

REF 300901 NeuMoDx™ FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip

R only

ATTENZIONE: solo per l'esportazione negli Stati Uniti

IVD Per uso diagnostico *in vitro* con i NeuMoDx 288 e NeuMoDx 96 Molecular Systems



La versione elettronica è disponibile all'indirizzo www.qiaqen.com/neumodx-ifu

Per istruzioni dettagliate, fare riferimento al Manuale dell'operatore del NeuMoDx 288 Molecular System; P/N 40600108

Per istruzioni dettagliate fare riferimento al Manuale dell'operatore del NeuMoDx 96 Molecular System; P/N 40600317

USO PREVISTO

Il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è un test diagnostico di RT-PCR real-time *in vitro* multiplex per la rilevazione qualitativa simultanea alla differenziazione dell'RNA del virus dell'influenza A (Flu A), del virus dell'influenza B (Flu B), del virus respiratorio sinciziale (Respiratory Syncytial Virus, RSV) e del SARS-CoV-2 da campioni di tampone nasofaringeo raccolti in terreno di trasporto da soggetti con segni e sintomi di sindrome simil-influenzale (Influenza like illness, ILI).

Il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay eseguito sul NeuMoDx 288 Molecular System e sul NeuMoDx 96 Molecular System integra l'estrazione automatizzata dell'RNA per isolare gli acidi nucleici target dal campione e la RT-PCR real-time prendendo come target una singola regione conservata per Flu A e RSV, e due regioni conservate per SARS-CoV-2 e Flu B.

I risultati di questo test non dovranno essere impiegati come unica base per la diagnosi, il trattamento o per adottare altre decisioni in merito alla gestione del paziente. I risultati positivi sono indicativi della presenza di SARS-CoV-2 e/o Flu A e/o Flu B e/o RSV RNA, ma non escludono un'infezione batterica o una coinfezione con altri virus. Per determinare lo stato di infezione del paziente sono necessarie la correlazione clinica con l'anamnesi del paziente e altre informazioni diagnostiche.

Risultati negativi non escludono la presenza di infezione da Flu A, Flu B, RSV o SARS-CoV-2 e non dovranno essere impiegati come unica base per la diagnosi, il trattamento o per adottare altre decisioni in merito alla gestione del paziente. I risultati negativi devono essere combinati con le osservazioni cliniche, l'anamnesi del paziente e/o le informazioni epidemiologiche.

Il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è destinato all'uso da parte del personale dei laboratori clinici addestrato e formato in maniera specifica nelle tecniche delle procedure diagnostiche RT-PCR real-time e *in vitro* e/o dei NeuMoDx Molecular Systems. Il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay non è destinato all'autodiagnosi o all'uso presso i punti di assistenza.

SOMMARIO E SPIEGAZIONI

Il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è un esame qualitativo da utilizzare sui sistemi di strumenti NeuMoDx 96 e NeuMoDx 288 per la rilevazione di SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, e/o RSV RNA in campioni di tampone nasofaringeo. L'esame non distingue tra l'RNA di RSV A e RSV B. I campioni di tampone nasofaringeo vengono raccolti nel Copan Universal Transport Medium (UTM-RT®) (Copan UTM-RT, Copan, CA, USA) o nel BD™ Universal Viral Transport System (UVT) (BD™ UVT, BD, NJ, USA). Il test utilizza un controllo di elaborazione dei campioni (Sample Process Control, SPC2) interno dell'RNA che viene integrato durante la preparazione del campione e serve a monitorare l'intero processo di preparazione del campione, trascrizione inversa e amplificazione mediante PCR. Il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay consente fino a due flussi di lavoro di elaborazione del campione in base alle esigenze del laboratorio: un flusso di lavoro diretto e un flusso di lavoro pretrattato. Il NeuMoDx Molecular System esegue automaticamente tutti i passaggi necessari per estrarre gli acidi nucleici target, prepara l'RNA isolato per la reazione a catena della polimerasi con trascrittasi inversa (RT-PCR) real-time e, se presenti, retrotrascrive, amplifica e rileva i prodotti dell'amplificazione. Il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 assay ha come target le regioni conservate dei geni della Nsp2 e della O-ribosio metiltransferasi del SARS-CoV-2, le regioni della proteina di matrice del virus dell'influenza A e del virus respiratorio sinciziale, e i geni della proteina di matrice e della proteina non strutturale NS1 del virus dell'influenza B.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Lo stato dell'arte attuale per la rilevazione di un'infezione acuta da FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 è l'amplificazione dell'acido nucleico di regioni conservate all'interno del genoma target, in allineamento con la PCR real-time con trascrizione inversa impiegata dal NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay eseguito sul NeuMoDx 288 Molecular System e NeuMoDx 96 Molecular System.

Il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay combina l'estrazione automatizzata dell'RNA e l'amplificazione/rilevazione dell'RNA di SARS-CoV-2, Flu A, Flu B e/o RSV mediante RT-PCR real-time. I campioni di tampone nasofaringeo vengono raccolti nel Copan UTM-RT System o nel BD™ UVT System. Il flusso di lavoro Diretto consente di fornire di codice a barre e di caricare la provetta di raccolta primaria del tampone o un'aliquota del terreno di trasporto in una provetta secondaria sul NeuMoDx System per l'elaborazione. In alternativa, il campione di tampone nel terreno di trasporto può essere pretrattato con un uguale volume di NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer (VVLB) prima di essere caricato sul sistema senza ulteriore intervento. Il NeuMoDx System aspira automaticamente un'aliquota del campione da miscelare con il NeuMoDx Lysis Buffer 3 per il flusso di lavoro Diretto oppure un'aliquota di campione pretrattato da miscelare con il Lysis Buffer 2 e i reagenti contenuti nella NeuMoDx Extraction Plate per iniziare l'elaborazione. In particolare, con il flusso di lavoro Diretto, la provetta di raccolta primaria (con il tampone e il tappo rimossi), o un'aliquota del terreno del campione in una provetta secondaria, viene fornita di codice a barre e caricata sul NeuMoDx System utilizzando uno specifico portaprovette per campioni. Per il flusso di lavoro Pretrattato, il campione nel terreno di trasporto viene pretrattato con un uguale volume di NeuMoDx VVLB prima di essere caricato sul sistema. Per il flusso di lavoro Diretto, un'aliquota di 400 µl di campione viene aspirata dal NeuMoDx System e miscelata con un uguale volume di NeuMoDx Lysis Buffer 3, mentre per il flusso di lavoro Pretrattato, 550 µl di campione pretrattato vengono combinati con un uguale volume di Lysis Buffer 2. Il NeuMoDx System automatizza e integra l'estrazione e la concentrazione dell'RNA, la preparazione dei reagenti, l'amplificazione e la rilevazione dell'acido nucleico delle sequenze target mediante RT-PCR real-time. Il controllo di elaborazione dei campioni (Sample Process Control, SPC2) consente di monitorare la presenza di potenziali sostanze inibitorie nonché gli errori di sistema, processo o reagente. Una volta caricato il campione sul NeuMoDx System non è necessario alcun intervento dell'operatore.

Il NeuMoDx System utilizza una combinazione di calore, enzima litico e reagenti di estrazione per eseguire automaticamente la lisi, l'estrazione dell'RNA e l'eliminazione degli inibitori. Gli acidi nucleici rilasciati vengono catturati da particelle paramagnetiche. Le particelle con l'acido nucleico legato sono caricate nella NeuMoDx Cartridge, dove gli elementi non legati vengono rimossi tramite lavaggio con il NeuMoDx Wash Reagent. L'RNA legato viene quindi eluito utilizzando il NeuMoDx Release Reagent. Il NeuMoDx System utilizza quindi l'RNA eluito per reidratare i reagenti di amplificazione di proprietà NeuDry™ contenenti tutti gli elementi necessari per l'amplificazione dei target di Flu A, Flu B, RSV, SARS-CoV-2 e per l'SPC2. Ciò consente l'amplificazione simultanea alla rilevazione di tutti i target e delle sequenze di RNA del controllo di elaborazione dei campioni. Dopo la ricostituzione dei reagenti RT-PCR essiccati, il NeuMoDx System dispensa la miscela pronta per RT-PCR in una camera PCR (per campioni) della NeuMoDx Cartridge. Trascrizione inversa, amplificazione e rilevazione delle sequenze di controllo e target (se presenti) si verificano nella camera PCR. La NeuMoDx Cartridge è progettata per contenere l'amplicone generato dopo la RT-PCR, eliminando sostanzialmente il rischio di contaminazione post-amplificazione.

I target amplificati vengono rilevati in tempo reale utilizzando la chimica delle sonde a idrolisi (comunemente nota come chimica TaqMan®) che si avvale di molecole di sonde oligonucleotidiche fluorogeniche specifiche per gli ampliconi dei rispettivi target. Le sonde TaqMan sono costituite da un fluoroforo legato covalentemente all'estremità 5' della sonda oligonucleotidica e da un quencher all'estremità 3'. Mentre la sonda è intatta, il fluoroforo e il quencher sono in prossimità, consentendo alla molecola quencher di sopprimere la fluorescenza emessa dal fluoroforo tramite Trasferimento di energia per risonanza di Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

Le sonde TaqMan sono progettate in modo tale da eseguire l'annealing all'interno di una regione del cDNA amplificata da un set specifico di primer. Quando la Taq DNA polimerasi estende il primer e sintetizza il nuovo filamento, l'attività di esonucleasi 5'-3' della Taq DNA polimerasi degrada la sonda che ha eseguito l'annealing allo stampo. La degradazione della sonda rilascia il fluoroforo e spezza la prossimità con il quencher, superando quindi l'effetto di smorzamento dovuto al FRET e consentendo la rilevazione del fluoroforo. Il segnale di fluorescenza risultante rilevato nel termociclatore per RT-PCR del NeuMoDx System è direttamente proporzionale al fluoroforo rilasciato e può essere correlato alla quantità di target presente.

Il canale di rilevazione della fluorescenza per ogni target del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è presentato nella tabella sottostante. Il software del NeuMoDx System monitora il segnale fluorescente emesso dalle sonde TaqMan alla fine di ogni ciclo di amplificazione. Quando la ciclizzazione termica è completa, il software del NeuMoDx System analizza i dati e riporta un risultato (POSITIVE (POSITIVO)/NEGATIVE (NEGATIVO)/INDETERMINATE (INDETERMINATO)/NO RESULT (NESSUN RISULTATO)/UNRESOLVED (IRRISOLTO)).

Tabella 1. Canali di rilevazione

Target	Regione target	Fluoroforo della sonda	Eccitazione/Emissione	Canale di rilevazione
Influenza A	Proteina di matrice	FAM	530/555 nm	Verde
Influenza B	Proteina di matrice	HEX	470/510 nm	Giallo
	Proteina non strutturale NS1			
SARS-CoV-2	Gene Nsp2	Texas Red	585/610 nm	Arancione
	O-ribosio metiltransferasi			
Virus respiratorio sinciziale	Proteina di matrice	Q705	680/715 nm	Rosso intenso
SPC2	Proteina di assemblaggio (MS2)	Q670	625/660 nm	Rosso

REAGENTI/MATERIALI DI CONSUMO

Materiali in dotazione

RIF	Contenuto	Unità per confezione	Test per unità	Test per confezione
300901	NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip <i>Reagenti RT-PCR essiccati contenenti sonde TaqMan e primer specifici per FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 insieme a sonda TaqMan e primer specifici per SPC2. Contiene 21,1% Tris-HCl, 8,4% dNTP e altri ingredienti inattivi</i>	6	16	96

Materiali necessari ma non in dotazione (disponibili separatamente da NeuMoDx)

RIF	Contenuto
901200	NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Controls <i>Set monouso di controlli di FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 positivi e negativi per stabilire la validità giornaliera del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay (1 fiala di ciascun controllo = 1 set)</i>
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Particelle paramagnetiche, enzima litico e controlli di elaborazione dei campioni essiccati</i>
400500**	NeuMoDx Lysis Buffer 2
400600*	NeuMoDx Lysis Buffer 3
401500**	NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Puntali Hamilton® CO-RE / CO-RE II (300 µL) con filtri
235905	Puntali Hamilton CO-RE / CO-RE II (1000 µL) con filtri

* Richiesti solo per l'elaborazione dei campioni con il flusso di lavoro Diretto, senza un passaggio di pretrattamento. Vedere la sezione "Istruzioni per l'uso" di seguito.

