come l'HRSV o i virus dell'influenza (Gaunt et al., 2010). Pertanto, grazie alla sua specificità, la PCR in tempo reale è uno dei metodi preferiti per diagnosticare i coronavirus. Nello specifico, la PCR in tempo reale che ha come target il gene *N* per i ceppi 229E, OC43 e NL63, oltre al gene *rep* per il ceppo HKU1.

I virus della parainfluenza (PIV o HPIV nell'uomo) fanno parte della famiglia *Paramyxoviridae* e sono classificati geneticamente e antigenicamente in quattro tipi. Questi virus possono causare infezioni respiratorie nei neonati, nei bambini e negli adulti, con vari tipi di infezione e sintomi specifici a seconda del tipo di virus. Sia HPIV-1, che si riscontra con maggiore frequenza nei bambini, che HPIV-2 causano malattie respiratorie delle vie aeree superiori e inferiori, come raffreddori e croup. HPIV-3 è associato più spesso a patologie respiratorie delle vie aeree inferiori, come bronchiolite, bronchite e polmonite. HPIV-4 è riconosciuto con minor frequenza, ma può comunque causare malattie respiratorie da lievi a severe (Henrickson, 2003). I virus della parainfluenza presentano un pericapside di dimensioni medie e i loro genomi sono organizzati su un singolo filamento di RNA a senso negativo che codifica almeno sei proteine strutturali comuni. Tali virus presentano due glicoproteine di membrana: la proteina HN (emoagglutinina-neuraminidasi), che mostra sia attività di emoagglutinazione che di emoadsorbimento, e la proteina di fusione F (Henrickson, 2003).

La coltura virale in combinazione con l'immunofluorescenza è il metodo tradizionale per la diagnosi, ma richiede molto tempo (Templeton et al., 2004). I test di rilevamento dell'antigene sono ampiamente utilizzati, ma sono meno sensibili e specifici rispetto ad altri strumenti diagnostici come i test di PCR in tempo reale (Jansen et al., 2011; Templeton et al., 2004), attualmente considerati tra i metodi migliori da adottare.

Gli adenovirus appartengono alla famiglia *Adenoviridae*, che sono virus a doppio filamento (dsDNA) non dotati di pericapside (Datta, 2023; Ison & Hayden, 2016). Esistono oltre 50 sierotipi di adenovirus umani immunologicamente distinti (Lynch & Kajon, 2016) classificati in 7 specie (da Adenovirus-A ad Adenovirus-G), che possono causare infezioni nell'uomo, dalle malattie respiratorie (Adenovirus-E, C e alcuni Adenovirus-B) alle infezioni del tratto digerente (principalmente Adenovirus-A ed F), del tratto urinario (altri Adenovirus-B) e congiuntivite (Adenovirus-D) (Buckwalter et al., 2012; Datta, 2023). La trasmissione può avvenire per inalazione di goccioline aerosolizzate, inoculo congiuntivale diretto, diffusione oro-fecale o esposizione a tessuti o sangue infetti (Ison & Hayden, 2016).

I metapneumovirus umani appartengono alla famiglia *Paramyxoviridae* (Schuster & Williams, 2013) e sono un'importante causa di infezione respiratoria del tratto superiore e inferiore. Il metapneumovirus è un virus a RNA con pericapside, a singolo filamento e a senso negativo. I sintomi clinici del metapneumovirus includono tosse, febbre, congestione nasale e mancanza di respiro e possono evolvere in bronchiolite o polmonite (Uddin & Thomas, 2020). Il metapneumovirus si trasmette principalmente attraverso goccioline infettive trasportate dall'aria ed è stato segnalato come il secondo virus riscontrato più di frequente nelle infezioni respiratorie, con i bambini di età inferiore ai cinque anni che risultano i più suscettibili all'infezione (Schuster & Williams, 2013).

La diagnosi può essere problematica perché esiste un'ampia gamma di patogeni che può causare infezioni respiratorie acute caratterizzate da sintomi clinici simili. Sono stati inizialmente identificati mediante coltura cellulare, ma la diagnosi con tale procedura richiede molto tempo fino allo sviluppo dell'effetto citopatico. I test sierologici possono essere utili nelle indagini epidemiologiche, ma hanno un valore pratico limitato nei

singoli pazienti (Datta, 2023; Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016; Schuster & Williams, 2013). Pertanto, la PCR in tempo reale (RT-PCR) è attualmente il metodo utilizzato per l'identificazione di adenovirus e metapneumovirus, grazie all'elevata sensibilità e specificità.

3. Principio della procedura

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è concepito per il rilevamento qualitativo simultaneo di acido nucleico da SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A, RSV (tipi A e B), parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4), coronavirus umano (229E, NL63, HKU1 e OC43), metapneumovirus e adenovirus in tamponi nasofaringei. Il rilevamento si esegue con un test RT-qPCR one-step, in cui la trascrizione inversa e la successiva amplificazione della specifica sequenza target avvengono nel medesimo pozzetto di reazione. L'RNA target isolato viene trascritto, generando DNA complementare tramite la trascrittasi inversa. Una volta sintetizzato il cDNA o isolato il DNA, l'identificazione di questi microrganismi viene effettuata mediante l'amplificazione di una regione conservata dei geni *N* e *ORF1ab* di SARS-CoV-2, del gene *M* (proteina di matrice (M1)) di Influenza A/B, del gene *HA* di Influenza A sottotipo H1N1, del gene *N* di RSV (tipi A e B), del gene *HN* di parainfluenza (tipi 1, 2 e 3), del gene *F* di parainfluenza (tipo 4), del gene *N* di coronavirus (229E, NL63, HKU1 e OC43), del gene *F* di metapneumovirus e del gene *hexon* di adenovirus, utilizzando primer specifici e sonde marcate a fluorescenza.

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System si basa sull'attività esonucleasica 5' della 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'amplificazione del segnale fluorescente che è proporzionale alla quantità di template target. Questa fluorescenza viene misurata su BD MAX™ System.

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* 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 (sonde/primer specifici, dNTPs, tampone, polimerasi e trascrittasi inversa) in un formato stabilizzato¹, oltre a un **controllo interno endogeno (Endogenous Internal Control, EIC)** (gene *RNAse P* umano) per controllare l'integrità del campione, monitorare il processo di estrazione e/o escludere l'inibizione dell'attività della polimerasi. 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.

¹Si prega di notare che i termini "stabilizzato" e "liofilizzato" sono utilizzati in modo identico e come sinonimi in tutto il documento.

Target	Canale	Gene
<i>Respiratory Virus Mix I</i>	SARS-CoV-2	Gene <i>Ne ORF1ab</i>
	Influenza B	Gene <i>M1</i>
	Influenza A	Geni <i>M1</i> e <i>HA</i>
	RSV (A/B)	Gene <i>N</i>
	Controllo interno endogeno (EIC)	Gene umano <i>RNase P</i>
<i>Respiratory Virus Mix II</i>	Parainfluenza (tipi 1, 2 e 3)	Gene <i>HN</i>
	Parainfluenza (tipo 4)	Gene <i>F</i>
	Coronavirus (229E, NL63, HKU1 e OC43)	Gene <i>N</i>
	Metapneumovirus	Gene <i>F</i>
	Adenovirus	Gene <i>hexon</i>
	Controllo interno endogeno (EIC)	Gene umano <i>RNase P</i>

Tabella 1. Target, canale e geni.

4. Reagenti forniti

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

Reagente/Materiale	Descrizione	Intervallo di concentrazione	Codice a barre	Quantità
<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube	Lioprotettori e stabilizzatori	±6 g/100 mL*	Sigillo 1K	2 confezioni da 12 provette trasparenti
	Nucleotidi trifosfato (dNTPs)	±1 mM*		
	Primer e sonde	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimi	10-100 U/reaz.*		
<i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube	Lioprotettori e stabilizzatori	±6 g/100 mL*	Sigillo 1M	2 confezioni da 12 provette trasparenti
	Nucleotidi trifosfato (dNTPs)	±1 mM*		
	Primer e sonde	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimi	10-100 U/reaz.*		
Rehydration Buffer tube	Miscela di soluzione fisiologica	±13 mM	Sigillo 11	1 confezione da 24 provette trasparenti
	Tampone (TRIS, pH)	±67 mM		

Tabella 2. Reagenti e materiali forniti nel VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con Cat. N. 444221.

*Per i componenti in formato stabilizzato, l'intervallo di concentrazione è inteso post-reidratazione.

5. Reagenti e strumenti necessari e non inclusi

L'elenco che segue include i materiali necessari per l'uso ma non inclusi nel VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Real Time PCR instrument: BD MAX™ System (Cod.: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Cod.: 442827 o 442828).
- 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.

Opzionale:

- I materiali del controllo esterno possono essere utilizzati nell'ambito della procedura di controllo di qualità del test. I materiali di controllo disponibili in commercio e/o i campioni precedentemente caratterizzati come positivi o negativi possono essere utilizzati come controllo positivo esterno (EPC) o controllo negativo esterno (ENC), rispettivamente. La selezione e la validazione di EPC ed ENC devono essere effettuate in conformità con le normative locali, statali e/o federali applicabili e con le procedure standard di controllo di qualità del laboratorio. Inoltre, quando si utilizzano materiali di controllo disponibili in commercio, l'utilizzatore deve attenersi alle relative istruzioni per l'uso.

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stato validato utilizzando ExK™ TNA-3 (Cod: 442827 o 442828) sullo strumento di PCR in tempo reale BD MAX™ System.

I campioni selezionati per la valutazione del dispositivo sono campioni nasofaringei (NF) raccolti utilizzando un tampone sterile flessibile in nylon (nel seguito indicato come tampone nasofaringeo). Successivamente, il tampone viene inserito nella provetta di BD™ Universal Viral Transport System (UVT, SKU: 220220) o Universal Transport Media® (UTM®) (Copan).

6. Condizioni di trasporto, conservazione e utilizzo

- I kit possono essere trasportati e conservati a 2-30 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del kit.
- Onde evitare versamenti di liquido, evitare vibrazioni durante il trasporto.
- 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 a 2-30 °C. Conservare la fiala al riparo dalla luce.

La tabella seguente riepiloga le condizioni generali di trasporto, conservazione e utilizzo del kit e di ciascun componente:

Componente	Condizioni di trasporto	Condizioni di conservazione	Condizioni di utilizzo
Kit completo VIASURE <i>Respiratory Virus Extended Mix</i> Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	2-30 °C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit.	Prima dell'uso: 2-30 °C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit.	<i>*Fare riferimento alla condizioni di utilizzo di ciascun componente.</i>
<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube (sigillo 1K)		Prima dell'uso: 2-30 °C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit. Dopo apertura della confezione con gel di silice: 2-30°C fino a 28 giorni.	Temperatura ambiente.
<i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube (sigillo 1M)		Prima dell'uso: 2-30 °C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit. Dopo apertura della confezione con gel di silice: 2-30°C fino a 28 giorni.	Temperatura ambiente.
Rehydration Buffer tube		Prima dell'uso: 2-30 °C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit. Dopo apertura della confezione con gel di silice: 2-30°C fino a 28 giorni.	Temperatura ambiente.

Tabella 3. Riepilogo delle condizioni di trasporto, conservazione e utilizzo di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System e di ciascun componente.

7. Precauzioni per gli utilizzatori

- Il prodotto è destinato all'uso di personale di laboratorio clinico qualificato e addestrato, con una specifica formazione nell'esecuzione di tecniche di PCR in tempo reale e di procedure di diagnostica *in vitro*.
- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Leggere attentamente le istruzioni per l'uso del prodotto VIASURE e il Manuale utente di BD MAX™ System prima di utilizzare VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Non eseguire il test se prima non si sono comprese le informazioni sulle procedure, le precauzioni di sicurezza e le limitazioni ivi riportate.
- 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.
- Non utilizzare i reagenti se il sigillo metallico è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti.
- Per proteggere la master mix dalla luce solare, dopo ogni utilizzo richiudere immediatamente la confezione protettiva dei reagenti con la chiusura a zip. Rimuovere l'aria in eccesso dalle confezioni prima di sigillarle.

- Proteggere i reagenti dall'umidità. L'esposizione prolungata all'umidità può influire sulle prestazioni del prodotto.
- Per evitare il deterioramento dell'etichetta, non utilizzare il prodotto vicino a solventi.
- 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.
- Assicurarsi che la provetta di reazione e la provetta del tampone di reidratazione siano innestate saldamente in posizione durante l'allestimento della griglia BD MAX™.
- Nel caso in cui vengano eseguiti altri test di PCR nella stessa area del laboratorio, assicurarsi che il test VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, il kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3 o eventuali reagenti aggiuntivi necessari per il test e il BD MAX™ System 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 indumenti 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 al Regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH), i VIASURE Real Time PCR Detection Kits for BD MAX™ System non richiedono una scheda di dati sulla sicurezza dei materiali vista la classificazione come non pericolosi per la salute e per l'ambiente, poiché non contengono 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. È possibile richiedere a Certest Biotec S.L. una dichiarazione in cui si afferma che non è richiesta la scheda sulla sicurezza dei materiali.

- Assicurarsi che la definizione del programma di test PCR sul BD MAX™ System sia eseguita attenendosi alle istruzioni riportate nella sezione “Protocollo PCR” (parametri di estrazione del campione, codici a barre personalizzati, impostazioni PCR, ecc.).
- Consultare il manuale utilizzatore del BD MAX™ System per maggiori informazioni su avvertenze, precauzioni e procedure.
- Il certificato di analisi non è incluso nel dispositivo. In caso di necessità, può essere scaricato dal sito web di Certest Biotec S.L. (www.certest.es).

8. Procedura di test

8.1. Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni

Il test VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stato utilizzato su campioni nasofaringei prelevati con un tampone flessibile di nylon sterile inserito immediatamente in una provetta sterile contenente 3 mL di BD™ Universal Viral Transport System (UVT, SKU: 220220)² o Universal Transport Media® (UTM®) (Copan)³. Altri tipi di campioni devono essere convalidati dall'utilizzatore.

Il prelievo, la conservazione e il trasporto dei campioni devono rispettare le condizioni convalidate dall'utilizzatore. In generale, i campioni clinici devono essere raccolti ed etichettati in modo appropriato in contenitori puliti con o senza mezzo di trasporto (a seconda del tipo di campione). Dopo il prelievo, i campioni devono essere messi in un sacchetto per materiale a rischio biologico e devono essere trasportati e processati il prima possibile per garantire la qualità del test. I campioni possono essere trasportati a temperatura ambiente (TA) per massimo 2 ore, o a 4°C fino a 5 giorni, in conformità alle normative locali e nazionali riguardanti il trasporto di materiali patogeni. Per i trasporti di lunga durata (oltre 5 giorni), si raccomanda una spedizione a -20°C o a temperatura inferiore⁴. I campioni inviati per il test molecolare devono essere conservati in condizioni controllate, in modo che gli acidi nucleici non si degradino durante la conservazione. Per il test è consigliato l'uso di campioni freschi, ma qualora ciò non fosse possibile o in caso di uno studio

² BD Universal Viral Transport System. <https://www.bd.com/en-us/products-and-solutions/products/product-families/bd-universal-viral-transport-system>

³ <https://www.copangroup.com/product-ranges/utm/>

⁴ 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))

retrospettivo, i campioni devono essere preferibilmente conservati a -70 o -80 °C e, in alternativa, a -20 °C⁵. Si devono evitare cicli di congelamento-scongelo ripetuti per non incorrere nel degrado del campione e degli acidi nucleici.

I campioni clinici devono essere prelevati, trasportati e conservati secondo le linee guida di laboratorio e/o i manuali di gestione di laboratorio appropriati. Come esempio, consultare la 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) o Sánchez-Romero, M. I., García-Lechuz Moya, J. M., González López, J. J., & Orta Mira, N. (2019). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.12.002>.

Nota bene: le condizioni sopra indicate di raccolta, trasporto e conservazione dei campioni sono suggerite sulla base delle raccomandazioni per i campioni nasofaringei da utilizzare per il rilevamento dell'acido nucleico, come riportate nel rapporto di raccomandazioni della SEIMC di riferimento per le procedure generali di raccolta e trasporto nella microbiologia clinica e nell'autorevole guida di riferimento dell'IDSA. Tuttavia, per le corrette modalità di trasporto e conservazione dei campioni si raccomanda di rispettare le linee guida del laboratorio e/o il manuale di gestione del laboratorio di microbiologia.

È stato condotto uno studio interno sulla stabilità dei campioni con VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System utilizzando tamponi nasofaringei negativi raccolti in BD™ Universal Viral Transport System positivi per i target di prodotto, ciascun ceppo a una concentrazione di 2-3xLoD. La stabilità è stata analizzata mediante tre test diversi: stabilità primaria (25 °C: 24 e 48 ore; 4 °C: 1, 2 e 7 giorni; -20 °C: 2, 3 e 6 mesi), stabilità nella provetta di tampone del campione (Sample Buffer Tube, SBT) (3 e 7 giorni a 25 °C e 4 °C) e stabilità annidata (i campioni sono stati incubati a 4 °C e 25 °C per 48 ore, dopodiché sono stati aggiunti alla SBT e analizzati dopo 3 e 7 giorni a 4 °C e 25 °C). Inoltre, i campioni sono stati analizzati dopo cinque cicli di congelamento (a -20 °C) e scongelamento (a 25 °C) per una settimana. I risultati hanno mostrato buone prestazioni dei campioni conservati in tutte le condizioni di test.

⁵ Sánchez-Romero, M. I., García-Lechuz Moya, J. M., González López, J. J. & Orta Mira, N. Collection, transport and general processing of clinical specimens in Microbiology laboratory. *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin.* (English ed.) 37, 127–134 (2019).

8.2. Preparazione del campione ed estrazione del NA

Preparare il campione nel rispetto delle raccomandazioni presenti nelle istruzioni per l'uso del kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipettare 400 µL di campione in una provetta di tampone campione del kit BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Effettuare una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Assicurarci che l'utilizzo del vortex avvenga pochi minuti prima dell'avvio del ciclo. Proseguire con l'azionamento del BD MAX™ System Operation.

Le procedure di preparazione dell'estrazione per applicazioni specifiche devono essere sviluppate e convalidate dall'utilizzatore e altri tipi di campioni potrebbero richiedere un pretrattamento.

8.3. Protocollo PCR

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

8.3.1. Creazione del programma di test PCR per VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: se il test per VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stato già creato, si può saltare il paragrafo 8.3.1 e andare direttamente a quello 8.3.2.

- 1) Nella schermata "Run" (Esegui) del BD MAX™ System, selezionare la scheda "Test Editor" (Modifica test).
- 2) Fare clic sul pulsante "Create" (Crea).

Nella scheda "Basic Information" (Informazioni di base):

- 3) Nel campo "Test Name" (Nome del test), inserire il nome del test, ossia, VIASURE Resp Virus.

Nota: il nome del test deve essere univoco e non deve superare i venti caratteri.

- 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 "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato Master Mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5). Quando si seleziona Dual Master Mix, la scheda di configurazione a destra della scheda "Test Editor" (Editor di test) cambia. Sono presenti schede aggiuntive per "PCR settings" (Impostazioni PCR), "Melt settings" (Impostazioni di melting) e "Test Steps" (Fasi del test) considerando entrambe le provette snap-in.
- 6) Nel campo "Sample Extraction Parameters" (Parametri di estrazione del campione) selezionare "User Defined" (Definiti dall'utilizzatore) e regolare i valori dei parametri riportati di seguito (Tabella 4).

<i>Sample Extraction Parameters</i> (Parametri di estrazione del campione)	<i>Value (units)</i> (Valore (unità))
<i>Lysis Heat Time</i> (Tempo di lisi per calore)	10 min
<i>Lysis Temperature</i> (Temperatura di lisi)	60 °C
<i>Sample Tip Height</i> (Altezza della punta del campione)	1600 steps
<i>Sample Volume</i> (Volume del campione)	950 µL
<i>Wash Volume</i> (Volume di lavaggio)	500 µL
<i>Neutralization Volume</i> (Volume di neutralizzazione)	N/A
<i>DNase Heat Time</i> (Tempo di riscaldamento della DNasi)	N/A

Tabella 4. Parametri di estrazione del campione eseguita con BD MAX™ ExK™ TNA-3.

- 7) Nel campo “Ct Calculation” (Calcolo Ct) selezionare “Call Ct at Threshold Crossing” (Chiamare Ct al superamento del limite) (selezione predefinita).
- 8) Se si utilizza la versione 5.00 o superiore del software e si dispone di provette snap-in sigillate con codice a barre, nel campo “Custom Barcodes” (Codici a barre personalizzati) selezionare la seguente configurazione:
 - a. Snap-In 2 Barcode (Codice a barre Snap-In 2): 1K (per *Respiratory Virus Mix I* reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode (Codice a barre Snap-In 3): 11 (per Rehydration Buffer tube)
 - c. Snap-In 4 Barcode (Codice a barre Snap-In 4): 1M (per *Respiratory Virus Mix II* reaction tube).

Nelle schede “PCR Settings” (Impostazioni PCR):

- 9) Nel campo “PCR Settings” (Impostazioni PCR) inserire i seguenti parametri descritti nelle Tabelle 5 e 6 per la posizione 2 (snap-in 2) (codice colore verde sulla griglia) e la posizione 4 (snap-in 4) (codice colore blu sulla griglia), rispettivamente: “Alias” (fino a sette caratteri alfanumerici), “PCR Gain” (Guadagno PCR), “Threshold” (Soglia), “Ct Min” (Ct minimo) e “Ct Max” (Ct massimo).

<i>Channel</i> (Canale)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>PCR Gain</i> (Guadagno PCR)	<i>Threshold</i> (Soglia)	<i>Ct Min</i> (Ct Min)	<i>Ct Max</i> (Ct Max)
475/520 (FAM)	SARS	80	150	0	40
530/565 (HEX)	FLUB	40	150	0	40
585/630 (ROX)	FLUA	80	150	0	40
630/665 (Cy5)	RSV	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	EIC	80	150	0	35

Tabella 5. “PCR settings” (Impostazioni di PCR) per la posizione 2.

<i>Channel</i> (Canale)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>PCR Gain</i> (Guadagno PCR)	<i>Threshold</i> (Soglia)	<i>Ct Min</i> (Ct Min)	<i>Ct Max</i> (Ct Max)
475/520 (FAM)	HPIV	60	150	0	40
530/565 (HEX)	HCOV	40	150	0	40
585/630 (ROX)	MPV	80	150	0	40
630/665 (Cy5)	HADV	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	EIC	80	150	0	35

Tabella 6. "PCR settings" (Impostazioni di PCR) per la posizione 4.

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'utilizzatore 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) Nel campo "Color compensation" (Compensazione del colore) inserire i parametri che seguono (Tabelle 7 e 8).

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

Tabella 7. Parametri di "Color compensation" (Compensazione del colore) per la posizione 2.

		False Receiving Channel (Canale di ricezione falso)					
		Channel (Canale)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canale di eccitamento)	475/520	-	0	0	0	0	
	530/565	0	-	0	0	0	
	585/630	0	0	-	3	0	
	630/665	0	0	5	-	19	
	680/715	0	0	0	3	-	

Tabella 8. Parametri di "Color compensation" (Compensazione del colore) per la posizione 4.

Nelle schede "Melt Settings" (Impostazioni di melting) non è necessaria alcuna azione, perché il parametro non si applica a questo prodotto.

Nella scheda "Test Steps" (Fasi del test):

- 11) Inserire il nome della fase (fino a venti caratteri) e impostare i seguenti parametri per definire ciascuna fase del protocollo PCR: "Profile Type" (Tipo di profilo), "Cycles" (Cicli), "Time" (Tempo) e "Temperature" (Temperatura), quindi selezionare il campo "Detect" (Rileva) per definire la fase di rilevamento (Tabella 9). Fare clic sul pulsante "Add" (Aggiungi) per aggiungere una nuova fase e ripetere l'operazione fino a definire tutte le fasi necessarie.

Nota: il campo "Type" (Tipo) deve essere vuoto.

<i>Step</i> (Fase)	<i>Step name</i> (Nome fase)	<i>Profile Type</i> (Tipo profilo)	<i>Cycles</i> (Cicli)	<i>Time (s)</i> (Tempo (s))	<i>Temperature</i> (Temperatura)	<i>Detect</i> (Rileva)
Reverse transcription (Trascrizione inversa)	RV-transcription	<i>Hold</i>	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Denaturazione iniziale)	IN-denaturation	<i>Hold</i>	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturazione e appaiamento/estensione (Raccolta dati))	Annealing/Extension	<i>2- Temperature</i>	45	10	95 °C	-
				61,1	63 °C	✓

Tabella 9. Protocollo di PCR per la posizione 2 e la posizione 4.

Nella scheda "Result Logic" (Logica risultati):

- 12) Nel campo "Target" assegnare un nome al target, ossia, SARS (utilizzando non più di sette caratteri alfanumerici). Ripetere i passaggi 12-15 per ogni target (ovvero, SARS, FLUB, FLUA e RSV per la posizione 2 (snap-in 2) o HPIV, HCOV, MPV e HADV per la posizione 4 (snap-in 4) seguendo le tabelle specifiche per il target da definire.

Nota: Selezionare la posizione 2 (verde) (snap-in 2 (green)) nel menu a tendina "Master Mix" per stabilire la logica del risultato per la prima miscela di reazione e la posizione 4 (blu) (snap-in 4 (blue)) per la seconda. I nomi dei target devono essere diversi per le posizioni 2 e 4.

- 13) Fare clic sulla casella di controllo "Analyze" (Analizza) per includere le lunghezze d'onda desiderate (canali PCR) nell'analisi del risultato del target (Tabelle 10-13 per la posizione 2 e Tabelle 14-17 per la posizione 4).

Primo master mix (Respiratory Virus Mix / reaction tube): Snap-In 2 (green)

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d'onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
475/520	SARS	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabella 10. Selezione dei canali PCR nella scheda "Result logic" (Logica del risultato) per il target SARS (SARS-CoV-2).

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d'onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
530/565	FLUB	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabella 11. Selezione dei canali PCR nella scheda "Result logic" (Logica del risultato) per il target FLUB (Influenza B).

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d'onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
585/630	FLUA	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabella 12. Selezione dei canali PCR nella scheda "Result logic" (Logica del risultato) per il target FLUA (Influenza A).

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d'onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
630/665	RSV	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabella 13. Selezione dei canali PCR nella scheda "Result logic" (Logica del risultato) per il target RSV (Virus respiratorio sinciziale tipi A e B).

Secondo master mix (*Respiratory Virus Mix II* reaction tube): Snap-In 4 (blue)

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d'onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
475/520	HPIV	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabella 14. Selezione dei canali PCR nella scheda "Result logic" (Logica del risultato) per il target HPIV (Parainfluenza tipi 1, 2, 3 e 4).

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d'onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
530/565	HCOV	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabella 15. Selezione dei canali PCR nella scheda "Result logic" (Logica del risultato) per il target HCOV (Coronavirus 229E, NL63, HKU1 e OC43).

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d'onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
585/630	MPV	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabella 16. Selezione dei canali PCR nella scheda "Result logic" (Logica del risultato) per il target MPV (Metapneumovirus).

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d'onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
630/665	HADV	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabella 17. Selezione dei canali PCR nella scheda "Result logic" (Logica del risultato) per il target HADV (Adenovirus).

14) Fare clic sul pulsante "Edit Logic" (Modifica logica).

15) Nella finestra "Edit Logic" (Modifica logica) vengono elencate tutte le combinazioni di tipi di risultato.

Per ogni riga, nel menu a tendina "Result" (Risultato), selezionare il risultato che viene richiamato quando si verificano le condizioni di quella riga, seguendo le tabelle 18-21 per la posizione 2 e le tabelle 22-25 per la posizione 4.

Primo master mix (*Respiratory Virus Mix I* reaction tube): Snap-In 2 (green)

<i>Result</i> (Risultato)	<i>SARS</i> (475/520)	<i>EIC</i> (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 18. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target SARS (SARS-CoV-2). I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

<i>Result</i> (Risultato)	FLUB (530/565)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 19. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target FLUB (Influenza B). I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

<i>Result</i> (Risultato)	FLUA (585/630)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 20. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target FLUA (Influenza A). I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

<i>Result</i> (Risultato)	RSV (630/665)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 21. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target RSV (Virus respiratorio sinciziale tipi A e B). I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

Nota: in base al Ct Max precedentemente definito (Tabella 5):

- i. Il tipo di risultato per i canali SARS (475/520), FLUB (530/565), FLUA (585/630) o RSV (630/665) è considerato “Valid” (Valido) quando il valore di Ct ottenuto è ≤ 40 e “Invalid” (Non valido) quando il valore di Ct ottenuto è > 40 .
- ii. Il tipo di risultato per il canale EIC (680/715) è considerato “Valid” (Valido) quando il valore di Ct ottenuto è ≤ 35 , e “Invalid” (Non valido) quando il valore di Ct ottenuto è > 35 .

Secondo master mix (*Respiratory Virus Mix II* reaction tube): Snap-in 4 (blue)

<i>Result</i> (Risultato)	HPIV (475/520)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 22. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target HPIV (Parainfluenza tipi 1, 2, 3 e 4). I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

<i>Result</i> (Risultato)	HCOV (530/565)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 23. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target HCOV (Coronavirus 229E, NL63, HKU1 e OC43). I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

<i>Result</i> (Risultato)	MPV (585/630)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 24. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target MPV (Metapneumovirus). I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

<i>Result</i> (Risultato)	HADV (630/665)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 25. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target HADV (Adenovirus). I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

Nota: in base al Ct Max precedentemente definito (Tabella 6):

- i. Il tipo di risultato per i canali HPIV (475/520), HCOV (530/565), MPV (585/630) o HADV (630/665) è considerato “Valid” (Valido) quando il valore di Ct ottenuto è ≤ 40 e “Invalid” (Non valido) quando il valore di Ct ottenuto è > 40 .
- ii. Il tipo di risultato per il canale EIC (680/715) è considerato “Valid” (Valido) quando il valore di Ct ottenuto è ≤ 35 , e “Invalid” (Non valido) quando il valore di Ct ottenuto è > 35 .

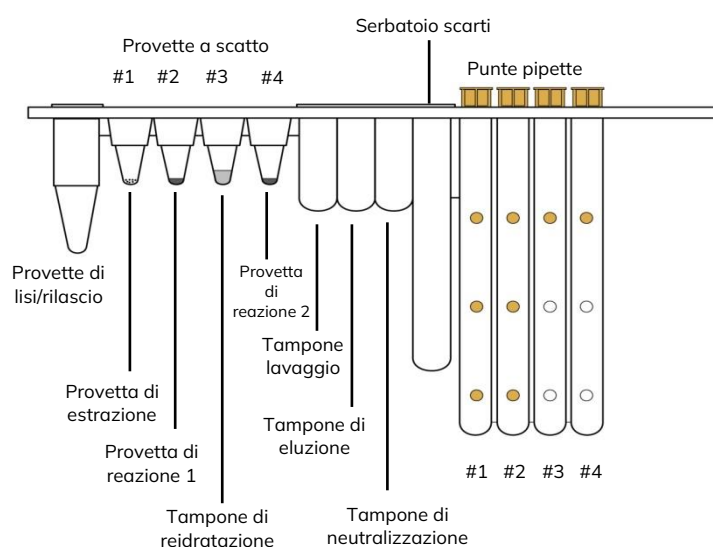
16) Fare clic sul pulsante “Save” (Salva) per salvare il test.

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. Picchiare delicatamente ogni striscia su una superficie dura per assicurarsi che tutti i liquidi si trovino sul fondo delle provette, quindi posizionarle 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 l'/gli Extraction Tube(s) (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 *Respiratory Virus Mix I* reaction tubes (sigillo 1K) e farle scattare nelle posizioni corrispondenti nella 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. Picchiare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.

- 4) Rimuovere il numero richiesto di Rehydration Buffer tubes (sigillo 11) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 3, nessuna codifica di colore sulla griglia. Vedere Figura 1).
 - a. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
 - b. 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. Picchiare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il tampone si trovi in fondo alla provetta.
- 5) Determinare e separare il numero appropriato di *Respiratory Virus Mix II* reaction tubes (sigillo 1M) e farle scattare nelle posizioni corrispondenti nella striscia (posizione 4, codifica di colore blu 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. Picchiare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.

Figura 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) dal BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. Configurazione dello strumento BD MAX™

- 1) Selezionare la scheda "Worklist" (Elenco di lavoro) sulla schermata "Run" (Esegui) del software versione v4.50A o superiore del BD MAX™ System.
- 2) Nel menu a tendina "Test" selezionare il test VIASURE Resp Virus (se non è ancora stato creato, vedere la sezione 8.3.1).