** Richiesti solo per l'elaborazione dei campioni con il flusso di lavoro Pretrattato, con un passaggio di pretrattamento. Vedere la sezione "Istruzioni per l'uso" di seguito.

Tamponi e terreni di trasporto (non in dotazione)

Tipo di campione	Dispositivo di raccolta consigliato	Tampone consigliato
Tampone nasofaringeo	3 ml di Universal Transport Medium (Copan UTM-RT, Copan, CA, USA, 305C)	Flexible Minitip Nylon® Flocked Swab (Copan, CA, USA)
	3 ml di Universal Viral Transport System (BD UVT, BD, NJ, USA, BD 220531)	Flexible Minitip Flocked Swab (BD, NJ, USA)

Strumentazione richiesta

NeuMoDx 288 Molecular System [RIF 500100] o **NeuMoDx 96 Molecular System** [RIF 500200]
NeuMoDx System Software versione 1.9.2.6 o superiore



AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è destinato all'uso diagnostico *in vitro* solo con i NeuMoDx Systems.
- Non utilizzare i reagenti o i materiali di consumo dopo la data di scadenza indicata.
- Non utilizzare alcun reagente se il sigillo di sicurezza è rotto o se la confezione risulta danneggiata all'arrivo.
- Non utilizzare i materiali di consumo o i reagenti se il sacchetto di protezione appare aperto o rotto all'arrivo.
- Il volume minimo del campione delle aliquote secondarie dipende dalle dimensioni della provetta/dal portaprovette per campioni come definiti di seguito. Un volume di campione al di sotto del minimo specificato può generare un errore "Quantity Not Sufficient" (Quantità non sufficiente).
- L'uso di campioni conservati a temperature non corrette oppure oltre i tempi di stoccaggio specificati può produrre risultati non validi o errati.
- Evitare la contaminazione microbica e da ribonucleasi (RNasi) di tutti i reagenti e i materiali di consumo. In caso di utilizzo di una provetta secondaria, si raccomanda l'uso di pipette di trasferimento monouso sterili prive di RNasi. Utilizzare una nuova pipetta per ciascun campione.
- Per evitare la contaminazione, non manipolare o spezzare nessuna NeuMoDx Cartridge dopo l'amplificazione. In nessun caso recuperare le NeuMoDx Cartridge dal contenitore dei materiali di scarto a rischio biologico (NeuMoDx 288 Molecular System) o dal recipiente materiali di scarto a rischio biologico (NeuMoDx 96 Molecular System). La cartuccia NeuMoDx Cartridge è stata progettata in modo da prevenire la contaminazione.
- Nei casi in cui dal laboratorio siano condotti anche test per PCR in provetta aperta, è necessario assicurarsi che la NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip, i materiali di consumo e i reagenti aggiuntivi necessari per i test, i dispositivi di protezione individuale come guanti e camici da laboratorio e il NeuMoDx System non siano contaminati.
- Durante la manipolazione dei reagenti e dei materiali di consumo NeuMoDx, è necessario indossare guanti in nitrile, puliti e privi di polvere. Prestare attenzione a non toccare la superficie superiore della NeuMoDx Cartridge, la superficie del sigillante della NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip e della NeuMoDx Extraction Plate o la superficie superiore del contenitore del NeuMoDx Lysis Buffer; la manipolazione dei materiali di consumo e dei reagenti deve essere effettuata toccando solo le superfici laterali.
- È necessario elaborare i NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Controls [RIF 901200] ogni 24 ore per tutta la fase di test con il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.
- Per ogni reagente vengono fornite le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) (se applicabile) all'indirizzo www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Lavarsi bene le mani dopo avere eseguito il test.
- Non pipettare con la bocca. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni o i reagenti.
- Maneggiare sempre i campioni come se fossero infetti e applicando procedure di laboratorio sicure come quelle descritte in pubblicazioni quali *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹ e nel Documento M29-A4² del Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Quando si lavora con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza (SDS).
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i materiali di scarto in conformità alle normative nazionali, federali, provinciali, regionali e locali.

NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip



Contiene: acido bórico; nonilfenolo etossilato. Pericolo! Causa irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Può nuocere alla fertilità o al feto. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Procurarsi le istruzioni speciali prima dell'uso. Non manipolare finché non sono state lette e comprese tutte le precauzioni di sicurezza. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. Se esposti o coinvolti: consultare un medico. Conservare sotto chiave. Smaltire il prodotto/contenitore in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti.

Informazioni di emergenza

CHEMTREC

Fuori da Stati Uniti e Canada +1 703-527-3887

Smaltimento

Il prodotto contiene nonilfenolo etossilato, una sostanza che altera il sistema endocrino e può avere effetti negativi sull'ambiente.

Smaltire come rifiuto pericoloso in conformità alle normative locali e nazionali. Questo vale anche per i prodotti non utilizzati.

Non smaltire i rifiuti liquidi nelle fognature.

Seguire le raccomandazioni contenute nella scheda di sicurezza (SDS).



STOCCAGGIO, MANIPOLAZIONE E STABILITÀ DEL PRODOTTO

- Le NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips sono stabili nell'imballaggio primario fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del prodotto, se conservate a una temperatura compresa tra 15 °C e 28 °C.
- Non ricaricare alcun prodotto di test che sia stato caricato in precedenza su un altro NeuMoDx System.
- Una volta caricata, la NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip può restare a bordo del NeuMoDx System per 14 giorni. Il periodo di validità residuo delle strisce reattive caricate è tracciato dal software e segnalato all'utente in tempo reale. La rimozione di una striscia reattiva utilizzata oltre il periodo consentito sarà richiesta dal NeuMoDx System.

PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Trattare tutti i campioni come se fossero potenziali mezzi di trasmissione di agenti infettivi.

- I campioni dovranno essere raccolti con il Copan UTM-RT® System o il BD™ UVT System utilizzando i tamponi floccati in nylon convalidati (vedere Tamponi e terreni di trasporto). Sono accettabili anche i tipi di tampone floccato, in poliestere e in nylon. Seguire le istruzioni del produttore per il prelievo, il trasporto e la conservazione dei campioni.
- I campioni possono essere testati in provette per la raccolta primarie o in provette per campioni secondarie compatibili.
- I campioni possono essere conservati sul NeuMoDx System per un massimo di 8 ore prima dell'elaborazione. Se è necessario un tempo di conservazione maggiore, si raccomanda di mettere i campioni in frigorifero o di congelarli come aliquote secondarie.
- I campioni preparati devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C per non più di 7 giorni prima del test.
- Se i campioni vengono spediti, devono essere imballati ed etichettati in conformità alle normative locali e/o internazionali applicabili.
- Procedere con la sezione *Preparazione del test*.

PREPARAZIONE DEL TEST

Il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay consente due tipi di flusso di lavoro, a seconda della preferenza dell'utente o del laboratorio:

Flusso di lavoro 1: **DIRECT** (DIRETTO): il campione di tampone in terreno di trasporto viene caricato direttamente sul NeuMoDx System in una provetta di raccolta primaria o in una provetta per campioni secondaria

- o -

Flusso di lavoro 2: **PRETREATED** (PRETRATTATO): il campione di tampone in terreno di trasporto viene pretrattato con il NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer prima del caricamento sul NeuMoDx System in una provetta di raccolta primaria o in una provetta per campioni secondaria

Preparazione del test: flusso di lavoro DIRECT (diretto) per campioni di tampone diretti

- Applicare un'etichetta con codice a barre del campione su una provetta per campioni compatibile con il NeuMoDx System, come descritto al punto 3 riportato di seguito.
- Se il test del campione viene eseguito nella provetta di raccolta primaria, collocare la provetta con l'etichetta con codice a barre in un portaprovette per campioni e accertarsi che il tappo e il tampone vengano rimossi prima del caricamento sul NeuMoDx System.
- In alternativa, un'aliquota del terreno di trasporto può essere trasferita a una provetta secondaria con codice a barre e collocata in un portaprovette per campioni. Se si utilizza una provetta secondaria, trasferire un'aliquota del terreno di trasporto nella provetta per campioni con codice a barre compatibile con il NeuMoDx System secondo i volumi definiti di seguito:
 - Portaprovette per campioni (32 provette): 11-14 mm di diametro e 60-120 mm di altezza; volume di riempimento minimo $\geq 600 \mu\text{l}$
 - Portaprovette per campioni (24 provette): 14,5-18 mm di diametro e 60-120 mm di altezza; volume di riempimento minimo $\geq 1000 \mu\text{l}$
 - Portaprovette per campioni a volume ridotto (32 provette): provetta per microcentrifuga a fondo conico da 1,5 ml; volume di riempimento minimo $\geq 500 \mu\text{l}$

Preparazione del test: flusso di lavoro PRETREATED (pretrattato) per campioni di tampone pretrattati

Nota: portare il Vantage Viral Lysis Buffer a temperatura ambiente (15-30 °C) prima dell'uso.

AVVERTENZA: il pretrattamento dei campioni di tampone con il NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer non garantisce l'inattivazione di eventuali virus presenti. Tutti i campioni devono essere trattati come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.

1. Pretrattare il terreno di trasporto dei campioni con un volume 1:1 di NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer. Se il volume del terreno di trasporto è noto, tale operazione può essere eseguita nella provetta di raccolta primaria del tampone. In alternativa, il pretrattamento può essere eseguito in una provetta secondaria combinando un'aliquota del terreno di trasporto con un uguale volume di NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer. La miscela che ne risulta deve soddisfare i requisiti di volume minimo specificati al punto 4 riportato di seguito.
2. Miscelare con delicatezza usando una pipetta per garantire la distribuzione uniforme del NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer.
3. Se il test del campione pretrattato viene eseguito nella provetta di raccolta primaria, collocare la provetta con l'etichetta con codice a barre in un portaprovette per campioni e accertarsi che il tappo e il tampone vengano rimossi prima del caricamento sul NeuMoDx System.
4. Se si utilizza una provetta secondaria, trasferire un'aliquota del campione pretrattato in una provetta per campioni con codice a barre compatibile con il NeuMoDx System e collocarla in un portaprovette per campioni secondo i volumi definiti di seguito:
 - Portaprovette per campioni (32 provette): 11-14 mm di diametro e 60-120 mm di altezza; volume di riempimento minimo $\geq 750 \mu\text{l}$
 - Portaprovette per campioni (24 provette): 14,5-18 mm di diametro e 60-120 mm di altezza; volume di riempimento minimo $\geq 1100 \mu\text{l}$
 - Portaprovette per campioni a volume ridotto (32 provette): provetta per microcentrifuga a fondo conico da 1,5 ml; volume di riempimento minimo $\geq 650 \mu\text{l}$

Funzionamento del NeuMoDx System

Per istruzioni dettagliate, fare riferimento ai manuali dell'operatore del NeuMoDx 288 e del 96 Molecular System (P/N 40600108 e 40600317)

1. Caricare l'ordine di test sul NeuMoDx System in base al flusso di lavoro utilizzato per la preparazione del test:
 - I campioni di tampone non diluiti non trattati preparati utilizzando il flusso di lavoro DIRECT (diretto) vengono testati definendo il campione come "Transport Medium" (Terreno di trasporto)
 - I campioni di tampone pretrattati con il NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer mediante il flusso di lavoro PRETREATED (pretrattato) vengono testati definendo il campione come "UserSpecified1" (Specificato dall'utente 1)Se non è definito nell'ordine di test, verrà utilizzato come impostazione predefinita il tipo di campione Transport Medium (Terreno di trasporto) (flusso di lavoro diretto) in una **Secondary Tube** (Provetta secondaria).
2. Inserire una o più NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips in uno o più supporti per strisce reattive NeuMoDx System e usare il touchscreen per caricare tali supporti per strisce reattive nel NeuMoDx System.
3. Se richiesto dal software del NeuMoDx System, aggiungere i materiali di consumo necessari ai supporti dei materiali di consumo del NeuMoDx System e utilizzare il touchscreen per caricare i supporti nel NeuMoDx System.
4. Se richiesto dal software del NeuMoDx System, sostituire il NeuMoDx Wash Reagent e/o il NeuMoDx Release Reagent e svuotare i rifiuti di adescamento, il contenitore dei materiali di scarto a rischio biologico (solo NeuMoDx 288 Molecular System), il recipiente dei puntali di scarto (solo NeuMoDx 96 Molecular System) e/o il recipiente dei materiali di scarto a rischio biologico (solo NeuMoDx 96 Molecular System), secondo necessità.
5. Caricare le provette per campioni in un portaprovette per campioni e assicurarsi che da tutte le provette siano stati rimossi i tappi e i tamponi.
6. Posizionare i portaprovette sul ripiano del caricatore automatico e utilizzare il touchscreen per caricare il o i portaprovette nel NeuMoDx System. In tal modo verrà avviata l'elaborazione dei campioni caricati per i test identificati, a condizione che nel sistema sia presente un ordine di test valido.

LIMITAZIONI

1. La NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip può essere utilizzata solo sui NeuMoDx Systems.
2. Le prestazioni della NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip sono state stabilite con campioni di tampone nasofaringeo raccolti da medici in terreno di trasporto. L'uso della NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip con altri tipi di campione e altri terreni di raccolta non è stato valutato e le caratteristiche delle prestazioni non sono note.
3. Poiché la rilevazione dei target virali dipende dal numero di particelle virali presenti nel campione, l'affidabilità dei risultati dipende dalla correttezza delle operazioni di prelievo, manipolazione e conservazione dei campioni.
4. Eventuali risultati errati potrebbero essere dovuti al fatto di non aver eseguito correttamente il prelievo, il trattamento o la conservazione dei campioni, a errori tecnici o a scambi di provette per campioni. Inoltre, potrebbero verificarsi falsi negativi se il numero di particelle virali nel campione è al di sotto del limite di rilevazione del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.
5. Il NeuMoDx System è destinato a essere utilizzato esclusivamente da personale addestrato all'uso del NeuMoDx System.
6. Se non si amplificano sia i target Flu A, Flu B, RSV e SARS-CoV-2 che il target SPC2, si otterrà un risultato non valido (Indeterminate (Indeterminato) o Unresolved (Irrisolto)) e sarà necessario ripetere il test.
7. Se si verifica un errore di sistema prima del completamento dell'elaborazione del campione, comparirà "No Result" (Nessun risultato) e si dovrà ripetere il test.

8. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di virus vitali dell'influenza A, dell'influenza B, del SARS-CoV-2 e/o dell'RSV. Un risultato positivo, però, suggerisce la presenza di RNA del virus dell'influenza A, dell'influenza B, del SARS-CoV-2 e/o dell'RSV.
9. Eventuali delezioni o mutazioni nelle regioni conservate prese come target dal NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay possono influire sulla rilevazione e portare a un risultato errato.
10. I risultati del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay dovranno essere impiegati in aggiunta alle osservazioni cliniche e ad altre informazioni disponibili al medico.
11. Si raccomandano buone pratiche di laboratorio, compreso il cambio di guanti tra una manipolazione dei campioni dei pazienti e quella successiva, per evitare la contaminazione.

RISULTATI

I risultati disponibili possono essere visualizzati o stampati dalla scheda "Results" (Risultati) nella finestra Results (Risultati) sul touchscreen del NeuMoDx System. I risultati del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay vengono generati automaticamente dal software del NeuMoDx System utilizzando l'algoritmo decisionale e i parametri di elaborazione dei risultati specificati nel file di definizione esame NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 (FluA-B-RSV-CoV-2 ADF versione 4.0.0 o superiore). Un risultato del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay può essere riportato come Negative (Negativo), Positive (Positivo), Indeterminate (Indeterminato), No Result (Nessun risultato) o Unresolved (Irrisolto) in base allo stato di amplificazione dei target e all'SPC2. I risultati sono riportati sulla base dell'algoritmo decisionale per l'elaborazione dei risultati dell'ADF, riepilogato nella *Tabella 2* di seguito.

Tabella 2. Interpretazione dei risultati del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay

RISULTATO COMPLESSIVO	TARGET 1 (Flu A) FAM	TARGET 2 (Flu B) HEX	TARGET 3 (SARS-CoV-2) TX RED	TARGET 4 (RSV) Rosso intenso	CONTROLLO DI ELABORAZIONE (Sample Process Control, SPC2) Rosso	INTERPRETAZIONE
POSITIVE (POSITIVO) (RNA target rilevato)	AMPLIFIED (AMPLIFICATO) [5 ≤ Ct < 25 AND (E) EPR > 2,0 AND (E) EP ≥ 750] OR (OPPURE) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP ≥ 750)	N/A	N/A	N/A	N/A	Rilevato RNA di Flu A
	N/A	AMPLIFIED (AMPLIFICATO) [5 ≤ Ct < 28 AND (E) EPR > 1,5 AND (E) EP ≥ 600] OR (OPPURE) [28 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP ≥ 600]	N/A	N/A	N/A	Rilevato RNA di Flu B
	N/A	N/A	AMPLIFIED (AMPLIFICATO) [5 ≤ Ct < 25 AND (E) EPR > 1,5 AND (E) EP ≥ 1200] OR (OPPURE) [25 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP ≥ 1200]	N/A	N/A	Rilevato RNA di SARS-CoV-2
	N/A	N/A	N/A	AMPLIFIED (AMPLIFICATO) [5 ≤ Ct < 30 AND (E) EPR > 1,15 AND (E) EP ≥ 1200] OR (OPPURE) [30 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP ≥ 1200]	N/A	Non rilevato RNA di RSV

RISULTATO COMPLESSIVO	TARGET 1 (Flu A) FAM	TARGET 2 (Flu B) HEX	TARGET 3 (SARS-CoV-2) TX RED	TARGET 4 (RSV) Rosso intenso	CONTROLLO DI ELABORAZIONE (Sample Process Control, SPC2) Rosso	INTERPRETAZIONE
NEGATIVE (NEGATIVO) (RNA target non rilevato)	NOT AMPLIFIED (NON AMPLIFICATO) N/A OR (OPPURE) (5 ≤ Ct < 25 AND (E) EPR ≤ 2,0) OR (OPPURE) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP < 750) OR (OPPURE) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (NON AMPLIFICATO) N/A OR (OPPURE) (5 ≤ Ct < 28 AND (E) EPR ≤ 1,5) OR (OPPURE) (28 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP < 600) OR (OPPURE) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (NON AMPLIFICATO) N/A OR (OPPURE) (5 ≤ Ct < 25 AND (E) EPR ≤ 1,5) OR (OPPURE) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP < 1200) OR (OPPURE) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (NON AMPLIFICATO) N/A OR (OPPURE) (5 ≤ Ct < 30 AND (E) EPR ≤ 1,15) OR (OPPURE) (30 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP < 1200) OR (OPPURE) (Ct > 37)	AMPLIFIED (AMPLIFICATO) (24 ≤ Ct ≤ 31 AND (E) EP ≥ 1800)	Non rilevato RNA di Flu A, Flu B, RSV e SARS-CoV-2
NR*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Non amplificato, Rilevato errore di sistema, Elaborazione del campione interrotta)					L'elaborazione del campione è stata interrotta; testare nuovamente il campione.
IND*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Non amplificato, Rilevato errore di sistema, Elaborazione del campione completata)					Tutti i risultati target erano non validi; testare nuovamente il campione.
UNR*	Not Amplified, No System Error Detected (Non amplificato, Nessun errore di sistema rilevato)					Tutti i risultati target erano non validi; testare nuovamente il campione.

* Il sistema permette di utilizzare la funzione Rerun (Riesegui)/Repeat (Ripeti) per garantire la rielaborazione automatica nel caso di risultato non valido riducendo al minimo i ritardi nell'ottenimento dei risultati.

Risultati non validi

Se un NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay eseguito sul NeuMoDx System non riesce a produrre un risultato valido, verrà segnalato come Indeterminate (Indeterminato), No Result (Nessun risultato) o Unresolved (Irrisolto) in base al tipo di errore che si è verificato, e il test dovrà essere ripetuto per ottenere un risultato valido.

Un risultato Indeterminate (Indeterminato) verrà segnalato se durante il trattamento del campione viene rilevato un errore del NeuMoDx System. Nel caso di un risultato Indeterminate (Indeterminato), è consigliabile ripetere il test.

Il risultato sarà No Result (Nessun risultato) quando viene rilevato un errore del NeuMoDx System e viene interrotta l'elaborazione del campione. Nel caso di un risultato No Result (Nessun risultato), è consigliabile ripetere il test.

Il risultato sarà Unresolved (Irrisolto) quando non viene rilevato alcun target e non vi è amplificazione del controllo di elaborazione dei campioni (Sample Process Control): ciò indica un possibile errore relativo al reagente o la presenza di inibitori. In caso di risultato Unresolved (Irrisolto), è consigliabile ripetere il test come primo passaggio. Se ancora non si ottiene un risultato valido, è possibile usare un campione diluito per mitigare l'effetto di una possibile inibizione.

Vedere il Manuale dell'operatore del NeuMoDx 288 Molecular System (PN: 40600108) o il Manuale dell'operatore del NeuMoDx 96 Molecular System (PN: 40600317) per un elenco dei codici di errore associabili a qualsiasi risultato non valido.

Il NeuMoDx System è dotato di una funzione automatica Rerun (Riesegui)/Repeat (Ripeti), che può essere selezionata dall'utente finale per garantire la rielaborazione automatica di un risultato INVALID (NON VALIDO) e ridurre così al minimo i ritardi nell'ottenimento dei risultati.

Controllo qualità

Le normative locali in genere specificano che il laboratorio è responsabile delle procedure di controllo che monitorano l'accuratezza e la precisione dell'intero processo analitico e devono stabilire il numero il tipo e la frequenza di test dei materiali di controllo utilizzando specifiche di prestazione verificate per un sistema di test approvato e non modificato.