- 3) Nel menu a tendina “Kit Lot Number” (Numero di lotto del kit), selezionare il numero di lotto appropriato per il kit (riportato sulla scatola esterna del kit di estrazione utilizzato) (opzionale).
Nota: i numeri di lotto devono essere definiti nella schermata “Inventory” (Inventario) prima di poterli selezionare in questo punto.
- 4) Inserire il numero identificativo della Sample Buffer Tube nel campo “Sample tube” (Provetta del campione), mediante scansione del codice a barre con lo scanner oppure manualmente.
- 5) Compilare il campo “Patient ID” (ID paziente) e/o “Accession” (Accesso) e fare clic sul tasto “Tab” o su “Enter”. Continuare fino all’inserimento dei codici a barre di tutte le Sample Buffer Tube. Assicurarsi che l’ID campione/paziente e le Sample Buffer Tube siano abbinati correttamente.
- 6) Posizionare la Sample Buffer Tube preparata sulla(e) griglia(e) BD MAX™.
- 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 Cartridge nel BD MAX™ System.
- 9) Chiudere la porta del BD MAX™ System.
- 10) Fare clic su “Start” (Inizia) per iniziare la procedura.

8.3.4. Report dei risultati di BD MAX™

- 1) Nella barra dei menu, fare clic sul pulsante “Results” (Risultati).
- 2) Fare clic due volte sul test in esecuzione incluso nell’elenco oppure premere il pulsante “View” (Visualizza).
- 3) I pulsanti “Print” (Stampa) ed “Export” (Esporta) nella parte inferiore della schermata risulteranno attivi.

Per stampare i risultati:

1. Fare clic sul pulsante “Print” (Stampa).
2. Nella finestra di anteprima di stampa del rapporto di esecuzione, selezionare: “Run Details” (Dettagli esecuzione), “Test Details” (Dettagli test) e “Plots” (Grafici).
3. Fare clic su “Print” (Stampa) per stampare il rapporto o su “Export” (Esporta) per esportare un PDF del rapporto su una chiavetta USB.

Per esportare i risultati:

1. Fare clic sul pulsante “Export” (Esporta) per trasferire il rapporto (file PDF e CSV) su una chiavetta USB.
2. Al termine dell’esportazione, nella finestra “Results Export” (Esportazione dei risultati) viene visualizzata l’icona di successo o di errore.

9. Interpretazione dei risultati

Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, fare riferimento al manuale utilizzatore 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 5). La curva di amplificazione del campione che presenta un valore di Ct pari a "0" deve essere controllata manualmente.
- Un valore di Ct pari a -1 indica che non è avvenuto alcun processo di amplificazione, che non è stato calcolato alcun valore di Ct dal software oppure che il valore di Ct calcolato è inferiore alla soglia specificata o superiore al Ct Max stabilito (limite).
- Qualunque altro valore di Ct deve essere interpretato in correlazione con la curva di amplificazione e nel rispetto delle linee guida di interpretazione riportate nelle Tabelle 26 e 27.

Controllare il segnale del controllo interno endogeno per verificare il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. Inoltre, verificare che non sia presente nessun report di errore del BD MAX™.

I risultati devono essere letti e analizzati utilizzando le seguenti tabelle:

Primo master mix (<i>Respiratory Virus Mix</i> / reaction tube): Snap-in 2				
SARS-CoV-2 (nome del target: SARS)	Influenza B (nome del target: FLUB)	Influenza A (nome del target: FLUA)	Virus respiratorio sinciziale (nome del target: RSV)	Interpretazione di singoli campioni del paziente
POS	POS	POS	POS	RNA di SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A e RSV rilevato
POS	POS	POS	NEG	RNA di SARS-CoV-2, Influenza B e Influenza A rilevato, RNA di RSV non rilevato
POS	POS	NEG	POS	RNA di SARS-CoV-2, Influenza B e RSV rilevato, RNA di Influenza A non rilevato
POS	NEG	POS	POS	RNA di SARS-CoV-2, Influenza A e RSV rilevato, RNA di Influenza B non rilevato
NEG	POS	POS	POS	RNA di Influenza B, Influenza A e RSV rilevato, RNA di SARS-CoV-2 non rilevato
POS	POS	NEG	NEG	RNA di SARS-CoV-2 e Influenza B rilevato, RNA di Influenza A e RSV non rilevato
POS	NEG	POS	NEG	RNA di SARS-CoV-2 e Influenza A rilevato, RNA di Influenza B e RSV non rilevato

POS	NEG	NEG	POS	RNA di SARS-CoV-2 e RSV rilevato, RNA di Influenza B e Influenza A non rilevato
NEG	POS	POS	NEG	RNA di Influenza A e Influenza B rilevato, RNA di SARS-CoV-2 e RSV non rilevato
NEG	POS	NEG	POS	RNA di Influenza B e RSV rilevato, RNA di SARS-CoV-2 e Influenza A non rilevato
NEG	NEG	POS	POS	RNA di Influenza A e RSV rilevato, RNA di SARS-CoV-2 e Influenza B non rilevato
POS	NEG	NEG	NEG	RNA di SARS-CoV-2 rilevato, RNA di Influenza B, Influenza A e RSV non rilevato
NEG	POS	NEG	NEG	RNA di Influenza B rilevato, RNA di SARS-CoV-2, Influenza A e RSV non rilevato
NEG	NEG	POS	NEG	RNA di Influenza A rilevato, RNA di SARS-CoV-2, Influenza B e RSV non rilevato
NEG	NEG	NEG	POS	RNA di RSV rilevato, RNA di SARS-CoV-2, Influenza B e Influenza A non rilevato
NEG	NEG	NEG	NEG	RNA target non rilevato
UNR	UNR	UNR	UNR	Risultato non risolto (UNR) dovuto alla presenza di inibitori nella reazione PCR o a un problema generale (non segnalato da un codice di errore) durante le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione. ¹
IND	IND	IND	IND	Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel BD MAX™ System . Questo risultato del test viene visualizzato in caso di guasto dello strumento associato ad un codice di errore. ²
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. ²

Tabella 26. Interpretazione del campione.

1 Il controllo interno endogeno (EIC) deve mostrare un segnale di amplificazione con un valore di Ct ≤ 35. In assenza del segnale dell'EIC o in presenza di un valore di Ct > 35, il risultato viene considerato Non risolto (UNR) ed è necessario ripetere il test. Controllare il report dei risultati e i valori di Ct dei target selezionati e adottare le azioni appropriate, considerando quanto segue:

- I. Quando i risultati dei geni target sono non validi (Ct > 40, il software mostra un risultato pari a "-1"), è necessario ripetere il test dal campione primario, preparando di nuovo la Sample Buffer Tube (SBT) se il volume del campione è sufficiente. Seguire le linee guida del laboratorio e/o i manuali di gestione del laboratorio di microbiologia.
- II. Quando i risultati dei geni target sono validi (Ct ≤ 40), è possibile non vedere alcun segnale di amplificazione dall'EIC oppure vedere un segnale con un valore di Ct > 35 (il software mostra un risultato pari a "-1") durante l'analisi di campioni ad alta concentrazione, a causa di un'amplificazione preferenziale di acidi nucleici specifici del target. Se ritenuto necessario, diluire questi campioni in un rapporto 1/10, preparare di nuovo la Sample Buffer Tube (SBT) e ripetere il test. Seguire le linee guida del laboratorio e/o i manuali di gestione del laboratorio di microbiologia.

NOTA: i tamponi nasofaringei possono essere conservati senza trasferimento nella SBT fino a 2 giorni se conservati a 25 °C o fino a 7 giorni se conservati a 4 °C.

2 È possibile ottenere risultati indeterminati (IND) o incompleti (INC) a causa di un errore di sistema; in tal caso, è necessario ripetere il test. Per l'interpretazione dei codici di avvertenza ed errore, fare riferimento al manuale utilizzatore del sistema BD MAX™.

Secondo master mix (<i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube): Snap-in 4				
Parainfluenza (nome del target: HPIV)	Coronavirus (nome del target: HCOV)	Metapneumovirus (nome del target: MPV)	Adenovirus (nome del target: HADV)	Interpretazione di singoli campioni del paziente
POS	POS	POS	POS	RNA/DNA di parainfluenza, coronavirus, metapneumovirus e adenovirus rilevato
POS	POS	POS	NEG	RNA di parainfluenza, coronavirus e metapneumovirus rilevato, DNA di adenovirus non rilevato
POS	POS	NEG	POS	RNA/DNA di parainfluenza, coronavirus e adenovirus rilevato, RNA di metapneumovirus non rilevato
POS	NEG	POS	POS	RNA/DNA di parainfluenza, metapneumovirus e adenovirus rilevato, RNA di coronavirus non rilevato
NEG	POS	POS	POS	RNA/DNA di coronavirus, metapneumovirus e adenovirus rilevato, RNA di parainfluenza non rilevato
POS	POS	NEG	NEG	RNA di parainfluenza e coronavirus rilevato, RNA/DNA di metapneumovirus e adenovirus non rilevato
POS	NEG	POS	NEG	RNA di parainfluenza e metapneumovirus rilevato, RNA/DNA di coronavirus e adenovirus non rilevato
POS	NEG	NEG	POS	RNA/DNA di parainfluenza e adenovirus rilevato, RNA di coronavirus e metapneumovirus non rilevato
NEG	POS	POS	NEG	RNA di coronavirus e metapneumovirus rilevato, RNA/DNA di parainfluenza e adenovirus non rilevato
NEG	POS	NEG	POS	RNA/DNA di coronavirus e adenovirus rilevato, RNA di parainfluenza e metapneumovirus non rilevato
NEG	NEG	POS	POS	RNA/DNA di metapneumovirus e adenovirus rilevato, RNA di parainfluenza e coronavirus non rilevato
POS	NEG	NEG	NEG	RNA di parainfluenza rilevato, RNA/DNA di coronavirus, metapneumovirus e adenovirus non rilevato
NEG	POS	NEG	NEG	RNA di coronavirus rilevato, RNA/DNA di parainfluenza, metapneumovirus e adenovirus non rilevato
NEG	NEG	POS	NEG	RNA di metapneumovirus rilevato, RNA/DNA di parainfluenza, coronavirus e adenovirus non rilevato

NEG	NEG	NEG	POS	DNA di adenovirus rilevato, RNA di parainfluenza, coronavirus e metapneumovirus non rilevato
NEG	NEG	NEG	NEG	RNA target non rilevato
UNR	UNR	UNR	UNR	Risultato non risolto (UNR) dovuto alla presenza di inibitori nella reazione PCR o a un problema generale (non segnalato da un codice di errore) durante le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione. ¹
IND	IND	IND	IND	Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel BD MAX™ System. Questo risultato del test viene visualizzato in caso di guasto dello strumento associato ad un codice di errore. ²
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. ²

Tabella 27. Interpretazione del campione.

1 Il controllo interno endogeno (EIC) deve mostrare un segnale di amplificazione con un valore di $Ct \leq 35$. In assenza del segnale dell'EIC o in presenza di un valore di $Ct > 35$, il risultato viene considerato Non risolto (UNR) ed è necessario ripetere il test. Controllare il report dei risultati e i valori di Ct dei target selezionati e adottare le azioni appropriate, considerando quanto segue:

- I. Quando i risultati dei geni target sono non validi ($Ct > 40$, il software mostra un risultato pari a "-1"), è necessario ripetere il test dal campione primario, preparando di nuovo la Sample Buffer Tube (SBT) se il volume del campione è sufficiente. Seguire le linee guida del laboratorio e/o i manuali di gestione del laboratorio di microbiologia.
- II. Quando i risultati dei geni target sono validi ($Ct \leq 40$), è possibile non vedere alcun segnale di amplificazione dall'EIC oppure vedere un segnale con un valore di $Ct > 35$ (il software mostra un risultato pari a "-1") durante l'analisi di campioni ad alta concentrazione, a causa di un'amplificazione preferenziale di acidi nucleici specifici del target. Se ritenuto necessario, diluire questi campioni in un rapporto 1/10, preparare di nuovo la Sample Buffer Tube (SBT) e ripetere il test. Seguire le linee guida del laboratorio e/o i manuali di gestione del laboratorio di microbiologia.

NOTA: i tamponi nasofaringei possono essere conservati senza trasferimento nella SBT fino a 2 giorni se conservati a 25 °C o fino a 7 giorni se conservati a 4 °C.

2 È possibile ottenere risultati indeterminati (IND) o incompleti (INC) a causa di un errore di sistema; in tal caso, è necessario ripetere il test. Per l'interpretazione dei codici di avvertenza ed errore, fare riferimento al manuale utilizzatore del sistema BD MAX™.

Nota: l'utilizzo di controlli esterni deve fornire i seguenti risultati attesi: negativo per l'ENC e positivo per l'EPC (si prevede che i campioni positivi noti siano positivi solo per i microrganismi presenti nel campione). Un ENC che fornisce un risultato di test positivo indica un evento di contaminazione o un errore nella manipolazione del campione. Un EPC che fornisce un risultato negativo indica un problema nella manipolazione/preparazione del campione. Rivedere la tecnica di manipolazione/preparazione del campione. In caso di errore del controllo esterno, è necessario ripetere il test.

In caso di un risultato ambiguo continuo, si raccomanda di rileggere le istruzioni per l'uso e la procedura di estrazione usata dall'utilizzatore, 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.

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.
- Sebbene questo test possa essere utilizzato con altri tipi di campioni, è stato validato solo 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.
- La qualità del test è subordinata alla qualità del campione; l'estrazione dell'acido nucleico dai campioni clinici deve essere effettuata in modo corretto.
- Questo test è un test qualitativo, non fornisce pertanto valori quantitativi né indica il numero di microrganismi presenti. Non è possibile mettere in correlazione i valori Ct ottenuti dalla PCR con la concentrazione del campione, perché essi dipendono dal termociclatore utilizzato e dall'esecuzione in sé.
- Benché possano essere rilevati livelli estremamente bassi, al di sotto del limite di rilevamento, i risultati potrebbero non essere riproducibili.
- È necessario prestare attenzione all'intervallo di misurazione previsto dal test perché i campioni con concentrazioni superiori o inferiori a tale range possono fornire risultati errati.
- Esiste la possibilità di risultati falsi positivi a causa della contaminazione crociata da SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipi A e B), parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4), coronavirus umano (229E, NL63, HKU1 e OC43), metapneumovirus e adenovirus, da campioni contenenti alte concentrazioni di RNA/DNA target oppure a causa della contaminazione da prodotti di PCR di reazioni precedenti.
- Le combinazioni specifiche di primer e sonde per il rilevamento dei geni *N* e *ORF1ab* di SARS-CoV-2, del gene *M* (proteina di matrice (M1)) di Influenza A/B, del gene *HA* di Influenza A sottotipo H1N1, del gene *N* di RSV (tipi A e B), del gene *HN* di parainfluenza (tipi 1, 2 e 3), del gene *F* di parainfluenza (tipo 4), del gene *N* di coronavirus (229E, NL63, HKU1 e OC43), del gene *F* di metapneumovirus e del gene *hexon* di adenovirus, utilizzate in VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, non presentano omologie combinate significative con il genoma umano, la microflora umana o altri microrganismi respiratori, che potrebbero causare falsi positivi prevedibili.
- Risultati falsi negativi possono dipendere da numerosi fattori, anche in combinazione tra loro, tra cui:
 - Metodi non corretti di prelievo, trasporto, conservazione e/o manipolazione dei campioni.
 - Procedure di elaborazione errate (inclusa l'estrazione di RNA/DNA).
 - Deterioramento di RNA/DNA durante la spedizione/conservazione e/o elaborazione del campione.

- Mutazioni o polimorfismi nei siti di legame di primer o sonde possono influire sul rilevamento di ceppi nuovi o sconosciuti di SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipi A e B), parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4), coronavirus umano (229E, NL63, HKU1 e OC43), metapneumovirus e/o adenovirus.
- Carica virale del campione al di sotto del limite di rilevamento del test.
- Presenza di inibitori della RT-qPCR o di altri tipi di sostanze interferenti. Non è stato valutato l'impatto di vaccini, alcune terapie antivirali, antibiotiche, chemioterapiche, farmaci immunosoppressori o antimicotici utilizzati per prevenire l'infezione o durante il trattamento della stessa.
- L'effetto delle sostanze interferenti è stato valutato solo per quelle riportate nella sezione 12.7.1 (Studio sulle sostanze interferenti) delle presenti istruzioni per l'uso. È stata osservata un'interferenza durante il test sul fluticasone (1,26E-06 mg/mL) e sulla nicotina (3,00E-02 mg/mL) sia nella provetta di reazione di *Respiratory Virus Mix I* che in quella di *Respiratory Virus Mix II*. Consultare tale sezione per controllare le sostanze endogene ed esogene più comuni che inducono interferenza totale/parziale sulla reazione RT-qPCR. Anche altre sostanze, non indicate, potrebbero indurre risultati errati.
- Mancata aderenza alle istruzioni per l'uso e alla procedura di test.
- Un risultato positivo di un test non indica necessariamente la presenza di virus vitali e non implica che tali virus siano infettivi o che siano gli agenti eziologici dei sintomi clinici. Tuttavia, un risultato positivo indica la presenza delle sequenze virali target.
- I risultati negativi non escludono la presenza di RNA/DNA di SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipi A e B), parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4), coronavirus umano (229E, NL63, HKU1 e OC43), metapneumovirus e/o adenovirus in un campione clinico e non devono essere utilizzati come unica base per il trattamento o altre decisioni di gestione dei pazienti. Non sono stati definiti tipi di campioni ottimali né tempistiche per il picco dei livelli virali durante le infezioni causate da tali microrganismi. Per rilevare il patogeno può essere necessario prelevare più campioni (tipi e punti temporali di campionamento) dallo stesso paziente.
- È possibile che il rilevamento di alcuni ceppi circolanti nel 2019, ascrivibili al lignaggio Victoria di Influenza B, possa essere compromesso da mutazioni puntiformi intervenute in tali nuovi ceppi. L'inclusività dell'influenza B è stata testata solo per le varianti contenenti le mutazioni C54T, C55T e C120T (sequenza di riferimento NC002210.1).
- Se i test diagnostici per altre malattie respiratorie risultano negativi e le osservazioni cliniche, l'anamnesi e le informazioni epidemiologiche sul paziente suggeriscono la possibilità di un'infezione da SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipi A e B), parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4), coronavirus (229E, NL63, HKU1 e OC43), metapneumovirus e/o adenovirus, deve essere valutata la possibilità di un risultato falso negativo e di ripetere il test sul paziente.