Controlli esterni

- 1) È necessario che gli utenti elaborino un set di NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Controls [RIF 901200] ogni 24 ore e prima di elaborare i campioni dei pazienti. Se non esiste un set di controlli esterni validi, il software del NeuMoDx System richiederà all'utente di elaborare questi controlli prima di poter riportare i risultati del campione.
- 2) Se sono richiesti controlli esterni, elaborare i controlli (1 controllo positivo e 1 controllo negativo):

NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control	Schema colori etichette
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Positive Control(s)	Rosso
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Negative Control(s)	Nero

- 3) Quando si elaborano gli External Controls, collocare i controlli in un portaprovette per campioni e utilizzare il touchscreen per caricare il portaprovette nel NeuMoDx System dal ripiano del caricatore automatico. Il NeuMoDx System riconosce i codici a barre e avvia l'elaborazione dei controlli, salvo che i reagenti o i materiali di consumo richiesti per i test non siano disponibili.
- 4) La validità di questi controlli esterni sarà valutata dal NeuMoDx System in base ai risultati attesi.

NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control	Risultato FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	Risultato SPC2
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Positive Control(s)	Rilevato RNA di FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2	N/A
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Negative Control(s)	Non rilevato RNA di FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2	SPC2 positivo

- 5) Risultati discrepanti per i controlli esterni devono essere gestiti come segue:
 - a) Un risultato del test Positive (Positivo) riportato per un campione di controllo negativo può indicare una contaminazione e per individuare la causa principale devono essere esaminate le procedure di controllo qualità del laboratorio. Accertarsi di utilizzare aree separate per la preparazione dei campioni, la manipolazione dei controlli e l'impostazione della RT-PCR. Per ulteriori suggerimenti in merito alla risoluzione dei problemi, fare riferimento al manuale dell'operatore del *NeuMoDx 288 o 96 Molecular System*.
 - b) Un risultato del test Negative (Negativo) riportato per un campione di controllo positivo può indicare la presenza di un problema correlato a un reagente o al NeuMoDx System. Per suggerimenti in merito alla risoluzione dei problemi, fare riferimento al manuale dell'operatore del *NeuMoDx 288 o 96 Molecular System*.
 - c) In entrambi i casi sopra illustrati o in caso di un risultato No Result (NR) (Nessun risultato), Unresolved (UNR) (Irrisolto) o Indeterminate (IND) (Indeterminato), ripetere il controllo fallito con una o più fiale appena scongelate del controllo o dei controlli che non hanno superato il test di validità.
 - d) Se il controllo positivo continua a dare un risultato del test Negative (Negativo), contattare il Servizio di assistenza tecnica di QIAGEN.
 - e) Se il controllo negativo continua a dare un risultato del test Positive (Positivo), cercare di eliminare tutte le fonti di potenziale contaminazione, anche sostituendo tutti i reagenti, e ripetere la sessione prima di contattare il Servizio di assistenza tecnica di QIAGEN.
 - f) Se gli External Controls non forniscono i risultati attesi, è necessario ripetere un set di controlli positivi e negativi. Se i controlli non forniscono i risultati attesi, i risultati dei pazienti non saranno riportati.

Controlli (interni) di elaborazione dei campioni

Nella NeuMoDx Extraction Plate è incorporato un Controllo di elaborazione dei campioni (Sample Process Control, SPC2) esogeno, che si sottopone all'intero processo di estrazione dell'acido nucleico e amplificazione mediante RT-PCR real-time con ogni campione. In ogni pozzetto della NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip sono inclusi anche primer e sonde specifici per l'SPC2, che consentono di rilevare la presenza dell'SPC2 insieme all'RNA target (se presente) tramite PCR multiplex. La rilevazione dell'amplificazione di SPC2 consente al software del NeuMoDx System di monitorare l'efficacia dei processi di estrazione e di amplificazione dell'RNA mediante RT-PCR real-time.

Prima della RT-PCR, il NeuMoDx System esegue automaticamente un "FILL CHECK" (CONTROLLO RIEMPIMENTO) per verificare che la camera PCR sia riempita con la soluzione e che contenga un'adeguata quantità di sonda fluorescente.

Il software NeuMoDx System monitora continuamente i sensori di bordo e gli attuatori per garantire un funzionamento sicuro ed efficiente del sistema.

Il monitoraggio attivo delle operazioni di aspirazione ed erogazione implementa diverse modalità di recupero degli errori del circuito idraulico per garantire che il sistema completi l'elaborazione di tutti i campioni in maniera sicura ed efficiente o fornisca un codice di errore appropriato.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay sui NeuMoDx Molecular Systems è stata caratterizzata in due fasi. Il limite di rilevazione (Limit of Detection, LoD) è stato caratterizzato utilizzando campioni clinici residui raggruppati di tampone nasofaringeo negativi deidentificati raccolti in matrice UVT e ceppi modello di ogni target. I ceppi modello utilizzati per ogni target sono presentati nella *Tabella 3*. In primo luogo, è stata preparata una serie di diluizioni usando ceppi modello di ogni target in UVT con i flussi di lavoro Diretto e Pretrattato; successivamente è stata eseguita l'elaborazione con il NeuMoDx System per determinare un valore preliminare del limite di rilevazione (Limit of Detection, LoD). Nella seconda parte dei test, tale valore preliminare del LoD è stato confermato utilizzando uno studio hit-rate sia sul NeuMoDx 288 che sul NeuMoDx 96 Molecular System per entrambi i flussi di lavoro. Il LoD preliminare è stato accettato se il test hit-rate ha raggiunto un tasso di positività del 95% per entrambi i flussi di lavoro su entrambi i sistemi. I tassi di rilevazione per il LoD preliminare sono presentati nella *Tabella 4*, mentre nella *Tabella 5* sono indicati i dettagli della conferma hit-rate per il sistema N288 e nella *Tabella 6* quelli della conferma hit-rate per il sistema N96. I valori LoD finali presunti nella *Tabella 4* sono indicati in **grassetto**.

Tabella 3. Ceppo usato per ogni target

Target/ceppo	Fonte	N. cat	N. lotto	Tipo di materiale
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	IRR	FR-1688	70031602	Surnatante chiarificato da cellule infettate
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	IRR	FR-1690	70032253	Surnatante chiarificato da cellule infettate
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	Virapur	N/A	B1904J	Grezzo vivo
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	Virapur	N/A	C2030D	Grezzo vivo
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	IRR	FR-1619	70015942	Surnatante chiarificato da cellule infettate
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	IRR	FR-1592	70013310	Surnatante chiarificato da cellule infettate
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	ATCC	VR-1931	70020870	Liquido di coltura chiarificato e lisato cellulare
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	Virapur	N/A	B1904N	Grezzo vivo
RSV A2	ATCC	VR-1540	60430286	Liquido di coltura e lisato cellulare
RSV B (WV/14617/85)	ATCC	VR-1400	70013461	Liquido di coltura e lisato cellulare
SARS-CoV-2, 1° Standard Internazionale dell'OMS	NIBSC	20/146	N/A	Virus liofilizzato inattivato con acido e calore
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	BEI	NR-52285	70037779	Virus inattivato dal calore

Tabella 4. Tassi di rilevazione positivi per la determinazione dell'LoD preliminare del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay –
(a) flusso di lavoro pretrattato; (b) flusso di lavoro diretto

(a) Flusso di lavoro Pretrattato

Target/ceppo	Livello	Unità	N. risultati validi (n/N)	N. pos	% Pos	Ct media	DS Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,02	TCID ₅₀ /ml	10/10	7	70%	33,97	0,90
	0,06		10/10	10	100%	33,36	0,96
	0,17		10/10	10	100%	32,17	0,45
	0,5		10/10	10	100%	31,05	0,42
	1,5		10/10	10	100%	31,01	0,45
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80%	33,72	1,00
	0,5		10/10	10	100%	32,97	0,51
	1,5		10/10	10	100%	32,28	0,60
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80%	32,81	0,38
	0,5		10/10	10	100%	31,68	0,84
	1,5		10/10	10	100%	31,69	0,65
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /ml	20/20	15	75%	32,15	1,70
	0,5		10/10	9	90%	32,37	0,50
	1,5		10/10	10	100%	32,63	1,35
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80%	32,90	1,27
	0,03		10/10	10	100%	32,26	0,48
	0,08		10/10	10	100%	31,48	0,78
	0,25		10/10	10	100%	30,59	0,40
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,003	TCID ₅₀ /ml	10/10	10	100%	33,97	0,58
	0,01		10/10	10	100%	33,90	0,39
	0,03		10/10	10	100%	33,85	0,56
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,083	TCID ₅₀ /ml	20/20	18	90%	34,39	0,84
	0,25		10/10	10	100%	32,53	0,21
	0,75		10/10	10	100%	32,57	0,40
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,33	TCID ₅₀ /ml	20/20	15	75%	33,58	1,50
	1		10/10	10	100%	34,03	0,69
	3		10/10	10	100%	32,30	0,66
RSV A2	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	5	50%	32,68	0,43
	0,5		10/10	10	100%	31,72	0,85
	1,5		10/10	10	100%	31,71	1,35
RSV B (WV/14617/85)	0,017	TCID ₅₀ /ml	10/10	5	50%	32,20	1,10
	0,05		10/10	10	100%	31,50	0,49
	0,15		10/10	10	100%	29,94	0,93
SARS-CoV-2, 1° Standard Internazionale dell'OMS	50	IU/ml	10/10	6	60%	34,36	0,64
	150		10/10	10	100%	34,20	0,31
	450		10/10	10	100%	33,04	0,63
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	50	copie/ml	10/10	6	60%	34,20	1,19
	150		10/10	10	100%	33,46	0,58
	450		10/10	10	100%	32,62	1,06

(b) Flusso di lavoro Diretto

Target/ceppo	Livello	Unità	N. risultati validi (n/N)	N. pos	% Pos	Ct media	DS Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,02	TCID ₅₀ /ml	20/20	17	85%	33,11	1,30
	0,06		10/10	10	100%	33,18	0,86
	0,17		10/10	10	100%	32,63	1,14
	0,5		10/10	10	100%	31,33	0,74
	1,5		10/10	10	100%	30,79	0,31
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,17	TCID ₅₀ /ml	20/20	18	90%	33,41	1,10
	0,5		10/10	9	90%	32,54	1,03
	1,5		10/10	10	100%	32,05	0,26
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	7	70%	33,39	0,16
	0,5		10/10	10	100%	32,70	1,01
	1,5		10/10	10	100%	31,12	1,07
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80%	34,11	0,69
	0,5		10/10	10	100%	33,68	0,50
	1,5		10/10	10	100%	32,27	1,29
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /ml	20/20	18	90%	33,31	0,95
	0,03		10/10	10	100%	31,51	0,94
	0,08		10/10	10	100%	31,76	0,46
	0,25		10/10	10	100%	30,11	0,45
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,003	TCID ₅₀ /ml	10/10	9	90%	34,82	0,39
	0,01		10/10	10	100%	34,37	0,55
	0,03		10/10	10	100%	33,64	0,34
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,083	TCID ₅₀ /ml	20/20	18	90%	33,78	1,11
	0,25		10/10	10	100%	33,89	0,69
	0,75		10/10	10	100%	32,38	0,47
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,25	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80%	33,23	1,17
	0,75		20/20	19	95%	32,63	1,22
	2,25		10/10	10	100%	31,24	1,58
RSV A2	0,42	TCID ₅₀ /ml	10/10	7	70%	32,61	0,70
	1,25		10/10	10	100%	30,99	1,55
	3,75		10/10	10	100%	31,49	1,04
RSV B (WV/14617/85)	0,017	TCID ₅₀ /ml	10/10	6	60%	33,63	1,49
	0,05		10/10	10	100%	32,42	1,12
	0,15		10/10	10	100%	31,81	0,81
SARS-CoV-2, 1° Standard Internazionale dell'OMS	50	IU/ml	10/10	7	70%	34,80	0,56
	150		20/20	19	95%	32,88	1,22
	450		10/10	10	100%	33,38	0,46
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	66,7	copie/ml	10/10	7	70%	33,53	0,58
	200		10/10	10	100%	32,63	1,25
	600		10/10	10	100%	32,69	0,86