- I valori di fluorescenza possono variare a causa di molteplici fattori, tra cui: apparecchiatura PCR (anche se dello stesso modello), sistema di estrazione, tipo di campione, precedente trattamento del campione, ecc.
- Il dispositivo include *primer* e sonde che rilevano specificamente il ceppo di Influenza A H1N1pdm09. In caso di un risultato positivo non è possibile escludere il ceppo dell'influenza pandemica, pertanto si consiglia di eseguire ulteriori test.
- I valori predittivi positivi e negativi dipendono in larga misura dalla prevalenza in tutti i test diagnostici *in vitro*. Le prestazioni di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System possono variare in base alla prevalenza e alla popolazione sottoposta a test.
- È necessario ripetere il test nel caso in cui si ottengano risultati non risolti, indeterminati o incompleti utilizzando VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* 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 miscelazione di reazione liofilizzata. Un danno agli strumenti può comportare risultati indeterminati o incompleti.

11. Controllo di qualità

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* 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. Inoltre, l'uso di controlli esterni (EPC ed ENC) consente di confermare le prestazioni del test. I controlli esterni non vengono utilizzati dal BD MAX™ System ai fini dell'interpretazione dei risultati, ma vengono considerati come un campione. Il controllo positivo esterno (EPC) è concepito per monitorare un eventuale mancato funzionamento dei reagenti del test, mentre il controllo negativo esterno (ENC) serve a rilevare la contaminazione ambientale o dei reagenti da parte di acidi nucleici target.

12. Caratteristiche di prestazione analitica

12.1. Linearità analitica

La linearità del test è stata determinata e confermata analizzando una serie di diluizioni in decuplicato di campioni di tamponi nasofaringei contenenti una concentrazione nota di RNA/DNA specifico e sintetico appartenente a SARS-CoV-2, virus Influenza A, virus Influenza B, virus respiratorio sinciziale umano, virus parainfluenza, coronavirus, metapneumovirus e adenovirus (da 2E+07 a 2E+00 copie per µL). Di seguito è riportato un grafico di amplificazione esemplificativo di un test:

Figura 2. Serie di diluizioni del template di SARS-CoV-2 ($2E+07$ – $2E+00$ copie/ μ L) analizzate sul BD MAX™ System (canale 475/520 (FAM)).

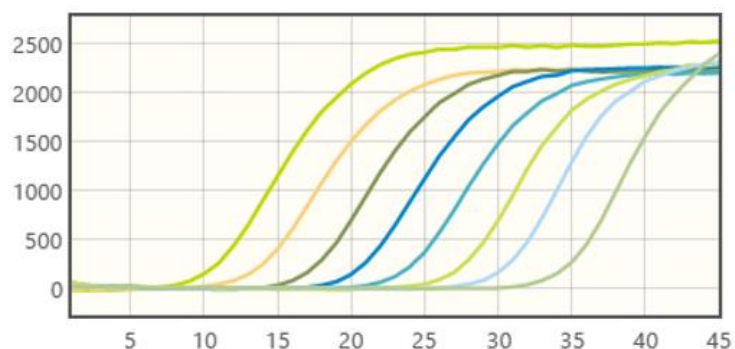


Figura 3. Serie di diluizioni del template di Influenza B ($2E+07$ – $2E+00$ copie/ μ L) analizzate sul BD MAX™ System (canale 530/565 (HEX)).

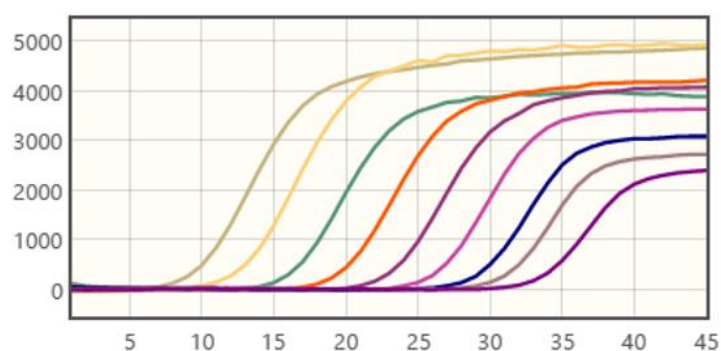


Figura 4. Serie di diluizioni del template di Influenza A ($2E+07$ – $2E+00$ copie/ μ L) analizzate sul BD MAX™ System (canale 585/630 (ROX)).

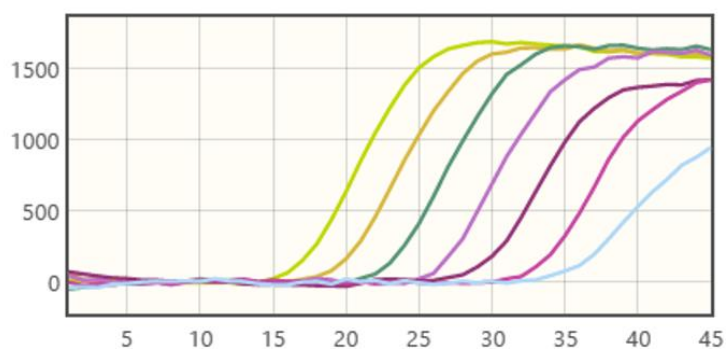


Figura 5. Serie di diluizioni del template di RSV ($2E+07$ – $2E+00$ copie/ μ L) analizzate sul BD MAX™ System (canale 630/665 (Cy5)).

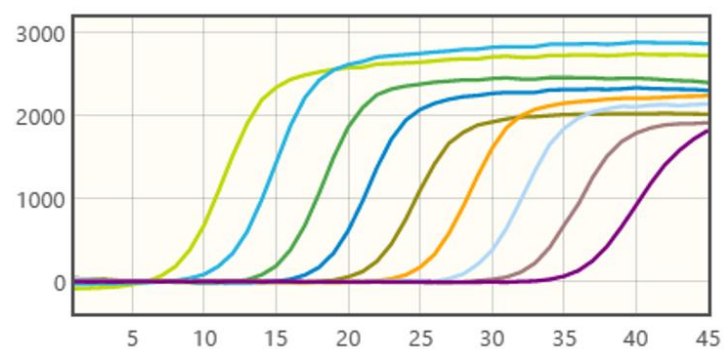


Figura 6. Serie di diluizioni del template di parainfluenza ($2E+07 - 2E+00$ / copie/ μ L) analizzate sul BD MAX™ System (canale 475/520 (FAM)).

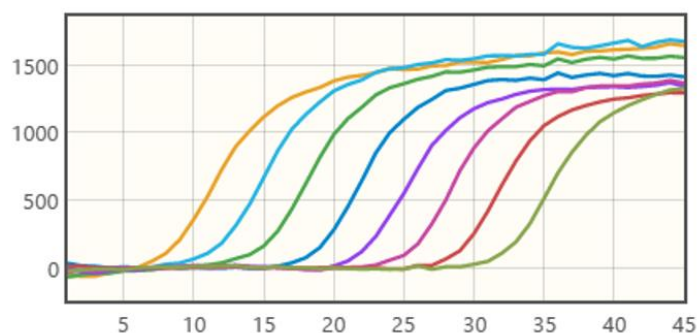


Figura 7. Serie di diluizioni del template di coronavirus ($2E+07 - 2E+00$ / copie/ μ L) analizzate sul BD MAX™ System (canale 530/565 (HEX)).

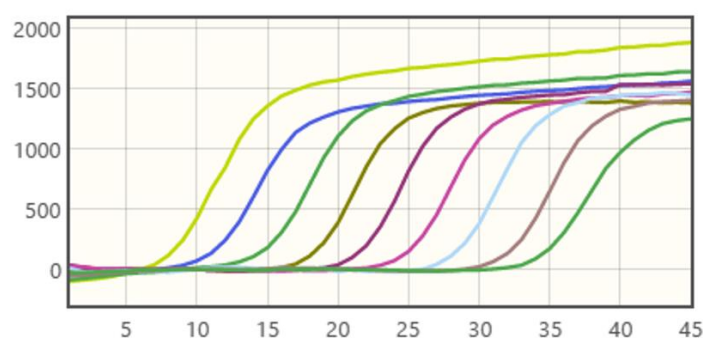


Figura 8. Serie di diluizioni del template di metapneumovirus ($2E+07 - 2E+00$ / copie/ μ L) analizzate sul BD MAX™ System (canale 585/630 (ROX)).

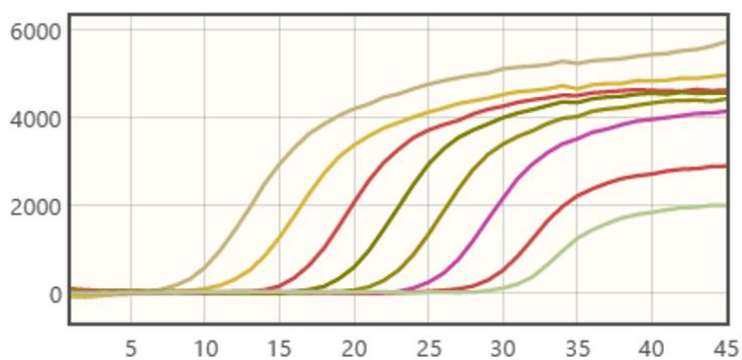
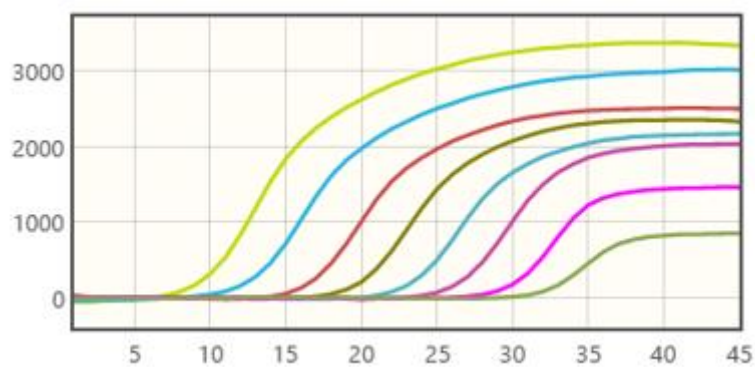


Figura 9. Serie di diluizioni del template di adenovirus ($2E+07 - 2E+00$ / copie/ μ L) analizzate sul BD MAX™ System (canale 630/665 (Cy5)).



12.2. Sensibilità analitica. Limite di rivelabilità (LoD)

La sensibilità analitica o limite di rilevabilità (LoD) di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stata analizzata con tre lotti utilizzando campioni nasofaringei negativi raccolti in BD™ Universal Viral Transport System addizionati con i ceppi di riferimento o RNA sintetico come dettagliato nella seguente tabella:

Virus	Ceppo/RNA sintetico	Codice prodotto esterno
SARS-CoV-2	Heat-inactivated SARS-CoV-2 ceppo 2019-n-CoV/USA-WA1/2020	VR-1986HK
Influenza A	Influenza A virus (H1N1) ceppo A/PR/8/34	VR-95PQ
Influenza B	Influenza B virus (Lignaggio Yamagata) ceppo B/Florida/4/2006	VR-1804PQ
RSV A	Virus respiratorio sinciziale umano A ceppo Long	VR-26PQ
RSV B	Virus respiratorio sinciziale umano B ceppo 9320	FR-293
Parainfluenza virus tipo 1	Virus parainfluenza umano 1 ceppo C35	VR-94
Parainfluenza virus tipo 2	Virus parainfluenza umano 2 ceppo Greer	VR-92
Parainfluenza virus tipo 3	Virus parainfluenza umano 3 ceppo C 243	VR-93
Parainfluenza virus tipo 4	Virus parainfluenza umano 4b ceppo CH 19503	VR-1377
Coronavirus OC43	Betacoronavirus 1	VR-1558
Coronavirus 229E	Coronavirus umano 229E	VR-740
Coronavirus NL63	Coronavirus umano, ceppo NL63	FR-304
Coronavirus HKU1	RNA sintetico quantitativo di coronavirus umano HKU1	ATCC-VR3262SD
Metapneumovirus	Liquido di coltura di metapneumovirus umano 8 (hMPV-8) Tipo B2 (inattivato per calore)	0810159CF
Adenovirus	Adenovirus umano 1 ceppo Adenoid 71	VR-1

Tabella 28. Ceppi di riferimento ed RNA sintetico utilizzati per i test sulle prestazioni (test LoD) di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Inoltre, nel caso del target SARS-CoV-2, il LoD (UI/μL) è stato analizzato utilizzando 1st WHO International Standard SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code 20/146). I risultati del LoD ottenuti per VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono dettagliati nella seguente tabella:

Tampone nasofaringeo			
Respiratory Virus Mix I reaction tube			
SARS	FLUA	FLUB	RSV
4,5E+00 UI/μL	6,7E-01 copie/μL	7,29E+00 copie/μL*	1,35E+00 copie/μL RSV A 2,52E+01 TCID50/mL RSV B
Respiratory Virus Mix II reaction tube			
HPIV	HCOV	MPV	HADV
5,33E+00 TCID50/mL HPIV 1 4,80E+00 TCID50/mL HPIV 2 9,00E+02 TCID50/mL HPIV 3 1,44E+01 TCID50/mL HPIV 4	4,80E-02 TCID50/mL HCOV OC43 1,60E-01 TCID50/mL HCOV 229E 4,80E-03 TCID50/mL HCOV NL63 6,00E+00 copie/μL HCOV HKU1	5,10E-02 TCID50/mL	6,00E+00 TCID50/mL

Tabella 29. Risultati del limite di rilevabilità di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. UI = Unità internazionale, TCID50 = Dose infettiva che produce effetti nel 50% delle colture tissutali.

12.3. Intervallo di misurazione

L'intervallo di misurazione del test è stato determinato analizzando una serie di diluizioni in decuplicato contenenti una concentrazione nota di RNA/DNA specifico e sintetico appartenente a SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipi A e B), parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4), coronavirus umano (229E, NL63, HKU1 e OC43), metapneumovirus e adenovirus. I risultati hanno permesso di confermare il corretto rilevamento dei target da $2E+07$ a $2E+00$ copie/ μ L, ad eccezione di HCoV-HKU1 il cui intervallo di misurazione va da $2E+06$ a $2E+00$ copie/ μ L.

In conclusione, l'intervallo di misurazione di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stato determinato con successo, garantendo risultati affidabili, accurati e riproducibili su un ampio spettro di carichi virali, confermandone l'utilità in vari scenari di diagnosi clinica.

12.4. Esattezza

12.4.1. Affidabilità (Veridicità)

La veridicità di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stata valutata analizzando il materiale di riferimento elencato di seguito addizionato a campioni nasofaringei negativi raccolti in BD™ Universal Viral Transport System.