Tabella 5. Tassi di rilevazione positivi per la determinazione del LoD di conferma per il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – N288, (a) Flusso di lavoro Pretrattato; (b) Flusso di lavoro Diretto

(a) Flusso di lavoro Pretrattato

Target/ceppo	Livello	Unità	N. risultati validi (n/N)	N. pos	% rilevamento	Ct media	DS Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,89	0,57
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	33,81	0,44
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,17	0,47
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	33,77	0,52
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /ml	29/30	29	100%	32,32	1,09
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	34,50	0,68
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,83	0,44
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	1	TCID ₅₀ /ml	29/30	29	100%	33,04	0,69
RSV A2	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	32,17	1,23
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	32,39	0,41
SARS-CoV-2, 1° Standard Internazionale dell'OMS	150	IU/ml	30/30	30	100%	33,63	0,61
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	150	copie/ml	29/30	28	96,6%	33,59	1,01

(b) Flusso di lavoro Diretto

Target/ceppo	Livello	Unità	N. risultati validi (n/N)	N. pos	% rilevamento	Ct media	DS Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,92	0,69
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,75	0,57
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	32,96	0,48
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,67	0,48
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /ml	29/30	28	96,6%	31,74	1,19
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,0033	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80%	34,88	0,95
	0,01	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	34,22	0,51
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,55	0,38
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,75	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,33	0,74
RSV A2	1,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	31,87	0,95
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	32,46	0,72
SARS-CoV-2, 1° Standard Internazionale dell'OMS	150	IU/ml	30/30	29	96,7%	33,78	0,77
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	200	copie/ml	30/30	30	100%	34,18	0,83

Tabella 6. Tassi di rilevazione positivi per conferma hit-rate dell'LoD per il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – N96, (a) flusso di lavoro pretrattato; (b) flusso di lavoro diretto

(a) Flusso di lavoro Pretrattato

Target/ceppo	Livello	Unità	N. risultati validi (n/N)	N. pos	% rilevamento	Ct media	DS Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,05	0,81
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	33,53	0,75
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	32,33	1,11
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	32,98	0,96
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	32,75	0,69
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,0033	TCID ₅₀ /ml	10/10	4	40%	34,75	0,58
	0,01	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,91	0,75
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	33,25	0,97
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	1	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	33,21	0,96
RSV A2	0,5	TCID ₅₀ /ml	29/30	28	96,6%	32,39	1,10
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	32,06	0,76
SARS-CoV-2, 1° Standard Internazionale dell'OMS	150	IU/ml	30/30	29	96,7%	33,79	0,67
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	150	copie/ml	30/30	29	96,7%	33,59	1,05

(b) Flusso di lavoro Diretto

Target/ceppo	Livello	Unità	N. risultati validi (n/N)	N. pos	% rilevamento	Ct media	DS Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,42	0,54
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,35	1,10
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	32,17	1,24
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,22	0,50
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	32,78	0,56
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	34,21	0,50
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	33,41	0,65
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,75	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	33,36	1,04
RSV A2	1,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7%	32,29	0,99
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100%	32,17	0,75
SARS-CoV-2, 1° Standard Internazionale dell'OMS	150	IU/ml	30/30	29	96,7%	33,50	0,78
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	200	copie/ml	29/30	29	100%	34,45	0,39

I livelli accettati come valori di LoD per il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay sui NeuMoDx Systems sono riassunti nella *Tabella 7*.

Tabella 7. Riepilogo dello studio sul limite di rilevazione

Target	Ceppo	Limite di rilevazione		
		Flusso di lavoro Pretrattato	Flusso di lavoro Diretto	Unità
Influenza A (Flu A) – H1N1	Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	0,06	TCID ₅₀ /ml
	Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	0,5	
Influenza A (Flu A) – H3N2	Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	0,5	
	Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	0,5	
Influenza B (Flu B) – ceppo Victoria	Hong Kong/286/2017	0,03	0,03	
	Colorado/6/2017	0,01	0,01	
	Florida/78/2015	0,25	0,25	
Influenza B (Flu B) – ceppo Yamagata	Phuket/3073/2013	1	0,75	
RSV A	A2	0,5	1,25	
RSV B	(WV/14617/85)	0,05	0,05	
SARS-CoV-2	1° Standard Internazionale dell'OMS	150	150	IU/ml
	Isolate USA-WA1/2020	150	200	copie/ml

Interferenza competitiva per organismi target: Flu A, Flu B, RSV e SARS-CoV-2

L'interferenza competitiva del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è stata valutata utilizzando pannelli di target virali addizionati a campioni clinici negativi di tampone nasofaringeo raccolti in UVT. Dieci pannelli contenevano uno o due target vicini al rispettivo limite di rilevazione (3-10X LoD) e un unico target a $\geq 1E5$ copie/ml, che rappresenta il target coinfecto. Un undicesimo pannello conteneva uno di ciascuno dei quattro target a 2X LoD. La presenza di due o tre virus a concentrazioni variabili in un unico campione e i relativi effetti sulla sensibilità analitica sono mostrati nella *Tabella 8*.

Nei campioni che hanno un risultato positivo per il SARS-CoV-2 dovranno essere considerati presunti risultati negativi per influenza A e RSV A e nei campioni che hanno un risultato positivo per l'influenza A dovranno essere considerati presunti risultati negativi per l'RSV. Gli studi sull'interferenza competitiva hanno dimostrato che il virus SARS-CoV-2, quando è presente a concentrazioni pari o superiori a $1E5$ copie/ml, può inibire la rilevazione e l'amplificazione dell'RNA dell'influenza A e dell'RSV A se presenti rispettivamente a valori pari o inferiori a 1,5 TCID₅₀/ml o 6,25 TCID₅₀/ml, e può portare a risultati falsi negativi. Inoltre, il virus dell'influenza A, quando è presente a concentrazioni pari o superiori a $1E5$ cp/ml, può inibire la rilevazione e l'amplificazione dell'RNA del virus RSV A se presente a valori pari o inferiori a 3,75 TCID₅₀/ml e può portare a risultati falsi negativi per l'RSV. Se si sospetta una coinfezione con il virus dell'influenza A o dell'RSV in campioni con un risultato positivo per il SARS-CoV-2 o si sospetta una coinfezione con il virus dell'RSV in campioni con un risultato positivo per l'influenza A, il campione dovrà essere nuovamente analizzato con un altro test per l'influenza o l'RSV approvato o autorizzato dalla FDA, nel caso in cui la rilevazione del virus dell'influenza o dell'RSV influisca sulla gestione clinica.

Tabella 8. Riepilogo dello studio sull'interferenza competitiva

Pannello	Target	Livello pannello	Conc. target	Risultati validi	N. pos	% rilevamento
1	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /mL	24	23	96%
	Flu B	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
2 (Ciclo 1)	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /mL	24	19	79%
	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /ml	24	8	33%
	SARS-CoV-2	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
2 (Ciclo 2)	Flu A	5X	2,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	RSV A	5X	6,25 TCID ₅₀ /ml	24	16	67%
	SARS-CoV-2	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
2 (Ciclo 3)	Flu A	5X	2,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	RSV A	10X	12,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	SARS-CoV-2	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
3	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	SARS-CoV-2	3X	450 IU/ml	24	24	100%
	RSV B	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
4	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	Flu A	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
5	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	SARS-CoV-2	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
6	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	RSV B	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
7	SARS-CoV-2	3X	450 IU/ml	24	24	100%
	Flu A	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
8	SARS-CoV-2	3X	450 IU/ml	24	24	100%
	Flu B	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
9 (Ciclo 1)	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /ml	24	20	83%
	Flu A	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
9 (Ciclo 2)	RSV A	5X	6,25 TCID ₅₀ /ml	24	23	96%
	Flu A	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
10	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /ml	24	23	96%
	Flu B	Elevato	1E5 cp/ml	24	24	100%
11	Flu A	2X	1 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	Flu B	2X	0,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	RSV B	2X	0,1 TCID ₅₀ /ml	24	24	100%
	SARS-CoV-2	2X	300 IU/ml	24	24	100%

Reattività analitica e inclusività

La reattività analitica del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è stata valutata rispetto a più ceppi/isolati di influenza A, influenza B, RSV e SARS-CoV-2. La reattività di ogni ceppo/isolato è stata caratterizzata in due fasi. La valutazione iniziale dei livelli di reattività per ogni target è stata eseguita con ogni singolo ceppo target testato a 3 concentrazioni in una matrice di tampone nasofaringeo simulata (preparata con 3000 cellule epiteliali umane per ml di UVT); *Tabella 9*. Nella seconda parte dei test, il livello più basso che aveva ottenuto un tasso di positività del 100% nella fase 1 è stato confermato come livello di reattività testando un minimo di 20 replicati; *Tabella 10*. Sono stati testati complessivamente 14 ceppi di Flu A, 6 ceppi di Flu B, 1 isolato di RSV A, 1 isolato di RSV B e 6 isolati di SARS-CoV-2.

Tabella 9. Ceppi di Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2 – Analisi preliminare del livello di reattività

Analisi preliminare					
Target	Ceppo		Livelli analizzati	N. risultati validi	% Pos
Flu A	H1N1	Brisbane/02/2018	0,5 TCID ₅₀ /ml	8	75,0%
			1,5 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			4,5 TCID ₅₀ /ml	7	100%
		Guangdong-Moanan/SWL 1536/2019	0,33 TCID ₅₀ /ml	8	87,5%
			1 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			3 TCID ₅₀ /ml	8	100%
		Michigan/272/2017 (H1N1)pdm09	0,17 TCID ₅₀ /ml	6	50%
			0,5 TCID ₅₀ /ml	6	100%
			1,5 TCID ₅₀ /ml	6	100%
		A/Iowa/53/2015 (H1N1)pdm09	0,33 TCID ₅₀ /ml	8	87,5%
			1 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			3 TCID ₅₀ /ml	8	100%
		A/Bangladesh/3002/2015 (H1N1)pdm09	3,3 CEID ₅₀ /ml	8	62,5%
			10 CEID ₅₀ /ml	8	87,5%
			30 CEID ₅₀ /ml	8	100%
	H3N2	Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	0,17 TCID ₅₀ /ml	8	87,5%
			0,5 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			1,5 TCID ₅₀ /ml	8	100%
		Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	0,15 TCID ₅₀ /ml	7	28,6%
			0,5 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			1,5 TCID ₅₀ /ml	8	100%
		Kansas/14/2017 (H3N2)	2,67 TCID ₅₀ /ml	8	50%
			8 TCID ₅₀ /ml	8	87,5%
			24 TCID ₅₀ /ml	7	100%
		A/Wisconsin/04/2018 (H3N2)	3,3 CEID ₅₀ /ml	6	83,3%
			10 CEID ₅₀ /ml	6	100%
			30 CEID ₅₀ /ml	6	100%
		A/California/02/2014 (H3N2)	0,01 TCID ₅₀ /ml	8	85,7%
			0,03 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,1 TCID ₅₀ /ml	7	100%
	0,33 TCID ₅₀ /ml		8	100%	
	1 TCID ₅₀ /ml		8	100%	
	H2N2	A2/Japan/305/57 (H2N2)	3 TCID ₅₀ /ml	7	100%
10,87 pg/ml ¹			8	100%	
32,6 pg/ml ¹			8	87,5%	
H5N2	A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	97,8 pg/ml ¹	7	100%	
		8 pg/ml ¹	8	100%	
		25 pg/ml ¹	8	100%	
H7N9	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	75 pg/ml ¹	7	100%	
		1:3E ⁵	8	50%	
		1:1E ⁵	7	87,5%	
H10N7	A/Chick/Germany/N/49 (H10N7)	1:3.3E ⁴	8	100%	
		22,67 pg/ml ¹	8	100%	
		68 pg/ml ¹	8	100%	
Flu B	Ceppo Victoria	Malaysia/2506/2004 (Victoria)	204 pg/ml ¹	8	100%
			1 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			3 TCID ₅₀ /ml	8	100%
		Washington/02/2019 (Victoria)	9 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			2,5 CEID ₅₀ /ml	8	25,0%
			5 CEID ₅₀ /ml	8	87,5%
		B/Maryland/15/2016 (Victoria)	15 CEID ₅₀ /ml	8	100%
			0,01 TCID ₅₀ /ml	12	91,7%
			0,03 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,1 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,33 TCID ₅₀ /ml	16	100%
			1 TCID ₅₀ /ml	8	100%

Analisi preliminare					
Target	Ceppo		Livelli analizzati	N. risultati validi	% Pos
Flu B (continuato)	Ceppo Yamagata	Wisconsin/1/2010 (Yamagata)	3 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,17 CEID ₅₀ /ml	8	75,0%
			0,5 CEID ₅₀ /ml	8	100%
			1,5 CEID ₅₀ /ml	8	100%
		B/Utah/09/2014 (ceppo Yamagata)	0,06 CEID ₅₀ /ml	8	25,0%
			0,19 CEID ₅₀ /ml	8	87,5%
			0,56 CEID ₅₀ /ml	7	85,7%
			1,7 CEID ₅₀ /ml	6	100%
			5 CEID ₅₀ /ml	6	100%
			15 CEID ₅₀ /ml	6	100%
			0,33 TCID ₅₀ /ml	8	25,0%
		B/Oklahoma/10/2018 (NA D197N) (Yamagata)	1 TCID ₅₀ /ml	8	87,5%
			3 TCID ₅₀ /ml	8	100%
0,67 pfu/ml	8		37,5%		
RSV	RSVA	A (long)	2 pfu/ml	8	100%
			6 pfu/ml	7	100%
			0,03 pfu/ml	8	12,5%
	RSVB	B (9320)	0,1 pfu/ml	8	87,5%
			0,3 pfu/ml	8	100%
			0,06 TCID ₅₀ /ml	8	0%
SARS-CoV-2	USA/CA-Stanford-15_S02/2021 (Kappa, B1.617.1)		0,17 TCID ₅₀ /ml	8	12,5%
			0,5 TCID ₅₀ /ml	8	37,5%
			1,5 TCID ₅₀ /ml	8	87,5%
			4,5 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			13,5 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,006 TCID ₅₀ /ml	8	62,5%
	USA/CA_CDC_5574/2020 (Alpha, B.1.1.7)		0,02 TCID ₅₀ /ml	8	87,5%
			0,06 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,17 TCID ₅₀ /ml	7	100%
			0,5 TCID ₅₀ /ml	7	100%
			1,5 TCID ₅₀ /ml	7	100%
			0,002 TCID ₅₀ /ml	8	62,5%
	Japan/TY7-503/2021 (Gamma, Brazil P.1)		0,006 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,02 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,06 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,17 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,5 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,001 TCID ₅₀ /ml	8	37,5%
	USA/PHC658/2021 (Delta, B.1.617.2)		0,004 TCID ₅₀ /ml	8	87,5%
			0,013 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,04 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,11 TCID ₅₀ /ml	8	100%
			0,33 TCID ₅₀ /ml	4	100%
			7,44 cp/ml ¹	8	37,5%
	Italy-INMI1		22,33 cp/ml ¹	8	87,5%
			67 cp/ml ¹	8	100%
			200 cp/ml ¹	8	100%
			600 cp/ml ¹	8	100%
			7,44 cp/ml ¹	8	25,0%
			22,33 cp/ml ¹	8	87,5%
Isolate Hong Kong/VM20001061/2020		67 cp/ml ¹	7	100%	
		200 cp/ml ¹	7	100%	
		600 cp/ml ¹	7	100%	
		600 cp/ml ¹	7	100%	

¹Queste varianti sono state fornite solo con una quantificazione dell'"RNA totale" che include sia l'RNA virale che l'RNA della cellula ospite.

Tabella 10. Ceppi di Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2 – Conferma del livello di reattività

Conferma					
Target	Ceppo		Livello	N. risultati validi	% Pos
Flu A	H1N1	Brisbane/02/2018	1,0 TCID ₅₀ /ml	23	91,3%
			1,5 TCID ₅₀ /ml	23	100%
		Guangdong-Moanan/SWL 1536/2019	0,5 TCID ₅₀ /ml	23	82,6%
			1,0 TCID ₅₀ /ml	24	100%
			0,5 TCID ₅₀ /ml	24	100%
			0,33 TCID ₅₀ /ml	24	85,7%
	A/Iowa/53/2015 (H1N1)pdm09	0,67 TCID ₅₀ /ml	24	95,2%	
	A/Bangladesh/3002/2015 (H1N1)pdm09	10 CEID ₅₀ /ml	24	100%	
	H3N2	Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	0,25 TCID ₅₀ /ml	24	87,0%
			0,5 TCID ₅₀ /ml	24	100%
		Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	0,5 TCID ₅₀ /ml	23	91,3%
			1,0 TCID ₅₀ /ml	23	95,7%
		Kansas/14/2017 (H3N2)	12 TCID ₅₀ /ml	23	100%
		A/Wisconsin/04/2018 (H3N2)	5 CEID ₅₀ /ml	23	91,3%
	10 CEID ₅₀ /ml		23	100%	
	A/California/02/2014 (H3N2)	0,01 TCID ₅₀ /ml	24	91,7%	
		0,03 TCID ₅₀ /ml	24	100%	
	H2N2	A2/Japan/305/57 (H2N2)	10,87 pg/ml ¹	24	100%
H5N2	A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	2 pg/ml ¹	24	83,3%	
		4 pg/ml ¹	23	100%	
		8 pg/ml ¹	23	100%	
H7N9	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	1:3.3E4 ¹	24	95,7%	
H10N7	A/Chick/Germany/N/49 (H10N7)	7,6 pg/ml ¹	23	73,9%	
		22,67 pg/ml ¹	23	100%	
Flu B	Ceppo Victoria	Malaysia/2506/2004 (Victoria)	1 TCID ₅₀ /ml	23	95,7%
		Washington/02/2019 (Victoria)	5 CEID ₅₀ /ml	24	95,8%
			10 CEID ₅₀ /ml	24	100%
		B/Maryland/15/2016 (Victoria)	0,01 TCID ₅₀ /ml	23	83,3%
	Ceppo Yamagata	Wisconsin/1/2010 (Yamagata)	0,03 TCID ₅₀ /ml	24	100%
			0,05 CEID ₅₀ /ml	24	100%
		B/Utah/09/2014 (ceppo Yamagata)	0,56 TCID ₅₀ /ml	24	87,0%
			1,5 TCID ₅₀ /ml	24	100%
		B/Oklahoma/10/2018 (NA D197N) (Yamagata)	0,75 TCID ₅₀ /ml	24	87,5%
1,5 TCID ₅₀ /ml	20	95,0%			
3,0 TCID ₅₀ /ml	24	100%			
RSV	RSVA	A (long)	2 pfu/ml	24	91,7%
		4 pfu/ml	24	95,8%	
	RSVB	B (9320)	0,15 pfu/ml	24	100%
		0,3 pfu/ml	21	100%	
SARS-CoV-2	USA/CA-Stanford-15_S02/2021 (Kappa, B.1.617.1)	1,5 TCID ₅₀ /ml	24	100%	
		3 TCID ₅₀ /ml	24	100%	
		4,5 TCID ₅₀ /ml	24	100%	
		0,02 TCID ₅₀ /ml	24	95,8%	
		0,06 TCID ₅₀ /ml	24	100%	
		0,006 TCID ₅₀ /ml	24	95,8%	
	USA/PHC658/2021 (Delta, B.1.617.2)	0,006 TCID ₅₀ /ml	24	87,5%	
		0,013 TCID ₅₀ /ml	24	100%	
	Italy-INMI1	22 cp/ml ¹	24	95,8%	
	Isolate Hong Kong/VM20001061/2020	67 cp/ml ¹	24	100%	
22 cp/ml ¹		24	57,1%		
67 cp/ml ¹	24	100%			

¹Queste varianti sono state fornite solo con una quantificazione dell'"RNA totale" che include sia l'RNA virale che l'RNA della cellula ospite.

La reattività del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay nella rilevazione di differenti isolati clinici di SARS-CoV-2 è stata dimostrata eseguendo un'analisi *in silico* con i primer e le sonde dell'esame rispetto a tutte le sequenze disponibili nella GenBank (a novembre 2021) utilizzando lo Strumento di ricerca di base di allineamento locale (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) dell'NCBI. I risultati mostrano che i primer e la sonda per SARS-CoV-2 hanno il 100% di omologia con oltre il 98% delle sequenze. Nel complesso, i primer e la sonda hanno un'omologia > 95% con tutte le sequenze analizzate.

Riproducibilità all'interno del laboratorio

La riproducibilità all'interno del laboratorio per il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è stata caratterizzata testando dieci pannelli di Flu A, Flu B, RSV A, RSV B o SARS-CoV-2 arricchiti singolarmente a 2 livelli [moderatamente positivo (5x LoD) e debolmente positivo (2x LoD)] e un pannello negativo. I pannelli sono stati testati su tre lotti di NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test strips prodotte secondo le GMP, su due NeuMoDx Systems e per sei giorni non consecutivi. I componenti del pannello sono stati preparati in campioni di tampone nasofaringeo simulati preparati con 3000 cellule epiteliali umane per ml di Universal Viral Transport medium (UVT) e arricchiti con un ceppo rappresentativo di influenza A, influenza B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2. Le NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips e il NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer (VVLB) sono stati identificati come i principali reagenti specifici per il test in grado di influenzare le prestazioni del test e, di conseguenza, è stato utilizzato il flusso di lavoro pretrattato per integrare il VVLB nello studio. La deviazione standard per i valori di Ct all'interno e tra tre lotti di strisce reattive NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2, su due NeuMoDx Molecular Systems, era $\leq 1,2$ con coefficienti di variazione (CV) $\leq 4,0\%$ per tutti i target, a dimostrazione dell'eccellente riproducibilità; *Tabella 11, 12 e 13.*

Tabella 11. Riproducibilità delle NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips per tutti i sistemi/lotti/giorni

Target	Livello target	N. validi	% positivo	Ct medio	DS	% CV
Flu A	Mod. pos.	72	100%	31,21	0,59	1,9%
	Deb. pos.	72	100%	32,01	0,58	1,8%
Flu B	Mod. pos.	72	100%	31,02	0,39	1,3%
	Deb. pos.	72	100%	31,88	0,56	1,7%
RSV A	Mod. pos.	72	100%	29,71	0,95	3,2%
	Deb. pos.	72	100%	30,75	1,18	3,8%
RSV B	Mod. pos.	72	100%	28,43	0,53	1,9%
	Deb. pos.	72	100%	29,45	0,56	1,9%
SARS-CoV-2	Mod. pos.	72	100%	32,70	0,51	1,5%
	Deb. pos.	72	100%	33,68	0,56	1,7%
Vero negativo		72	0%	N/A	N/A	N/A