1. Frammenti di DNA sintetico

- Frammento di DNA sintetico per il gene *ORF1* di SARS-CoV-2: NCOXPC, canale FAM.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *N* di SARS-CoV-2: NCOXPC, canale FAM.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *M1* di Flu A: YIAXPC, canale ROX.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *HA* di Flu A: HNVXPC, canale ROX.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *M1* di Flu B: YIBXPC, canale HEX.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *N* di RSV A: RSAXPC, canale Cy5.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *N* di RSV B: RSBXPC, canale Cy5.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *HN* di parainfluenza 1: PIXPC, canale FAM.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *HN* di parainfluenza 2: PIXPC, canale FAM.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *HN* di parainfluenza 3: PIXPC, canale FAM.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *F* di parainfluenza 4: PIXPC, canale FAM.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *N* di coronavirus OC43: CORXPC, canale HEX.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *N* di coronavirus-229E: CORXPC, canale HEX.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *N* di coronavirus-NL63: CORXPC, canale HEX.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *N* di coronavirus HKU1: CORXPC, canale HEX.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *F* di metapneumovirus: MPVXPC, canale ROX.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *hexon* di adenovirus: ADVXPC, canale Cy5.

Tutti i frammenti di DNA sintetico sono stati rilevati correttamente nel canale appropriato.

2. American Type Culture Collection ("ATCC®")

Codice prodotto esterno	Microorganismo	Nome del prodotto	Varietà	Risultato
VR-1986HK	SARS-CoV-2	Heat-inactivated SARS-CoV-2	2019-nCoV/USA-WA1/2020	Rilevato
VR-3276SD	SARS-CoV-2	Quantitative Synthetic SARS-CoV-2 RNA: ORF, E, N	N/A	Rilevato
VR-1986D	SARS-CoV-2	Genomic RNA from 2019 Novel Coronavirus	SARS-Related Coronavirus 2, isolato USA-WA1/2020	Rilevato
VR-95PQ	Influenza A	Influenza A virus (H1N1), Purified	A/PR/8/34	Rilevato
VR-1804PQ	Influenza B	Influenza B virus (Yamagata Lineage), Purified	B/Florida/4/2006	Rilevato
VR-26PQ	RSV-A	Human respiratory syncytial virus, High titer	Ceppo Long	Rilevato
VR-94	Parainfluenza virus 1	Human parainfluenza virus 1 (HPIV-1)	Ceppo C35	Rilevato
VR-92	Parainfluenza virus 2	Human parainfluenza virus 2 (HPIV-2)	Ceppo Greer	Rilevato
VR-93	Parainfluenza virus 3	Human parainfluenza virus 3 (HPIV-3)	Ceppo C 243	Rilevato
VR-1377	Parainfluenza virus 4	Human parainfluenza virus 4 (HPIV- 4b)	Ceppo CH 19503	Rilevato
VR-1558	Coronavirus OC43	Betacoronavirus 1	Ceppo OC43	Rilevato
VR-740	Coronavirus 229E	Coronavirus umano 229E	Ceppo 229E	Rilevato
VR-3262SD	Coronavirus HKU1	Quantitative Synthetic Human Coronavirus Strain HKU1 RNA	Ceppo HKU1	Rilevato
VR-3263SD	Coronavirus NL63	Quantitative Synthetic Human Coronavirus Strain NL63 RNA	Ceppo NL63	Rilevato
VR-3250SD	Metapneumovirus	Synthetic Human metapneumovirus RNA	N/A	Rilevato
VR-1	Adenovirus	Human adenovirus 1	Ceppo Adenoid 71	Rilevato

VR-6	Adenovirus	Human Adenovirus 6	Tipo 6 (specie C) ceppo Tonsil 99	Rilevato
VR-16	Adenovirus	Human Adenovirus 15	Tipo 15 (specie D) ceppo 305 [955, CH. 38]	Rilevato
VR-3343	Adenovirus	Human adenovirus 31	Tipo 31 (specie A) ceppo 1315/63	Rilevato

Tabella 30. Materiale di riferimento della American Type Culture Collection (ATCC®).

Tutti i ceppi della ATCC sono stati correttamente rilevati nel canale appropriato e l'EIC ha mostrato un'amplificazione con un valore di Ct ≤ 35.

3. The International Reagent Resource (IRR™)

Codice prodotto esterno	Microorganismo	Nome del prodotto	Varietà	Risultato
FR-293	RSV-B	Human Respiratory Syncytial Virus B	Ceppo 9320	Rilevato
FR-304	Coronavirus NL63	Coronavirus umano, ceppo NL63	Ceppo NL63	Rilevato
FR-1	Influenza A	Influenza A virus	A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	Rilevato
FR-3	Influenza A	Influenza A virus	A/South Dakota/6/2007 (H1N1)	Rilevato
FR-5	Influenza A	Influenza A virus	A/Hawaii/31/2007 (H1N1)	Rilevato
FR-6	Influenza A	Influenza A virus	A/Qatar/1123/2007 (H1N1)	Rilevato
FR-7	Influenza A	Influenza A virus	A/Cambodia/0371/2007 (H1N1)	Rilevato
FR-8	Influenza A	Influenza A virus	A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	Rilevato
FR-12	Influenza A	Influenza A virus	A/Taiwan/760/2007 (H3N2)	Rilevato
FR-13	Influenza A	Influenza A virus	A/Texas/71/2007 (H3N2)	Rilevato
FR-27	Influenza A	Influenza A virus	A/Brisbane/10/2007 IVR-147 (H3N2)	Rilevato
FR-28	Influenza A	Influenza A virus	A/Brisbane/59/2007 IVR-148 (H1N1)	Rilevato
FR-29	Influenza A	Influenza A virus	A/South Dakota/6/2007 X-173 (H1N1)	Rilevato
FR-201	Influenza A	Influenza A virus	A/California/07/2009 (H1N1)pdm09	Rilevato
FR-202	Influenza A	Influenza A virus	A/California/08/2009 (H1N1)pdm09	Rilevato
FR-203	Influenza A	Influenza A virus	A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09	Rilevato
FR-245	Influenza A	Influenza A virus	A/Mexico/4108/2009 (H1N1)pdm09	Rilevato

FR-246	Influenza A	Influenza A virus	A/California/07/2009 NYMC X-179A (H1N1)pdm09	Rilevato
FR-16	Influenza B	Influenza B virus	B/Pennsylvania/7/2007 (Lignaggio Yamagata)	Rilevato
FR-17	Influenza B	Influenza B virus	B/Santiago/4364/2007 (Lignaggio Yamagata)	Rilevato
FR-18	Influenza B	Influenza B virus	B/Brisbane/3/2007 (Lignaggio Yamagata)	Rilevato
FR-19	Influenza B	Influenza B virus	B/Pennsylvania/5/2007 (Lignaggio Victoria)	Rilevato
FR-20	Influenza B	Influenza B virus	B/Victoria/304/2006 (Lignaggio Victoria)	Rilevato
FR-183	Influenza B	Influenza B virus	B/Bangladesh/3333/2007 (Lignaggio Yamagata)	Rilevato
FR-294	RSV A	Human Respiratory Syncytial Virus	Ceppo A-2	Rilevato

Tabella 31. Materiale di riferimento della International Reagent Resource (IRR™).

Tutti i ceppi della IRR sono stati correttamente rilevati nel canale appropriato e l'EIC ha mostrato un'amplificazione con un valore di $Ct \leq 35$.

4. National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)

Codice prodotto esterno	Microorganismo	Nome del prodotto	Varietà	Risultato
20/146	SARS-CoV-2	First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA	Isolato England/02/2020	Rilevato
20/110	SARS-CoV-2	2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) Working Reagent for NAT	N/A	Rilevato
19/304	SARS-CoV-2	Research Reagent for SARS-CoV-2 RNA	N/A	Rilevato
08/176	Parainfluenza virus 1	Parainfluenza Virus Serotype 1	N/A	Rilevato
08/178	Parainfluenza virus 2	Parainfluenza Virus Serotype 2	N/A	Rilevato
08/180	Parainfluenza virus 4	Parainfluenza Virus Serotype 1	N/A	Rilevato
08/320	Metapneumovirus	Human Metapneumovirus Working Reagent for NAT	N/A	Rilevato
16/324	Adenovirus	First WHO International Standard for Human Adenovirus DNA	Tipo 2	Rilevato

Tabella 32. Materiale di riferimento del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

Tutti i ceppi della NIBSC sono stati correttamente rilevati nel canale appropriato e l'EIC ha mostrato un'amplificazione con un valore di $Ct \leq 35$.

5. BEI Resources

Codice prodotto esterno	Microorganismo	Nome del prodotto	Varietà	Risultato
NR-52287	SARS-CoV-2	SARS-Related Coronavirus 2	Isolato USA-WA1/2020, Gamma-Irradiated	Rilevato
NR-28530	RSV	Human Respiratory Syncytial Virus, A2000/3-4	Ceppo A2000/3-4	Rilevato
NR-22227	Metapneumovirus	Human metapneumovirus	TN/83-1211	Rilevato

Tabella 33. Materiale di riferimento della BEI Resources.

Tutti i ceppi della BEI Resources sono stati correttamente rilevati nel canale appropriato e l'EIC ha mostrato un'amplificazione con un valore di $C_t \leq 35$.

6. Materiale di controllo

Codice prodotto esterno	Microorganismo	Nome del prodotto	Varietà	Risultato
Fluarix Tetra 2022/2023	Flu A/Flu B	Influenza vaccine Fluarix Tetra 2022/2023	Flu A/Victoria/2570/2019 Flu A/Darwin/6/2021 Flu B/Austria/1359417/2021 Flu B/Phuket/3073/2013	Rilevato
Fluarix Tetra 2023/2024	Flu A/Flu B	Influenza vaccine Fluarix Tetra 2023/2024	Flu A/Victoria/4897/2022 Flu A/Darwin/6/2021 Flu B/Austria/1359417/2021 Flu B/Phuket/3073/2013	Rilevato
102019	SARS-CoV-2	Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 1	Virus SARS-CoV-2 isolato Australia/VIC01/2020	Rilevato
102024	SARS-CoV-2	Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 2	Virus SARS-CoV-2 isolato Wuhan-Hu-1	Rilevato
103907	SARS-CoV-2	Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 14	Variante UK (B.1.1.7_710528)	Rilevato
103909	SARS-CoV-2	Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 15	Variante UK (B.1.1.7_601443)	Rilevato
104043	SARS-CoV-2	Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 16	Variante sudafricana	Rilevato
104044	SARS-CoV-2	Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 17	Variante Giappone/Brasile	Rilevato
0505-0129	SARS-CoV-2	Accuplex™ SARS-CoV-2 Verification Panel	N/A	Rilevato
MBC139-R	SARS-CoV-2	AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.351 RNA CONTROL	Lignaggio B.1.351	Rilevato
MBTC030-R	SARS-CoV-2	AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 CONTROL	Lignaggio B.1.351	Rilevato

MBTC031-R	SARS-CoV-2, Flu A, Flu B ed RSV	AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV- 2/FLUA/FLUB/RSV CONTROL	Influenza A H3N2 (A/Perth/16/2009), Influenza B (B/Brisbane/60/2008), RSV (9320)	Rilevato
MBC144-R	MPV	AMPLIRUN® METAPNEUMOVIRUS RNA CONTROL	Lignaggio B1	Rilevato
SCV2_24C1B- 01	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Delta variant	Variante Delta B.1.617.2	Rilevato
SCV2_23C1D- 01	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio XBB	Rilevato
SCV2_23C1D- 02	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BQ1.1	Rilevato
SCV2_23C1D- 03	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BA.2.75	Rilevato
SCV2_23C1D- 04	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BA.5	Rilevato
SCV2_23C1D- 05	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BQ.1	Rilevato
SCV2_23C1B- 01	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BA.4	Rilevato
SCV2_23C1B- 03	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BA.5	Rilevato
SCV2_23C1B- 04	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BA.4	Rilevato
SCV2_23C1B- 05	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BA.2	Rilevato
SCV2_23C1C- 01	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BA.2.75	Rilevato
SCV2_23C1C- 02	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BQ.1	Rilevato
SCV2_23C1C- 03	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BQ1.1	Rilevato
SCV2_23C1C- 04	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio XBB	Rilevato
SCV2_23C1C- 05	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BA.2	Rilevato
SCV2_23C1A- 01	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BA.5	Rilevato
SCV2_23C1A- 02	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BA.2	Rilevato
SCV2_23C1A- 03	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BA.5	Rilevato
SCV2_23C1A- 05	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Sottolignaggio BA.4	Rilevato

ID3-09 2023	RSV	Influenza A virus	Ceppo A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)	Rilevato
359043	RSV	Human Respiratory Syncytial Virus, B	N/A	Rilevato
PINFRNA101S-06	Parainfluenza virus tipo 2	PIV-2	N/A	Rilevato
PINFRNA22S-02	Parainfluenza virus tipo 3	PIV-3	N/A	Rilevato
CVRNA22S-04	Coronavirus	Coronavirus HKU	Ceppo HKU	Rilevato
0810110CF	Adenovirus	Adenovirus Culture Fluid (Heat Inactivated) Type 2	Tipo 2 (specie C)	Rilevato
0810062CFHI	Adenovirus	Adenovirus Culture Fluid (Heat Inactivated) Type 3	Tipo 3 (specie B)	Rilevato
0810070CFHI	Adenovirus	Adenovirus Culture Fluid (Heat Inactivated) Type 4	Tipo 4 (specie E)	Rilevato
0810020CF	Adenovirus	Adenovirus Culture Fluid (Heat Inactivated) Type 5	Tipo 5 (specie C)	Rilevato
0810021CFHI	Adenovirus	Adenovirus Culture Fluid (Heat Inactivated) Type 7A	Tipo 7A (specie B)	Rilevato
0810119CFHI	Adenovirus	Adenovirus Culture Fluid (Heat Inactivated) Type 37	Tipo 37	Rilevato
0810084CFHI	Adenovirus	Adenovirus Type 40 Culture Fluid (Heat Inactivated) Strain Dugan	Tipo 40, ceppo Dugan	Rilevato
0810085CFHI	Adenovirus	Adenovirus Type 41 Culture Fluid (Heat Inactivated) Strain Tak	Tipo 41 (specie F), ceppo Tak	Rilevato
0810159CF	MPV	Human Metapneumovirus 8	Tipo B2	Rilevato

Tabella 34. Materiale di controllo per SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV, parainfluenza, coronavirus, metapneumovirus e adenovirus.

Tutti i ceppi sono stati correttamente rilevati nel canale appropriato e l'EIC ha mostrato un'amplificazione con un valore di $Ct \leq 35$.

7. Programmi di valutazione esterna della qualità (EQA)

Sono stati analizzati 85 campioni, provenienti dai programmi QCMD, INSTAND, CAP e RCPA, contenenti SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV, virus parainfluenza, coronavirus, metapneumovirus e/o adenovirus, tra altri microrganismi non target, mostrando un'elevata concordanza.

12.4.2. Precisione

Per determinare la precisione di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, sono stati eseguiti intra-test (ripetibilità), inter-test, inter-lotto e inter-termociclatore (riproducibilità) con tamponi nasofaringei raccolti con BD™ Universal Viral Transport System addizionati con i ceppi di riferimento riportati nella Tabella 28 per i target rappresentativi selezionati per ciascun canale di fluorescenza: SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV B, virus parainfluenza tipo 3, coronavirus OC43, metapneumovirus e adenovirus.

Intra-test

L'intra-test è stato effettuato analizzando sei repliche di tutti i campioni nello stesso ciclo con VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Una sintesi dei risultati è riportata nella tabella che segue.

<i>Respiratory Virus Mix I reaction tube</i>					
Target	Campioni	Canale	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
SARS-CoV-2	2xLoD	475/520 (FAM)	30,30	0,31	1,02
	5xLoD	475/520 (FAM)	29,15	0,45	1,53
	Controllo negativo	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Influenza B	2xLoD	530/565 (HEX)	32,98	0,53	1,62
	5xLoD	530/565 (HEX)	31,32	0,52	1,68
	Controllo negativo	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Influenza A	2xLoD	585/630 (ROX)	33,45	1,35	4,03
	5xLoD	585/630 (ROX)	31,37	0,67	2,15
	Controllo negativo	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
RSV	2xLoD	630/665 (CY5)	32,18	1,49	4,64
	5xLoD	630/665 (CY5)	31,02	0,56	1,79
	Controllo negativo	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	26,17	0,38	1,46
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,97	0,50	1,93
	Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	26,37	0,91	3,46

Tabella 35. Risultati intra-test di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo-soglia. ($\bar{x}$) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, N/A = non applicabile.

<i>Respiratory Virus Mix II reaction tube</i>					
Target	Campioni	Canale	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
Virus parainfluenza	2xLoD	475/520 (FAM)	32,13	0,56	1,76
	5xLoD	475/520 (FAM)	29,97	1,16	3,88
	Controllo negativo	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Coronavirus	2xLoD	530/565 (HEX)	34,23	0,73	2,14
	5xLoD	530/565 (HEX)	32,03	0,85	2,65
	Controllo negativo	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Metapneumovirus	2xLoD	585/630 (ROX)	31,53	0,66	2,09
	5xLoD	585/630 (ROX)	29,63	0,77	2,61
	Controllo negativo	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A

Adenovirus	2xLoD	630/665 (CY5)	34,35	0,10	0,31
	5xLoD	630/665 (CY5)	33,55	1,39	4,15
	Controllo negativo	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	25,72	0,53	2,08
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,57	0,61	2,39
	Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	25,63	0,23	0,91

Tabella 36. Risultati intra-test di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo-soglia. ($\bar{x}$) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, N/A = non applicabile.