Tabella 12. Riproducibilità delle NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips per ogni sistema

Pannello		N0000096					N000012				
Target	Livello target	N. validi	% positivo	Ct medio	DS	% CV	N. validi	% positivo	Ct medio	DS	% CV
Flu A	Mod. pos.	36	100%	31,37	0,66	2,1%	36	100%	31,05	0,46	1,5%
	Deb. pos.	36	100%	32,07	0,65	2,0%	36	100%	31,95	0,51	1,6%
Flu B	Mod. pos.	36	100%	31,10	0,40	1,3%	36	100%	30,94	0,37	1,2%
	Deb. pos.	36	100%	31,84	0,57	1,8%	36	100%	31,91	0,55	1,7%
RSV A	Mod. pos.	36	100%	29,94	0,97	3,2%	36	100%	29,49	0,89	3,0%
	Deb. pos.	36	100%	30,93	1,19	3,8%	36	100%	30,57	1,16	3,8%
RSV B	Mod. pos.	36	100%	28,60	0,58	2,0%	36	100%	28,26	0,42	1,5%
	Deb. pos.	36	100%	29,60	0,53	1,8%	36	100%	29,29	0,56	1,9%
SARS-CoV-2	Mod. pos.	36	100%	32,80	0,56	1,7%	36	100%	32,61	0,43	1,3%
	Deb. pos.	36	100%	33,83	0,64	1,9%	36	100%	33,52	0,42	1,2%
Vero negativo		36	0%	N/A	N/A	N/A	36	0%	N/A	N/A	N/A

Tabella 13. Riproducibilità delle NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips per ogni lotto di reagente

Pannello		Lotto 1				Lotto 2				Lotto 3			
Target	Livello target	N. validi	Ct medio	DS	% CV	N. validi	Ct medio	DS	% CV	N. validi	Ct medio	DS	% CV
Flu A	Mod. pos.	24	31,06	0,38	1,2%	24	31,49	0,62	2,0%	24	31,08	0,65	2,1%
	Deb. pos.	24	32,02	0,59	1,8%	24	32,18	0,50	1,6%	24	31,82	0,61	1,9%
Flu B	Mod. pos.	24	31,05	0,39	1,2%	24	31,08	0,47	1,5%	24	30,94	0,29	0,9%
	Deb. pos.	24	31,93	0,36	1,1%	24	32,01	0,77	2,4%	24	31,69	0,42	1,3%
RSV A	Mod. pos.	24	29,04	0,71	2,4%	24	30,40	0,66	2,2%	24	29,69	0,94	3,2%
	Deb. pos.	24	31,53	0,50	1,6%	24	29,45	0,79	2,7%	24	31,25	0,87	2,8%
RSV B	Mod. pos.	24	28,65	0,54	1,9%	24	28,29	0,52	1,8%	24	28,35	0,47	1,7%
	Deb. pos.	24	29,31	0,48	1,6%	24	29,46	0,64	2,2%	24	29,57	0,55	1,8%
SARS-CoV-2	Mod. pos.	24	32,82	0,43	1,3%	24	32,70	0,56	1,7%	24	32,59	0,50	1,5%
	Deb. pos.	24	33,42	0,58	1,7%	24	33,80	0,57	1,7%	24	33,81	0,47	1,4%
Vero negativo		24	N/A	N/A	N/A	24	N/A	N/A	N/A	24	N/A	N/A	N/A

Prestazioni cliniche

Le caratteristiche delle prestazioni cliniche del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay sono state determinate utilizzando uno studio di confronto con metodo retrospettivo interno con campioni di tamponi nasofaringei residui provenienti da 4 sedi di laboratori geograficamente diversificate. In questo studio sono state incluse anche diluizioni di campioni clinici positivi al SARS-CoV-2 per dimostrare la sensibilità clinica vicino all'LoD.

I campioni di tamponi nasofaringei residui provenienti da pazienti sintomatici sono stati deidentificati e hanno ricevuto un numero ID univoco dal laboratorio fornitore, stabilendo un elenco riservato che collega l'ID del paziente ai campioni deidentificati testati per scopi di studio. Per questo studio è stato raccolto un totale di 747 campioni di tamponi nasofaringei. Tutti i campioni sono stati elaborati attraverso i flussi di lavoro diretti e pretrattati, producendo alla fine 739 risultati validi e 8 non validi nel flusso di lavoro diretto e 736 risultati validi e 11 non validi nel flusso di lavoro pretrattato. Di questi campioni validi, 121 sono stati dedicati esclusivamente alla valutazione di target Flu, Flu B e RSV. I campioni positivi a Flu A sono 54 di questi campioni, mentre quelli positivi a Flu B ammontano a 34 e quelli positivi a RSV sono 33. All'interno di questa coorte di 121 campioni, i risultati per tutti i 3 target di interesse sono stati resi disponibili dai laboratori clinici fornitori. Pertanto, questa coorte di campioni positivi ha fornito anche 67 risultati negativi a Flu A, 87 risultati negativi a Flu B e 88 risultati negativi a RSV. Ai suddetti risultati negativi si aggiungono inoltre 59 campioni clinici con risultati negativi per tutti e 4 i target confermati dall'esame di confronto. Complessivamente, 106 campioni sono stati identificati come positivi al SARS-CoV-2 in entrambi i flussi di lavoro. I risultati clinici negativi al SARS-CoV-2 sono stati confermati con un risultato valido NeuMoDx in 512 campioni del flusso di lavoro diretto e 509 campioni del flusso di lavoro pretrattati.

L'operatore era tenuto all'oscuro dello stato del test di questi campioni per implementare uno "studio in singolo cieco". Per eseguire l'analisi comparativa dei metodi sono stati utilizzati i risultati riportati dagli specifici dispositivi molecolari commercializzati legalmente approvati da FDA e CE utilizzati dai laboratori per test standard di cura.

I risultati del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay hanno evidenziato una sensibilità clinica del 98,1% in entrambi i flussi di lavoro per il target Flu A e una specificità clinica del 100% e del 99,2% rispettivamente per il flusso di lavoro diretto e pretrattato (Tabella 14A). I risultati per il target Flu B hanno evidenziato una sensibilità clinica e una specificità clinica rispettivamente del 97,1% e 100%, per entrambi i flussi di lavoro (Tabella 14B). I risultati per il target RSV (indifferenziato) hanno evidenziato una sensibilità clinica del 97% per entrambi i flussi di lavoro e un sensibilità clinica del 99,3% e del 98,6% rispettivamente per il flusso di lavoro diretto e pretrattato (Tabella 14C). I risultati per il target SARS-CoV-2 hanno evidenziato una sensibilità clinica del 97,2% per entrambi i flussi di lavoro e una specificità clinica del 98,4% nel flusso di lavoro diretto e del 98,2% nel flusso di lavoro pretrattato (Tabella 14D). I limiti inferiore e superiore dell'intervallo di confidenza al 95% sono presentati nelle Tabelle 14A, 14B, 14C, e 14D di seguito e sono stati calcolati utilizzando la procedura Wilson con correzione di continuità.

Tabella 14A. Riepilogo delle prestazioni cliniche – NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Rilevamento di **Flu A**

(a) flusso di lavoro diretto e (b) flusso di lavoro pretrattato

(a) Flusso di lavoro diretto

Flu A		Risultato del test di riferimento approvato FDA/CE		
		POS	NEG	Totale
Risultato dei test NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	53	0	53
	NEG	1	126	127
	Totale	54	126	180
Sensibilità clinica (Flu A) = 98,1% (88,8%-99,9%)				
Specificità clinica (Flu A) = 100% (96,3%-100%)				

(b) Flusso di lavoro pretrattato

Flu A		Risultato del test di riferimento approvato FDA/CE		
		POS	NEG	Totale
Risultato dei test NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	53	1	54
	NEG	1	125	126
	Totale	54	126	180
Sensibilità clinica (Flu A) = 98,1% (88,8%-99,9%)				
Specificità clinica (Flu A) = 99,2% (95,0%-100%)				

Tabella 14B. Riepilogo delle prestazioni cliniche – NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: rilevazione di **Flu B**
(a) Flusso di lavoro Diretto e (b) Flusso di lavoro Pretrattato

(a) Flusso di lavoro diretto

Flu B		Risultato del test di riferimento approvato FDA/CE		
		POS	NEG	Totale
Risultato dei test NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	33	0	33
	NEG	1	146	147
	Totale	34	146	180
Sensibilità clinica (Flu B) = 97,1% (82,9%-99,8%)				
Specificità clinica (Flu B) = 100% (96,8%-100%)				

(b) Flusso di lavoro pretrattato

Flu B		Risultato del test di riferimento approvato FDA/CE		
		POS	NEG	Totale
Risultato dei test NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	33	0	33
	NEG	1	146	147
	Totale	34	146	180
Sensibilità clinica (Flu B) = 97,1% (82,9%-99,8%)				
Specificità clinica (Flu B) = 100% (96,8%-100%)				

Tabella 14C. Riepilogo delle prestazioni cliniche – NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Rilevazione di **RSV** mediante
(a) flusso di lavoro diretto e (b) flusso di lavoro pretrattato

(a) Flusso di lavoro diretto

RSV		Risultato del test di riferimento approvato FDA/CE		
		POS	NEG	Totale
Risultato dei test NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	32	1	33
	NEG	1	146	147
	Totale	33	147	180
Sensibilità clinica (RSV) = 97,0% (82,5%-99,8%)				
Sensibilità clinica (RSV) = 99,3% (95,7%-100%)				

(b) Flusso di lavoro pretrattato

RSV		Risultato del test di riferimento approvato FDA/CE		
		POS	NEG	Totale
Risultato dei test NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	32	2	34
	NEG	1	145	146
	Totale	33	147	180
Sensibilità clinica (RSV) = 97,0% (82,5%-99,8%)				
Sensibilità clinica (RSV) = 98,6% (94,7%-99,8%)				

Tabella 14D. Riepilogo delle prestazioni cliniche – NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Rilevamento di SARS-CoV-2 mediante (a) flusso di lavoro diretto e (b) flusso di lavoro pretrattato

(a) Flusso di lavoro diretto

SARS-CoV-2		Risultato del test di riferimento approvato FDA / CE		
		POS	NEG	Totale
Risultato dei test NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	103	8	111
	NEG	3	504	507
	Totale	106	512	618
Sensibilità clinica (SARS-CoV-2) = 97,2% (91,3%-99,3%)				
Sensibilità clinica (SARS-CoV-2) = 98,4% (96,8%-99,3%)				

(b) Flusso di lavoro pretrattato

SARS-CoV-2		Risultato del test di riferimento approvato FDA / CE		
		POS	NEG	Totale
Risultato dei test NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	103	9	112
	NEG	3	500	503
	Totale	106	509	615
Sensibilità clinica (SARS-CoV-2) = 97,2% (91,3%-99,3%)				
Sensibilità clinica (SARS-CoV-2) = 98,2% (96,5%-99,1%)				

Specificità analitica e reattività crociata

La specificità analitica del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 assay è stata valutata testando un pannello di 47 organismi, costituiti da 22 ceppi virali, 24 ceppi batterici e 1 ceppo di lievito, rappresentanti i comuni patogeni respiratori o la flora comunemente presente nelle vie respiratorie. Batteri e lievito sono stati testati a concentrazioni di ~6E6 CFU/ml o IFU/ml, eccetto laddove diversamente indicato. I virus sono stati testati a concentrazioni comprese tra 1E5 e 1E6 TCID₅₀/ml o copie/ml, eccetto laddove diversamente indicato. Per confermare la potenziale reattività crociata tra il SARS-CoV-2 e la famiglia dei Coronavirus (229E, OC43, NL63, MERS e SARS-1) insieme a *Legionella pneumophila* sono stati inclusi ulteriori replicati (> 20) per soddisfare il requisito MDCG per i dispositivi medico-diagnostici in vitro per il SARS-CoV-2. La specificità analitica del NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 assay è stata del 100% per Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2.

L'HKU1 era un altro membro della famiglia dei Coronavirus da testare; tuttavia, a causa della mancata disponibilità del virus e dell'RNA genomico, sono stati analizzati 4 replicati di materiale sintetico. È stata inoltre effettuata un'analisi *in silico* tra i primer e le sonde NeuMoDx SARS-CoV-2 e i genomi del coronavirus HKU1 pubblicati in GenBank per analizzare la potenziale reattività crociata. È stato ottenuto un totale di 57 sequenze di genomi HKU1 dal database NCBI Virus del NIH. Tutte le sequenze HKU1 presentavano 3 o più mismatch con ciascun primer e ciascuna sonda SARS-CoV-2 NeuMoDx. Non è stata rilevata una stretta omologia. Pertanto, non si prevede alcuna reattività crociata tra il Coronavirus HKU1 e il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.

Tabella 15. Risultati di specificità analitica

Organismo	Concentrazione	Flu A	Flu B	RSV	SARS-CoV-2
Adenovirus tipo 1	1E6 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Adenovirus tipo 7	5E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> 1176	10 ng/ml	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	10 ng/ml	-	-	-	-
<i>Corynebacterium xerosis</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
EBV	1E6 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Hemophilus influenzae</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
HHV 6A	1E6 cp/ml	-	-	-	-
HHV 7	1E6 cp/ml	-	-	-	-
HHV 8	1E6 cp/ml	-	-	-	-
HSV 1	1E6 cp/ml	-	-	-	-
HSV 2	1E6 cp/ml	-	-	-	-
Coronavirus umano 229E	1E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Coronavirus umano HKU1	1E6 cp/ml	-	-	-	-
Coronavirus umano NL63	1E4 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Coronavirus umano OC43	1E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Enterovirus umano 68	1E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-

Organismo	Concentrazione	Flu A	Flu B	RSV	SARS-CoV-2
Metapneumovirus umano	1E4 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Parainfluenza umana tipo 1	5E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Parainfluenza umana tipo 2	5E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Parainfluenza umana tipo 3	1E6 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Rhinovirus umano tipo 1A	5E3 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Lactobacillus lactis</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
Virus del morbillo	1E4 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Coronavirus della MERS EMC/2012	1E4 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
Virus della parotite	5E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero A	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero B	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero C	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero D	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
SARS-Coronavirus	1E6 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016	3x LoD	+	-	-	-
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	3x LoD	-	+	-	-
RSV A2	3x LoD	-	-	+	-
RSV B (WV/14617/85)	3x LoD	-	-	+	-
SARS-CoV-2, 1° Standard Internazionale dell'OMS	3x LoD	-	-	-	+
Controllo negativo (nessun patogeno)	N/A	-	-	-	-

Tabella 16. Specificità analitica - Famiglia dei Coronavirus insieme a *Legionella pneumophila* (> 20 replicati testati)

Organismo	Concentrazione	SARS-CoV-2
Coronavirus umano NL63	1,00E+04 TCID ₅₀ /mL	-
SARS-Coronavirus-1	1,00E+06 pfu/mL	-
Coronavirus della MERS EMC/2012	1,00E+04 TCID ₅₀ /mL	-
Coronavirus umano 229E	1,00E+05 TCID ₅₀ /mL	-
Coronavirus umano OC43	1,00E+05 TCID ₅₀ /mL	-
<i>Legionella pneumophila</i>	6,00E+06 CFU/mL	-
Positive control (Controllo positivo): SARS-CoV-2 First WHO Standard	3x LoD	+
Controllo negativo (nessun patogeno)	N/A	-

Sostanze interferenti – Organismi commensali

Il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è stato testato per verificare l'interferenza in presenza di organismi non target (potenzialmente presenti nelle alte vie respiratorie), valutando le prestazioni dell'esame a livelli bassi (~3X LoD) di Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2 in presenza di alte concentrazioni degli organismi elencati nella precedente **Tabella 15**. Inoltre, per confermare la potenziale interferenza tra il SARS-CoV-2 e la famiglia dei Coronavirus (229E, OC43, NL63, MERS e SARS-1) insieme a *Legionella pneumophila* (**Tabella 16**), sono stati inclusi ulteriori replicati (> 20) per soddisfare il requisito MDCG per i dispositivi medico-diagnostici in vitro per il SARS-CoV-2. Questi campioni sono stati arricchiti con SARS-CoV-2 solo a ~3X LoD per la sezione dello studio relativa all'interferenza. Per tutti i target è stato osservato un tasso di rilevazione del 100%. Pertanto, nella rilevazione dei target non è stata osservata alcuna interferenza con uno qualsiasi degli organismi commensali.

Sostanze interferenti - Endogene/esogene

Il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è stato valutato per verificare la suscettibilità all'interferenza causata dalle sostanze potenzialmente associate al prelievo di campioni di tampone nasofaringeo. I campioni clinici residui dei tamponi nasofaringei negativi sono stati arricchiti individualmente con Flu A, Flu B, RSV A, RSV B o SARS-CoV-2 a 3X LoD e trattati in presenza e in assenza degli agenti illustrati nella *Tabella 17*. Nessuna sostanza inclusa nei test ha avuto un effetto negativo sulle prestazioni dell'esame per nessuno dei target.

Tabella 17. Sostanze testate per l'interferenza

	Sostanza	Descrizione/Principio attivo	Concentrazione*
Esogena	Neo-sinefrina	Fenilefrina	15% (v/v)
	Gel nasale - Gel nasale salino Ayr	Cloruro di sodio con conservanti	15% (v/v)
	Rimedio omeopatico per allergia - Similasan	Cardiospermum, Sabadilla, Luffa opercolata, Galphimia glauca	15% (v/v)
	Zinco Nature's Bounty	Gluconato di zinco	0,1 mg/ml
	Anestetico/analgesico orale - Oragel	Benzocaina, cloruro di benzalconio	1% (v/v)
	Spray nasale - Afrin	Ossimetazolina	15% (m/v)
	Spray nasale - Zicam	Luffa opercolata, Galphimia glauca, Histaminum hydrochloricum, zolfo	15% (v/v)
	Corticosteroide nasale - Flonase	Fluticasone	5% (v/v)
	Corticosteroide nasale - Rhinocort	Budesonide	5% (v/v)
	Corticosteroide nasale - Nasacort	Triamcinolone	5% (v/v)
	Corticosteroide nasale - Desametasone	Desametasone	10 mg/ml
	Corticosteroide nasale - Mometasone	Mometasone	10 mg/ml
	Corticosteroide nasale - Beclometasone	Beclometasone	10 mg/ml
	Pastiglie per la gola - Chloraseptic	Benzocaina, mentolo	2 mg/ml
	Antibiotico, pomata nasale	Mupirocina	10 mg/mL
	Endogena	Mucina	Mucina purificata
Sangue umano		Sangue	2% (v/v)

*Nota: le concentrazioni mostrate sono quelle utilizzate per saturare i tamponi prima di dosare i campioni clinici artificiali positivi con la sostanza interferente. Pertanto sono rappresentative del livello nel sito di prelievo del tampone che è possibile tollerare.

Contaminazione crociata

Il tasso di contaminazione crociata per il test NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay sui sistemi NeuMoDx Molecular 288 e 96 è stato determinato processando campioni altamente positivi e negativi in uno schema a "scacchiera" alternato. Tutti i campioni comprendevano materiale di tampone nasofaringeo simulato, con campioni positivi arricchiti a $\geq 10^5$ TCID₅₀/mL ($\geq 10.000X$ LoD). Sono stati eseguiti cinque set di test a scacchiera, producendo un totale di 60 replicati negativi e 60 replicati positivi sui sistemi NeuMoDx 288 e 96 Molecular System. Tra i due tipi di sistema, tutti e 120 i replicati di campioni negativi sono stati indicati correttamente come negativi, dimostrando l'assenza di una contaminazione crociata durante l'elaborazione del campione sui NeuMoDx System.

Tempo di analisi

Utilizzando il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è stato determinato un tempo di analisi di ~85 minuti sul sistema N288 per l'elaborazione di 8 campioni e di ~78 minuti sul NeuMoDx 96 System per l'elaborazione di 4 campioni.

Tasso totale di errore del sistema

Il tasso totale di errore del sistema per il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è stato valutato attraverso l'analisi di 1 livello di target SARS-CoV-2 a una concentrazione pari a $\sim 3X$ LoD, preparato mediante arricchimento di campioni di tampone nasofaringeo clinicamente negativi con il 1° Standard Internazionale della OMS per SARS-CoV-2. Un totale di 200 replicati è stato elaborato utilizzando il flusso di lavoro diretto sia su NeuMoDx 96 Molecular System che 288 (100 replicati per sistema). Il tasso di errore è stato calcolato in base alla percentuale di risultati falsi negativi sul numero totale di risultati validi ottenuti. Il tasso di rilevazione del target SARS-CoV-2 nel test NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay è risultato pari al 100% sia per NeuMoDx 96 Molecular System che 288, dimostrando un tasso di errore dello 0% in entrambi i sistemi.

Efficacia del sistema - Inibizione

Il tasso di inibizione è stato determinato calcolando il tasso Unresolved (irrisolto) (controllo di elaborazione dei campioni non amplificato in assenza di errore di sistema) su tutti i campioni negativi eseguiti durante gli studi di verifica e validazione. Su un totale di 1221 campioni negativi analizzati sono stati ottenuti 11 risultati Unresolved (irrisolto), il che dimostra un tasso di inibizione per il NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay dello 0,9%.

BIBLIOGRAFIA

1. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

MARCHI COMMERCIALI

BD[™] è un marchio commerciale di Becton, Dickinson e Company

Hamilton[®] è un marchio commerciale registrato di Hamilton Company

Minitip Nylon[®] Flocked Swab è un marchio commerciale registrato di Copan Diagnostics, Inc.

NeuMoDx[™] e NeuDry[™] sono marchi commerciali di NeuMoDx Molecular, Inc.

TaqMan[®] è un marchio commerciale registrato di Roche Molecular Systems, Inc.

UTM-RT[®] è un marchio commerciale registrato di Copan Diagnostics, Inc.

Tutti gli altri nomi di prodotto, i marchi commerciali e i marchi commerciali registrati che possono apparire in questo documento sono di proprietà dei rispettivi proprietari.

LEGENDA DEI SIMBOLI

R only	Solo su prescrizione medica		Non riutilizzare
	Produttore		Contenuto sufficiente per <n> test
IVD	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>		Consultare le istruzioni per l'uso
EC REP	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea		Attenzione
REF	Numero di catalogo	CE	Marchio CE
LOT	Codice lotto	CONT	Contiene
	Data di scadenza		Contiene materiale biologico di origine animale
	Limite di temperatura		

 NeuMoDx Molecular, Inc.
1250 Eisenhower Place
Ann Arbor, MI 48108, USA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
GERMANY
+49 2103 290

Servizio di assistenza tecnica/Rapporti di sorveglianza: support@qiagen.com

Brevetto: www.neumodx.com/patents

CE