Inter-test

L'inter-test è stato effettuato analizzando quattro repliche dei diversi campioni, in tre giorni diversi, da tre diversi operatori che hanno utilizzato VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Una sintesi dei risultati è riportata nella tabella che segue.

Respiratory Virus Mix I reaction tube					
Target	Campioni	Canale	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
SARS-CoV-2	2xLoD	475/520 (FAM)	30,33	0,38	1,27
	5xLoD	475/520 (FAM)	28,93	0,28	0,97
	Controllo negativo	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Influenza B	2xLoD	530/565 (HEX)	32,61	0,66	2,03
	5xLoD	530/565 (HEX)	31,55	0,46	1,45
	Controllo negativo	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Influenza A	2xLoD	585/630 (ROX)	32,94	0,99	2,99
	5xLoD	585/630 (ROX)	31,95	0,76	2,37
	Controllo negativo	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
RSV	2xLoD	630/665 (CY5)	32,80	0,74	2,27
	5xLoD	630/665 (CY5)	31,67	0,53	1,68
	Controllo negativo	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	25,90	0,25	0,95
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,99	0,40	1,55
	Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	25,84	0,31	1,21

Tabella 37. Risultati inter-test di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo-soglia. ($\bar{x}$) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, N/A = non applicabile.

Respiratory Virus Mix II reaction tube					
Target	Campioni	Canale	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
Virus parainfluenza	2xLoD	475/520 (FAM)	31,86	0,71	2,22
	5xLoD	475/520 (FAM)	30,18	0,82	2,72
	Controllo negativo	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Coronavirus	2xLoD	530/565 (HEX)	33,45	0,76	2,27
	5xLoD	530/565 (HEX)	31,56	0,96	3,04
	Controllo negativo	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Metapneumovirus	2xLoD	585/630 (ROX)	30,79	0,93	3,01
	5xLoD	585/630 (ROX)	29,68	0,88	2,97
	Controllo negativo	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A

Adenovirus	2xLoD	630/665 (CY5)	35,08	1,62	4,61
	5xLoD	630/665 (CY5)	33,20	0,77	2,33
	Controllo negativo	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	25,49	0,31	1,21
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,65	0,33	1,30
	Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	25,52	0,31	1,21

Tabella 38. Risultati inter-test di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo-soglia. ($\bar{x}$) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, N/A = non applicabile.

Inter-lotto

I valori inter-lotto sono stati determinati con sei repliche dei diversi campioni utilizzando tre lotti di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Una sintesi dei risultati è riportata nella tabella che segue.

Respiratory Virus Mix I reaction tube					
Target	Campioni	Canale	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
SARS-CoV-2	2xLoD	475/520 (FAM)	29,07	0,45	1,53
	5xLoD	475/520 (FAM)	29,14	0,59	2,01
	Controllo negativo	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Influenza B	2xLoD	530/565 (HEX)	32,58	0,64	1,95
	5xLoD	530/565 (HEX)	31,01	1,03	3,31
	Controllo negativo	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Influenza A	2xLoD	585/630 (ROX)	32,75	1,7	5,33
	5xLoD	585/630 (ROX)	31,61	1,14	3,62
	Controllo negativo	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
RSV	2xLoD	630/665 (CY5)	31,72	1,90	5,99
	5xLoD	630/665 (CY5)	30,21	1,35	4,46
	Controllo negativo	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	25,40	0,31	1,23
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,61	0,53	2,06
	Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	25,54	0,37	1,45

Tabella 39. Risultati inter-lotto di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo-soglia. ($\bar{x}$) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, N/A = non applicabile.

Respiratory Virus Mix II reaction tube					
Target	Campioni	Canale	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
Virus parainfluenza	2xLoD	475/520 (FAM)	31,45	1,20	3,82
	5xLoD	475/520 (FAM)	29,53	0,59	1,99
	Controllo negativo	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Coronavirus	2xLoD	530/565 (HEX)	32,35	0,71	2,20
	5xLoD	530/565 (HEX)	30,18	1,33	4,39
	Controllo negativo	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A

Metapneumovirus	2xLoD	585/630 (ROX)	31,66	1,00	3,16
	5xLoD	585/630 (ROX)	29,16	1,25	4,29
	Controllo negativo	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
Adenovirus	2xLoD	630/665 (CY5)	33,23	0,70	2,12
	5xLoD	630/665 (CY5)	32,83	1,06	3,23
	Controllo negativo	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	24,82	0,43	1,73
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,57	0,42	1,64
	Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	25,03	0,36	1,43

Tabella 40. Risultati inter-lotto di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo-soglia. ($\bar{x}$) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, N/A = non applicabile.

Inter- termociclatore

I valori inter-termociclatore sono stati determinati con sei repliche degli stessi campioni utilizzati per le determinazioni intra-test, inter-test e inter-lotto, utilizzando VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Questi test sono stati effettuati in due laboratori con due sistemi BD MAX™ differenti. Una sintesi dei risultati è riportata nella tabella che segue.

Respiratory Virus Mix / reaction tube					
Target	Campioni	Canale	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
SARS-CoV-2	2xLoD	475/520 (FAM)	30,30	0,29	0,96
	5xLoD	475/520 (FAM)	28,93	0,24	0,82
	Controllo negativo	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Influenza B	2xLoD	530/565 (HEX)	32,70	0,42	1,29
	5xLoD	530/565 (HEX)	31,26	0,45	1,43
	Controllo negativo	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Influenza A	2xLoD	585/630 (ROX)	33,33	1,47	4,42
	5xLoD	585/630 (ROX)	31,52	0,61	1,92
	Controllo negativo	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
RSV	2xLoD	630/665 (CY5)	32,80	0,76	2,33
	5xLoD	630/665 (CY5)	30,88	1,30	4,20
	Controllo negativo	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	35,97	0,32	1,24
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,71	0,33	1,28
	Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	25,96	0,37	1,44

Tabella 41. Risultati inter-termociclatore di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo-soglia. ($\bar{x}$) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, N/A = non applicabile.

<i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube					
Target	Campioni	Canale	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
Virus parainfluenza	2xLoD	475/520 (FAM)	31,95	0,83	2,61
	5xLoD	475/520 (FAM)	29,79	0,95	3,18
	Controllo negativo	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Coronavirus	2xLoD	530/565 (HEX)	34,26	0,74	2,15
	5xLoD	530/565 (HEX)	31,95	0,61	1,91
	Controllo negativo	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Metapneumovirus	2xLoD	585/630 (ROX)	31,59	0,50	1,58
	5xLoD	585/630 (ROX)	29,51	1,03	3,48
	Controllo negativo	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
Adenovirus	2xLoD	630/665 (CY5)	34,14	0,72	2,12
	5xLoD	630/665 (CY5)	32,31	0,36	1,13
	Controllo negativo	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	25,35	0,22	0,85
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,10	0,22	0,87
	Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	25,73	0,28	1,11

Tabella 42. Risultati inter-termociclatore di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo-soglia, ($\bar{x}$) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, N/A = non applicabile.

In conclusione, lo studio sulla precisione ha confermato l'affidabilità delle prestazioni e la coerenza di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.5. Trascinamento

La robustezza (parametro di Trascinamento o Carry-over) è stata analizzata secondo le specifiche comuni per i dispositivi IVD di classe D secondo il Regolamento (UE) 2017/746; in particolare, l'Allegato XIII, che stabilisce le specifiche comuni per i dispositivi destinati al rilevamento o alla quantificazione dei marcatori di infezione da virus SARS-CoV-2. Queste raccomandazioni si applicavano solo al target del virus SARS-CoV-2, gli altri target della provetta di reazione *Respiratory Virus Mix I* non sono stati analizzati in questo test. Tuttavia, è stato analizzato anche il virus parainfluenza tipo 3 come target della provetta di reazione *Respiratory Virus Mix II* per effettuare il test con entrambe le Master Mix.

Il tasso di contaminazione da trascinamento è stato determinato analizzando 60 repliche di tamponi nasofaringei negativi e 60 repliche di un campione di RNA di SARS-CoV-2 positivo con un alto titolo di RNA di SARS-CoV-2 (First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code: 20/146), a 1E+02 UI/mL) e un campione di RNA di virus parainfluenza umano tipo 3 positivo con un alto titolo di RNA di HPIV 3 (Human parainfluenza virus 3 (ATCC code: VR-93™), a 1E+05 TCID50/mL). In totale, sono stati effettuati cinque test di campioni positivi e negativi utilizzando un metodo di test basato sulla disposizione a scacchiera, che consente di disporre i campioni in modo alternato.

Per la provetta di reazione *Respiratory Virus Mix I*, sono stati correttamente rilevati 60 campioni positivi su 60, e 59 campioni negativi su 60 hanno dato un risultato negativo, ottenendo un tasso di concordanza del 98,33%. Per la provetta di reazione *Respiratory Virus Mix II*, tutti i campioni positivi sono stati correttamente rilevati e tutti i campioni negativi hanno dato un risultato negativo. In base ai risultati di entrambe le provette di reazione, il tasso di contaminazione crociata è stato quasi dello 0%.

12.6. Tasso di fallimento dell'intero sistema

La robustezza (parametro di tasso di fallimento dell'intero sistema) è stata analizzata secondo le indicazioni delle-specifiche comuni per i dispositivi destinati al rilevamento o alla quantificazione dei marcatori di infezione da virus SARS-CoV-2. Poiché queste raccomandazioni si applicavano solo al target del virus SARS-CoV-2, gli altri target non sono stati analizzati in questo test.

Per dimostrare che i campioni a bassa positività di RNA di SARS-CoV-2 vengono rilevati da VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, sono stati analizzati con il test VIASURE 119 tamponi nasofaringei negativi addizionati con First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code: 20/146) a una concentrazione virale equivalente a tre volte il relativo LoD (3xLoD).

I risultati dello studio indicano che tutti le repliche erano reattive per il target di RNA di SARS-CoV-2, corrispondente a un tasso di concordanza del 100%. In conclusione, il tasso di fallimento dell'intero sistema è pari a 0%.

12.7. Specificità analitica e reattività analitica

La specificità analitica e la reattività analitica di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit sono state valutate *in silico* e per via sperimentale, utilizzando diversi materiali di partenza come ceppi di riferimento certificati, RNA/DNA di riferimento certificati e materiali provenienti da programmi EQA (External Quality Assurance).

12.7.1. Specificità analitica

La specificità analitica è la capacità del test di rilevare il target previsto. Per la specificità analitica devono essere considerati due componenti: la reattività crociata e l'interferenza. La reattività crociata può verificarsi quando sono presenti sequenze correlate geneticamente nel campione di un paziente, mentre l'interferenza può verificarsi se la presenza di sostanze specifiche potenzialmente presenti nelle matrici del campione influenza le prestazioni del test RT-qPCR.

Analisi *in silico* della reattività crociata

La reattività crociata è stata valutata utilizzando sequenze di riferimento dei patogeni provenienti da NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e un software di analisi bioinformatica interno. Sono state effettuate un'analisi BLAST di ciascun primer e sonda sulla banca dati di nucleotidi NCBI GenBank e un'analisi bioinformatica interna.

Le sequenze allineate con una percentuale di allineamento inferiore all'80% di omologia sono state considerate di improbabile rivelazione. I risultati ottenuti hanno dimostrato che **tutte le sequenze analizzate presentavano una percentuale di omologia inferiore all'80% con i set di primer e sonde di SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B e RSV (tipi A e B) inclusi nella *Respiratory Virus Mix I* reaction tube e con i set di primer e sonde di parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4), coronavirus umano (229E, NL63 e HKU1), metapneumovirus e adenovirus inclusi nella *Respiratory Virus Mix II* reaction tube.**

Nel caso del Coronavirus OC43, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Coronavirus OC43

L'analisi BLAST filtrata per coronavirus OC43 (escludendo OC43, ID Tassonomia: 31631) mostra un'elevata omologia tra i primer e le sonde e il betacoronavirus 1 da ceppi di bovino, bufalo, orice, giraffa, cammello, cane, equino, suino, coniglio, antilope nera, cervo Sambar, tapiro, cervo acquatico, cobo, watusi, cervo dalla coda bianca e yak. Tuttavia, questi virus non sono stati identificati nell'uomo e al momento non sono considerati virus zoonotici, quindi non interferiscono nel rilevamento del coronavirus OC43.

Pertanto, nessuna delle sequenze analizzate, incluse quelle che presentano una percentuale di omologia superiore all'80%, può influire sul corretto rilevamento del coronavirus OC43.

In conclusione, i design di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per i target SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipi A e B), parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4), coronavirus umano (229E, NL63, HKU1 e OC43), metapneumovirus e adenovirus non dovrebbero causare falsi positivi nel rilevamento di questi microrganismi quando sono presenti altri organismi.

Specificità analitica: prova sperimentale

Reattività crociata: prova sperimentale

La reattività crociata di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stata confermata analizzando un pannello di diversi microrganismi associati alle infezioni respiratorie addizionati in tamponi nasofaringei raccolti con BD™ Universal Viral Transport System. Quando possibile e in presenza di dati sulla concentrazione, virus e batteri interferenti sono stati valutati a livelli di rilevanza medica (di solito 1E+05 - 1E+06 CFU (unità formanti colonia)/mL per i batteri e 1E+04 - 1E+05 PFU (unità formanti placca)/mL per i virus). Non è stata rilevata alcuna reattività crociata tra i microrganismi analizzati riportati di seguito, eccetto che per i microrganismi target.

Test di reattività crociata					
Adenovirus Tipo 15 (specie D), ceppo 35 [955, CH.38]	+/-	Influenza A virus A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)	+/-	SARS-CoV-2	+/-
Adenovirus Tipo 2, specie C	+/-	Influenza A Virus A/Hawaii/31/2007 (H1N1)	+/-	SARS-CoV-2	+/-
Adenovirus Tipo 3, specie B	+/-	Influenza A Virus A/Mexico/4108/2009 (H1N1)pdm09	+/-	SARS-CoV-2 B.1.1.7_601443, variante UK	+/-
Adenovirus Tipo 31 (specie A) ceppo 1315/63	+/-	Influenza A Virus A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09	+/-	SARS-CoV-2 B.1.1.7_710528, variante UK	+/-
Adenovirus Tipo 37	+/-	Influenza A Virus A/Qatar/1123/2007 (H1N1)	+/-	SARS-CoV-2 B.1.351	+/-
Adenovirus Tipo 4, specie E	+/-	Influenza A Virus A/South Dakota/6/2007 (H1N1)	+/-	SARS-CoV-2 Coronavirus 2 ceppo 2019-nCoV/USA-WA1/2020	+/-
Adenovirus Tipo 40, ceppo Dugan	+/-	Influenza A Virus A/South Dakota/6/2007 X-173 (H1N1)	+/-	SARS-CoV-2 variante Delta B.1.617.2	+/-
Adenovirus Tipo 41 (specie F), ceppo Tak	+/-	Influenza A Virus A/Taiwan/760/2007 (H3N2)	+/-	SARS-CoV-2 variante Omicron, sottolignaggio BA.2	+/-
Adenovirus Tipo 5, specie C	+/-	Influenza A Virus A/Texas/71/2007 (H3N2)	+/-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.2	+/-
Adenovirus Tipo 6 (specie C) ceppo Tonsil 99	+/-	Influenza B virus B/Bangladesh/3333/2007 (Lignaggio Yamagata)	+/-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.2	+/-
Adenovirus Tipo 7A, specie B	+/-	Influenza B virus B/Brisbane/3/2007 (Lignaggio Yamagata)	+/-	SARS-CoV-2 variante Omicron, sottolignaggio BA.2.75	+/-
Adenovirus umano DNA Tipo 2	+/-	Influenza B Virus B/Pennsylvania/5/2007 (Lignaggio Victoria)	+/-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.2.75	+/-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza B Virus B/Pennsylvania/7/2007 (Lignaggio Yamagata)	+/-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.4	+/-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza B Virus B/Santiago/4364/2007 (Lignaggio Yamagata)	+/-	SARS-CoV-2 variante Omicron, sottolignaggio BA.4	+/-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza B Virus B/Victoria/304/2006 (Lignaggio Victoria)	+/-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.4	+/-
<i>Bordetella pertussis</i> ceppo tipo	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> sottosp. <i>Pneumoniae</i> ceppo PCI 602	-	SARS-CoV-2 variante Omicron, sottolignaggio BA.5	+/-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 (ST47)	-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.5	+/-
<i>Chlamydomydia pneumoniae</i> ceppo CM-1	-	<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 (ST62)	-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.5	+/-
Coronavirus HKU	+/-	<i>Legionella pneumophila</i> sottosp. <i>Pneumophila</i> ceppo Philadelphia-1	-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.5	+/-
Coronavirus ceppo NL63	+/-	MERS-CoV Strain Florida/USA-2_Saudi Arabia_2014	-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BQ.1	+/-
Enterovirus D58 US/MO/14-18949	-	<i>Moraxella catarrhalis</i> ceppo 59632	-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BQ.1	+/-

Test di reattività crociata					
Haemophilus influenzae	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BQ1.1	+/-
Haemophilus influenzae	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ceppo PI 1428	-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BQ1.1	+/-
Haemophilus influenzae ceppo L-378	-	Parainfluenza virus tipo 2	+/-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio XBB	+/-
Human rinovirus 17 ceppo 33342	-	Parainfluenza virus tipo 3	- +/-	SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio XBB	+/-
Influenza A Virus A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	+/-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-	SARS-CoV-2 SARS-CoV-2 isolato Australia/VIC01/2020	+/-
Influenza A Virus A/Brisbane/10/2007 IVR-147 (H3N2)	+/-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ceppo RH 815	-	SARS-CoV-2 SARS-CoV-2 isolato Wuhan-Hu-1	+/-
Influenza A Virus A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	+/-	RSV A 2000/3-4	+/-	SARS-CoV-2	+/-
Influenza A Virus A/Brisbane/59/2007 IVR-148 (H1N1)	+/-	RSV ceppo A-2	+/-	<i>Staphylococcus epidermis</i> ceppo PCI 1200	-
Influenza A Virus A/California/07/2009 (H1N1)pdm09	+/-	RSV Tipo B	+/-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Influenza A Virus A/California/07/2009 NYMC X-179A (H1N1)pdm09	+/-	SARS-CoV-1 ceppo Frankfurt 1	+/-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ceppo [CIP 104225]	-
Influenza A Virus A/Cambodia/0371/2007 (H1N1)	+/-				

Tabella 43. Microrganismi patogeni di riferimento inclusi nel test di reattività crociata. Il risultato +/- si riferisce al risultato positivo o negativo ottenuto nei diversi canali a seconda del target rilevato. Nel caso in cui un microrganismo testato sia uno dei target rilevati dal dispositivo, si ottiene un risultato positivo nel canale corrispondente, ma un risultato negativo negli altri canali.

In conclusione, i risultati dei test di reattività crociata indicano un'elevata specificità di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per il rilevamento dei microrganismi target, riducendo al minimo il rischio di risultati falsi positivi. Poiché non sono state osservate amplificazioni non specifiche con altri microrganismi correlati, ciò suggerisce che il dispositivo sia in grado di distinguere accuratamente i target.

Studio di coinfezione

È stato condotto uno studio di coinfezione utilizzando i ceppi di riferimento dettagliati nella Tabella 28 per i target rappresentativi selezionati per ciascun canale di fluorescenza: SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV B, virus parainfluenza tipo 3, coronavirus OC43, metapneumovirus e adenovirus, a diverse concentrazioni, per confermare che la presenza di uno qualsiasi di essi, indipendentemente dalla concentrazione, non altera il rilevamento tra di essi. Sono stati analizzati nove campioni nasofaringei addizionati con il materiale di riferimento, un target a bassa concentrazione (3xLoD) e gli altri target a concentrazione molto alta, solitamente 1E+04 – 1E+05 unità/mL, se possibile.

I risultati confermano che il rilevamento dei microrganismi target non è alterato quando viene analizzato con *VIASURE Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System in caso di coinfezione a diverse concentrazioni.

Studio degli agenti microbici interferenti

È stato condotto uno studio sugli agenti microbici interferenti per analizzare i potenziali agenti microbici interferenti per *VIASURE Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Il test è stato effettuato su un pannello di diversi microrganismi associati alle malattie respiratorie in presenza di virus SARS-CoV-2, Influenza A e B, RSV B, virus parainfluenza tipo 3, coronavirus OC43, metapneumovirus e adenovirus (ceppi di riferimento dettagliati nella Tabella 28) a 3xLoD. Quando possibile e in presenza di dati sulla concentrazione, virus e batteri interferenti sono stati valutati a livelli di rilevanza medica (di solito 1E+05 – 1E+06 CFU (unità formanti colonia)/mL per i batteri e 1E+04 - 1E+05 PFU (unità formanti placca)/mL per i virus). Ogni analisi è stata condotta due volte per campione.

Un controllo di matrice positiva (Positive Matrix Control, PMC) e un controllo di matrice negativa (Negative Matrix Control, NMC) sono inclusi come controlli del test. Il PMC corrisponde alla matrice nasofaringea negativa addizionata con ceppi target specifici senza alcun agente microbico interferente, mentre l'NMC corrisponde alla matrice nasofaringea negativa senza alcun agente microbico interferente.

<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube e <i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube		
Nome del microrganismo	Concentrazione testata	Risultato
PMC	N/A	N.I.
NMC	N/A	N.I.
Rhinovirus umano 17	1,60E+04 TCID50/mL	N.I.
Enterovirus D58	4,00E+04 TCID50/mL	N.I.
MERS-CoV	3,55E+03 TCID50/mL	N.I.
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	3,16E+04 TCID50/mL	N.I.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,80E+03 CFU/μL	N.I.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,00E+05 CFU/mL	N.I.
<i>Candida albicans</i>	4,18E+06 CFU/mL	N.I.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3,60E+06 CFU/mL	N.I.
SARS-CoV1	5,20E+02 copie/mL	N.I.
<i>Bordetella pertussis</i>	1,20E+05 CFU/mL	N.I.
<i>Bordetella holmesii</i>	4,10E+04 CFU/mL	N.I.
<i>Bordetella parapertussis</i>	1,20E+05 CFU/mL	N.I.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,65E+04 CFU/μL	N.I.
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,00E+06 CFU/mL	N.I.
<i>Legionella pneumophila subsp. pneumophila</i>	5,60E+04 CFU/μL	N.I.
<i>Haemophilus influenzae</i>	5,20E+03 CFU/μL	N.I.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,90E+06 CFU/mL	N.I.
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	1,00E+03 copie/μL	N.I.

Tabella 44. Studio degli agenti microbici interferenti. N.I. = Nessuna interferenza.

In conclusione, non è stata osservata alcuna interferenza nel rilevamento dell'acido nucleico target con nessuno dei microrganismi testati.

Studio delle sostanze interferenti

Per analizzare l'eventuale effetto di interferenza di sostanze endogene ed esogene su VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, è stato condotto uno studio di eventuali sostanze interferenti. Sono state aggiunte in totale venti sostanze potenzialmente interferenti alla matrice nasofaringea negativa arricchita con i ceppi di riferimento dettagliati nella Tabella 28 per SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV B, virus parainfluenza tipo 3, coronavirus OC43, metapneumovirus e adenovirus e valutate con sei repliche.

Un controllo di matrice positiva (Positive Matrix Control, PMC) e un controllo di matrice negativa (Negative Matrix Control, NMC) sono inclusi come controlli del test. Il PMC corrisponde alla matrice nasofaringea negativa addizionata con ceppi target specifici senza sostanze interferenti, mentre l'NMC corrisponde alla matrice nasofaringea negativa senza sostanze interferenti né addizionata con microrganismi/ materiale di riferimento. Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

<i>Respiratory Virus Mix I reaction tube e Respiratory Virus Mix II reaction tube</i>		
Nome della sostanza	Concentrazione testata	Risultato
PMC	N/A	N.I.
NMC	N/A	N.I.
Oseltamivir	3,99E-04 mg/mL	N.I.
Zanamivir	3,30 mg/mL	N.I.
Azitromicina	1,10E-02 mg/mL	N.I.
Mupirocina	1,50E-03 mg/mL	N.I.
Tobramicina	3,30E-02 mg/mL	N.I.
Albumina	1,00E+01 mg/mL	N.I.
DNA genomico	3,50E-03 mg/mL	N.I.
Muco umano	1,00% (v/v)	N.I.
Mucina	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Trigliceridi	1,50E+01 mg/mL	N.I.
Sangue intero	1,00% (v/v)	N.I.
Carbocisteina	5,00E+00 mg/mL	N.I.
N-acetilcisteina	1,50E-01 mg/mL	N.I.
Fenilefrina	3,00E-05 mg/mL	N.I.
Fluticasone	1,26E-06 mg/mL	I
	3,15E-07 mg/mL	N.I.
Galphimia glauca, luffa operculata	1,25E+01 mg/mL	N.I.
Ossimetazolina cloridrato	1,00E-01 mg/mL	N.I.
Cloruro di sodio	9,00E-01 mg/mL	N.I.
Nicotina	3,00E-02 mg/mL	I
	7,50E-04 mg/mL	N.I.
Benzocaina	3,00E+00 mg/mL	N.I.

Tabella 45. Sostanze potenzialmente interferenti. N.I.: Nessuna interferenza segnalabile, I: Interferenza.

Diverse sostanze potenzialmente interferenti, sia endogene che esogene, sono state valutate su VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Durante il test, è stata osservata un'interferenza con fluticasone (1,26E-06 mg/mL) e nicotina (3,00E-02 mg/mL) sia in *Respiratory Virus Mix I* reaction tube che in *Respiratory Virus Mix II* reaction tube e, per valutare l'assenza dell'effetto di interferenza a concentrazioni inferiori, è stata eseguita una diluizione 1/4. I risultati ottenuti portano a concludere che, alle concentrazioni finali testate, non si osserva alcuna interferenza delle sostanze valutate.

12.7.2. Reattività analitica

La reattività analitica può essere definita come la percentuale di ceppi microbici target o di campioni di DNA/RNA che danno il risultato positivo corretto. La reattività analitica è stata studiata *in silico* e mediante analisi sperimentale.

Analisi *in silico* della reattività analitica

La reattività analitica di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stata valutata utilizzando banche dati di sequenze nucleotidiche di pubblico dominio come NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), Global Initiative on Sharing All SARS-CoV-2 Data (GISAID EpiCoV database (<https://www.gisaid.org/>)), Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID EpiFlu database (<https://www.gisaid.org/>)), Global Initiative on Sharing All RSV Data (GISAID EpiRSV database (<https://www.gisaid.org/>)) e un software di analisi bioinformatica interno, per dimostrare che i geni target possono essere correttamente rilevati dal dispositivo in fase di studio. L'analisi *in silico* del design di primer e sonde è stata eseguita attraverso l'allineamento rispetto alle sequenze disponibili nella banca dati dei nucleotidi (nr/nt). I risultati ottenuti dopo l'analisi delle sequenze incluse sono riportati nella seguente tabella:

Microorganismo	Gene	% di sequenze rilevate sperimentalmente senza discordanze	% di sequenze rilevate sperimentalmente con discordanze	Numero di sequenze allineate
SARS-CoV-2	Gene <i>N</i> , regione N1 e regione N2	98,08%	-	22.404
Influenza A	Gene <i>HA</i> + Gene <i>M1</i>	0,88%	32,92%	99.326
Influenza B	Gene <i>M1</i>	21,63%	70,58%	24.369
RSV A	Gene <i>N</i>	2,32%	80,83%	4.002
RSV B	Gene <i>N</i>	2,61%	80,11%	4.172
Parainfluenza 1 Parainfluenza 2 Parainfluenza 3 Parainfluenza 4	Gene <i>HN</i> Gene <i>HN</i> Gene <i>HN</i> Gene <i>F</i>	19,23%	-	1451

Coronavirus OC43	Gene <i>N</i>	76,32%	-	380
Coronavirus 229E	Gene <i>N</i>	0,00%*	-	266
Coronavirus NL63	Gene <i>N</i>	48,12%	-	293
Coronavirus HKU1	Gene <i>N</i>	46,51%	-	215
Metapneumovirus	Gene <i>F</i>	93,7%	-	2.144
Adenovirus A	Gene <i>hexon</i>	98,7%	-	154
Adenovirus B	Gene <i>hexon</i>	98,75%	-	718
Adenovirus C	Gene <i>hexon</i>	96,17%	-	392
Adenovirus D	Gene <i>hexon</i>	97,74%	-	310
Adenovirus E	Gene <i>hexon</i>	89,53%	-	172
Adenovirus F	Gene <i>hexon</i>	96,40%	-	250
Adenovirus G	Gene <i>hexon</i>	90,48%	-	21

Tabella 46. Analisi *in silico* della reattività analitica.

*La maggior parte delle sequenze di coronavirus 229E provenienti da NCBI GenBank incluse nell'analisi *in silico* presenta 1 o 2 discordanze che non influiscono sul corretto rilevamento del target. Inoltre, il DNA sintetico di Coronavirus 229E utilizzato durante la validazione analitica del prodotto mostra un'omologia del 100% con il set di primer e sonde, come dimostrazione sperimentale del suo corretto rilevamento.

Riassumendo, l'analisi di inclusività ha mostrato un corretto rilevamento di SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipi A e B), parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4), coronavirus (NL63, 229E, HKU1 e OC43), metapneumovirus e adenovirus con VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Reattività analitica: prova sperimentale

La reattività analitica di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per SARS-CoV-2 è stata valutata rispetto all'RNA dei seguenti ceppi addizionati in tamponi nasofaringei raccolti con BD™ Universal Viral Transport System, mostrando risultati positivi:

SARS-Related Coronavirus 2, isolato USA-WA1/2020, Gamma-Irradiated (NR-52287), Quantitative Synthetic SARS-CoV-2 RNA: ORF, E, N (VR-3276SD), Genomic RNA from 2019 Novel Coronavirus (VR-1986D), 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) Working Reagent for Nucleic Acid Amplification Testing (NAT) (NIBSC 20/110), Research Reagent for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC 19/304), Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 1 (MT007544.1): SARS-CoV-2 isolato Australia/VIC01/2020 (Twist Bioscience 102019), Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 2 (MN908947.3): SARS-CoV-2 isolato Wuhan-Hu-1 (Twist Bioscience 102024), Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 14 (B.1.1.7_710528), variante UK (Twist Bioscience 103907), Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 15 (B.1.1.7_601443), variante UK (Twist Bioscience 103909), Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 16 (EPI_ISL_678597), variante sudafricana (Twist Bioscience 104043), Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 17 (EPI_ISL_792683), variante Giappone/Brasile (Twist Bioscience 104044), Accuplex™ SARS-CoV-2 Verification Panel (SeraCare c0505-0129), AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.351 RNA CONTROL (MBC139-R), AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 CONTROL (SWAB) (MBTC030-R), AMPLIRUN TOTAL SARS-CoV-2-FluA-FluB-RSV CONTROL (MBTC031-

R), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.5 (SCV2_23C1A-01), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.2 (SCV2_23C1A-02), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.5 (SCV2_23C1A-03), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.4 (SCV2_23C1A-05), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.4 (SCV2_23C1B-01), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.5 (SCV2_23C1B-03), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.4 (SCV2_23C1B-04), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.2 (SCV2_23C1B-05), SARS-CoV-2 Variante Delta B.1.617.2 (SCV2_24C1B-01), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.2.75 (SCV2_23C1C-01), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BQ.1 (SCV2_23C1C-02), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BQ1.1 (SCV2_23C1C-03), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio XBB (SCV2_23C1C-04), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.2 (SCV2_23C1C-05), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio XBB (SCV2_23C1D-01), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BQ1.1 (SCV2_23C1D-02), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.2.75 (SCV2_23C1D-03), SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BQ.1 (SCV2_23C1D-04) e SARS-CoV-2 Variante Omicron, sottolignaggio BA.5 (SCV2_23C1D-05).

La reattività analitica di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per Influenza A è stata valutata rispetto all'RNA estratto dai seguenti ceppi, con risultati positivi:

Influenza A Virus, A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (FR-1), Influenza A Virus, A/South Dakota/6/2007 (H1N1) (FR-3), Influenza A Virus, A/Hawaii/31/2007 (H1N1) (FR-5), Influenza A Virus, A/Qatar/1123/2007 (H1N1) (FR-6), Influenza A Virus, A/Cambodia/0371/2007 (H1N1) (FR-7), Influenza A Virus, A/Brisbane/10/2007 (H3N2) (FR-8), Influenza A Virus, A/Taiwan/760/2007 (H3N2) (FR-12), Influenza A Virus, A/Texas/71/2007 (H3N2) (FR-13), Influenza A Virus, A/Brisbane/10/2007 IVR-147 (H3N2) (FR-27), Influenza A Virus, A/Brisbane/59/2007 IVR-148 (H1N1) (FR-28), Influenza A Virus, A/South Dakota/6/2007 X-173 (H1N1) (FR-29), Influenza A Virus, A/California/07/2009 (H1N1)pdm09 (FR-201), Influenza A Virus, A/California/08/2009 (H1N1)pdm09 (FR-202), Influenza A Virus, A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 (FR-203), Influenza A Virus, A/Mexico/4108/2009 (H1N1)pdm09 (FR-245), Influenza A Virus, A/California/07/2009 NYMC X-179A (H1N1)pdm09 (FR-246), Influenza A/Victoria/2570/2019 (H1N1) e/o Influenza A/Darwin/6/2021 (H3N2) (Vaccine Fluarix Tetra 2022/2023), Influenza A/Victoria/4897/2022 (H1N1) e/o Influenza A/Darwin/6/2021 (H3N2) (Vaccine Fluarix Tetra 2023/2024), AMPLIRUN TOTAL SARS-CoV-2-FluA-FluB-RSV CONTROL (Viracell MBTC031-R) e Influenza A Virus, H3/H2N2 (CAP ID3-09 2023).

La reattività analitica di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per Influenza B è stata valutata rispetto all'RNA dei seguenti ceppi, mostrando risultati positivi:

Influenza B Virus, B/Pennsylvania/7/2007 (Lignaggio Yamagata) (FR-16), Influenza B Virus, B/Santiago/4364/2007 (Lignaggio Yamagata) (FR-17), Influenza B Virus, B/Brisbane/3/2007 (Lignaggio Yamagata) (FR-18), Influenza B Virus, B/Pennsylvania/5/2007 (Lignaggio Victoria) (FR-19), Influenza B Virus, B/Victoria/304/2006 (Lignaggio Victoria) (FR-20), Influenza B Virus, B/Bangladesh/3333/2007 (Lignaggio

Yamagata) (FR-183), AMPLIRUN TOTAL SARS-CoV-2-FluA-FluB-RSV CONTROL (MBTC031-R), Influenza B/Austria/1359417/2021 e/o Influenza B/Phuket/3073/2013 (Vaccine Fluarix Tetra 2022/2023), Influenza B/Austria/1359417/2021 e/o Influenza B/Phuket/3073/2013 (Vaccine Fluarix Tetra 2023/2024).

La reattività analitica di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per RSV è stata valutata rispetto all'RNA di Virus respiratorio sinciziale umano A (ceppo A-2) (FR-294), Virus respiratorio sinciziale umano, A 2000/3-4 (NR-28530), AMPLIRUN TOTAL SARS-CoV-2-FluA-FluB-RSV CONTROL (MBTC031-R) e Virus respiratorio sinciziale umano, B (INSTAND 359043), mostrando risultati positivi.

La reattività analitica di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per parainfluenza è stata valutata rispetto all'RNA di Parainfluenza Virus sierotipo 1 (NIBSC 08/176), Parainfluenza Virus sierotipo 2 (NIBSC 08/178), Parainfluenza Virus sierotipo 4 (NIBSC 08/180), Parainfluenza Virus 2 (PINFRNA101S-06) e Parainfluenza Virus 3 (PINFRNA22S-02), mostrando risultati positivi.

La reattività analitica di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per coronavirus è stata valutata rispetto all'RNA di Quantitative Synthetic Human coronavirus ceppo NL63 RNA (VR-3263SD) e Coronavirus HKU (CVRNA22S-04), mostrando risultati positivi.

La reattività analitica di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per metapneumovirus è stata valutata rispetto all'RNA di AMPLIRUN® METAPNEUMOVIRUS RNA CONTROL (MBC144-R), Human metapneumovirus (NIBSC 08/320) e Quantitative Synthetic Human metapneumovirus hMPV RNA (VR-3250SD), mostrando risultati positivi.

La reattività analitica di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System per adenovirus è stata valutata rispetto al DNA estratto dai seguenti ceppi, con risultati positivi:

Adenovirus tipo 2, specie C (0810110CF), Adenovirus tipo 3, specie B (0810062CFHI), Adenovirus tipo 4, specie E (0810070CFHI), Adenovirus tipo 5, specie C (0810020CF), Adenovirus tipo 6 (specie C), ceppo Tonsil 99 (VR-6), Adenovirus tipo 7A, specie B (0810021CFHI), Adenovirus tipo 15 (specie D), ceppo 35 [955, CH.38] (VR-16), Adenovirus tipo 31 (specie A) ceppo 1315/63 (VR-3343), Adenovirus tipo 37 (0810119CFHI), Adenovirus tipo 40, ceppo Dugan (0810084CFHI), Adenovirus tipo 41 (specie F), ceppo Tak (0810085CFHI) e First WHO International Standard for Human Adenovirus DNA (NIBSC code: 16/324).

12.8. Tracciabilità metrologica

Questo test non è stato progettato con finalità di misurazione.

13. Caratteristiche di prestazione clinica

Le prestazioni cliniche di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono state analizzate utilizzando campioni nasofaringei raccolti dal personale infermieristico utilizzando un tampone flessibile di nylon sterile e inseriti nella provetta sterile contenente 3 mL di Universal Transport Media® (UTM®) (Copan). I risultati sono stati i seguenti:

	Sito	Tipo di campione	Flusso di lavoro	Target
1	Hospital Universitario Miguel Servet (Saragozza, Spagna)	Tamponi nasofaringei (Studio retrospettivo)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
				Influenza A
				Influenza B
				RSV (tipi A e B)
				Parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4)
				Coronavirus (OC43, NL63, 229 e HKU1)
				Metapneumovirus
				Adenovirus

Tabella 47. Sito, tipo di campione, flusso di lavoro e target.

I valori veri positivi e negativi, i valori falsi positivi e negativi, la sensibilità, la specificità, i valori predittivi positivi (PPV) e predittivi negativi (NPV), e il rapporto di probabilità (LR) di VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* 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	PPV	NPV	LR+	LR-
1	Cobas® SARS-CoV-2 & Influenza A/B assay (Roche)	SARS-CoV-2	110	733	7	6	0,95 (0,89-0,98)	0,99 (0,98-0,99)	0,94 (0,88-0,97)	0,99 (0,98-0,99)	100,3 (47,9-209,8)	0,052 (0,02-0,11)
		Influenza A	143	699	4	10	0,94 (0,88-0,97)	0,99 (0,98-0,99)	0,97 (0,93-0,99)	0,99 (0,97-0,99)	164,3 (61,8-436,8)	0,066 (0,04-0,12)
		Influenza B	29	826	0	1	0,97 (0,83-0,99)	1 (0,99-1)	1 (0,88-1)	0,99 (0,99-1)	1574 (98,4-25172)	0,048 (0,01-0,23)
	Allplex™ RV Essential Assay (Seegene)	Influenza A	143	699	4	10	0,94 (0,88-0,97)	0,99 (0,98-0,99)	0,97 (0,93-0,99)	0,99 (0,97-0,99)	164,3 (61,8-436,8)	0,066 (0,04-0,12)
		Influenza B	29	826	0	1	0,97 (0,83-0,99)	1 (0,99-1)	1 (0,88-1)	0,99 (0,99-1)	1574 (98,4-25172)	0,048 (0,01-0,23)
		RSV (tipi A e B)	60	787	6	3	0,95 (0,87-0,99)	0,99 (0,98-0,99)	0,91 (0,82-0,96)	0,99 (0,98-0,99)	125,9 (56,61-279,9)	0,048 (0,01-0,15)
		Parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4)	74	765	9	8	0,90 (0,82-0,96)	0,99 (0,98-0,99)	0,90 (0,82-0,95)	0,99 (0,98-0,99)	77,61 (40,38-149,2)	0,099 (0,05-0,19)

		Metapneumovirus	73	778	1	4	0,95 (0,87-0,99)	0,99 (0,99-1)	0,99 (0,93-0,99)	0,99 (0,98-0,99)	738,5 (104,1-5240)	0,052 (0,02-0,14)
		Adenovirus	64	786	5	1	0,99 (0,92-1)	0,99 (0,98-0,99)	0,93 (0,84-0,97)	0,99 (0,99-1)	155,8 (65-373,4)	0,015 (0,002-0,11)
	Allplex™ Respiratory Panel 3 (Seegene) + sequencing	Coronavirus (OC43, NL63, 229 e HKU1)	39	813	2	2	0,95 (0,84-0,99)	0,99 (0,99-1)	0,95 (0,84-0,99)	0,99 (0,99-1)	387,6 (96,9-1549,9)	0,049 (0,013-0,189)

Tabella 48. Valori positivi (TP) e negativi (TN) reali, valori falsi positivi (FP) e falsi negativi (FN), sensibilità, specificità, valori predittivi positivi (PPV), valori predittivi negativi (NPV) e rapporti di probabilità (LR) per VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

In conclusione, i risultati mostrano un'elevata concordanza nel rilevare SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipi A e B), parainfluenza (tipi 1, 2, 3 e 4), coronavirus (OC43, NL63, 229E e HKU1), metapneumovirus e adenovirus utilizzando VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Bibliografía

- Abu-Raya, B., Viñeta Paramo, M., Reicherz, F., & Lavoie, P. M. (2023). Why has the epidemiology of RSV changed during the COVID-19 pandemic? *EClinicalMedicine*, 61, 102089. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2023.102089>
- Bergeron, H. C., & Tripp, R. A. (2021). Immunopathology of RSV: An Updated Review. *Viruses*, 13, 2478. <https://doi.org/10.3390/v13122478>
- Buckwalter, S. P., Teo, R., Espy, M. J., Sloan, L. M., Smith, T. F., & Pritt, B. S. (2012). Real-time qualitative PCR for 57 human adenovirus types from multiple specimen sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 766–771. <https://doi.org/10.1128/JCM.05629-11>
- CDC |. (2023). *COVID-19*. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/your-health/about-covid-19.html>
- Datta, N. (2023). A review of molecular biology detection methods for human adenovirus. *AIMS Biophysics*, 10(1), 95–120. <https://doi.org/10.3934/BIOPHY.2023008>
- Fernández-Pérez, G. C., Oñate Miranda, M., Fernández-Rodríguez, P., Velasco Casares, M., Corral de la Calle, M., Franco López, Díez Blanco, M., & Cuchat, J. M. O. (2021). SARS-CoV-2: cómo es, cómo actúa y cómo se expresa en la imagen. *Radiología*, 63, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2020.10.006>
- Friedman, N., Alter, H., Hindiyeh, M., Mendelson, E., Avni, Y. S., & Mandelboim, M. (2018). Human Coronavirus Infections in Israel: Epidemiology, Clinical Symptoms and Summer Seasonality of HCoV-HKU1. *Viruses*, 10. <https://doi.org/10.3390/v10100515>
- Gaunt, E. R., Hardie, A., Claas, E. C. J., Simmonds, P., & Templeton, K. E. (2010). Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 48(8), 2940–2947. <https://doi.org/10.1128/JCM.00636-10>
- Henrickson, K. J. (2003). Parainfluenza Viruses. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 16(2), 242–264. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.242-264.2003>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19, 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Ison, M. G., & Hayden, R. T. (2016). Adenovirus. *Microbiology Spectrum*, 4(4), DMIH2-0020–2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Jansen, R. R., Schinkel, J., Koekkoek, S., Pajkrt, D., Beld, M., De Jong, M. D., & Molenkamp, R. (2011). Development and evaluation of a four-tube real time multiplex PCR assay covering fourteen respiratory viruses, and comparison to its corresponding single target counterparts. *Journal of Clinical Virology*, 51, 179–

185. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.04.010>

Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., Palese, P., Shaw, M. L., Treanor, J., Webster, R. G., & García-Sastre, A. (2018). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(3), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>

Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases*, 4(26), 1–28. <https://doi.org/10.3390/diseases4030026>

Lynch, J. P., & Kajon, A. E. (2016). Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37, 586–602. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584923>

Safiabadi Tali, S. H., LeBlance, J. J., Sadiq, Z., Oyewunmi, O. D., Camargo, C., Nikpuor, B., Armanfard, N., Sagan, S. M., & Jahanshahi-Anbuhi, S. (2021). Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(3), e00228–20.

Schuster, J. E., & Williams, J. V. (2013). Human Metapneumovirus. *Pediatrics in Review*, 34(12), 558–565.

Templeton, K. E., Scheltinga, S. A., Beersma, M. F. C., Kroes, A. C. M., & Claas, E. C. J. (2004). Rapid and Sensitive Method Using Multiplex Real-Time PCR for Diagnosis of Infections by Influenza A and Influenza B Viruses, Respiratory Syncytial Virus, and Parainfluenza Viruses 1, 2, 3, and 4. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 42(4), 1564–1569. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1564-1569.2004>

Tyrrell, carina S., Allen, J. L. Y., & Gkrania-Klotsas, E. (2021). Influenza: epidemiology and hospital management. *Medicine (Abingdon, England : UK Ed.)*, 49(12), 797–804.

Uddin, S., & Thomas, M. (2020). Human Metapneumovirus. In *StatsPearls*. StatPearls Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00226-7>

Uyeki, T. M., Hui, D. S., Zambon, M., Wentworth, D. E., & Monto, A. S. (2022). Influenza. *The Lancet*, 400, 693–706. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00982-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00982-5)

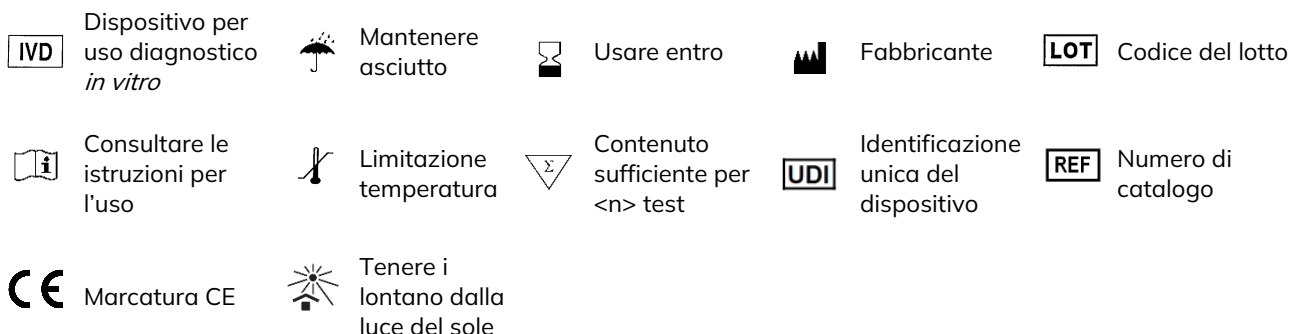
WHO | World Health Organization. (n.d.). *Respiratory Syncytial Virus (RSV) disease*. Retrieved August 10, 2023, from <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccine-standardization/respiratory-syncytial-virus-disease>

WHO | World Health Organization. (2023a). *Coronavirus disease (COVID-19)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-(covid-19))

WHO | World Health Organization. (2023b). *Influenza (Seasonal)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))

Zeng, Z.-Q., Chen, D.-H., Tan, W.-P., Qiu, S.-Y., Xu, D., Liang, H.-X., Chen, M.-X., Li, X., Lin, Z.-S., Liu, W.-K., & Zhou, R. (2018). Epidemiology and clinical characteristics of human coronaviruses OC43, 229E, NL63, and HKU1: a study of hospitalized children with acute respiratory tract infection in Guangzhou, China. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37, 363–369. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3144-z>

Simboli per reagenti e componenti IVD



Marchi commerciali

BD MAX™ è un marchio commerciale registrato di Becton, Dickinson and Company.

Diritti di modifica riservati. Tutti i diritti riservati. © Certest Biotec, S.L.

Tutti gli altri marchi che possono apparire in questo foglietto illustrativo sono di proprietà dei rispettivi proprietari.



Certest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1, 50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spagna)

Tel. (+34) 976 520 354 | viasure@certest.es | www.certest.es

Informazioni sullo sponsor in Australia

Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road.

Macquarie Park NSW 2113, Australia

Informazioni sullo sponsor in Nuova Zelanda

Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive.

Mt. Wellington Auckland 1060, Nuova Zelanda

Controllo modifiche		
Versione N.	Modifiche	Data
00	Versione originale Questa versione è una traduzione del documento originale in inglese: IUo-444221en0825.00	01/08/2025

Tabella A2. Tabella di controllo delle modifiche.

Revisione: 1 Agosto 2025

VIASURE

by **certest**



Certest Biotec, S.L.

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



(+34) 976 520 354



viasure@certest.es



www.certest.es

certest

F-566 rev.03

Modification rights reserved. All rights reserved. © Certest Biotec, S.L.
The products, services and data set out in this document may suffer changes
and/or variations on the texts and pictures shown.