



Lyra[®]
Adenovirus ASSAY



Para la detección cualitativa de ADN de adenovirus extraído de muestras de exudado nasal y de exudado nasofaríngeo.

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

R_x ONLY

Índice

USO INDICADO.....	2
RESUMEN Y EXPLICACIÓN	2
PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO.....	2
MATERIALES SUMINISTRADOS	3
MATERIALES OPCIONALES.....	3
MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS	3
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	4
CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE LOS REACTIVOS DEL KIT.....	5
INDICACIONES DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS	5
OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS.....	5
CONSERVACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	5
CONFIGURACIÓN DEL PROGRAMA DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (SISTEMA BIOMÉRIEUX NUCLISENS EASYMAG).....	5
CONFIGURACIÓN DEL PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR (INSTRUMENTO ABI 7500 FAST DX)	8
PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.....	11
Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos.....	11
Procedimiento de rehidratación de la mezcla maestra	11
Procedimiento de configuración del PCR:.....	12
Protocolo de amplificación – Instrumento ABI 7500 Fast Dx	12
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	13
CONTROL DE CALIDAD.....	13
LIMITACIONES.....	13
VALORES PREVISTOS.....	14
RENDIMIENTO CLÍNICO	15

Estudio clínico prospectivo	15
Muestras seleccionadas retrospectivamente	16
RENDIMIENTO ANALÍTICO	16
Límite de detección.....	16
Reactividad analítica (inclusividad)	16
Estudio de reproducibilidad	18
Interferencia y reactividad cruzada microbiológicas	19
Especificidad analítica – Sustancias interferentes	20
Estudio de contaminación de arrastre/cruzada.....	21
MATERIAL ORIGINAL ADICIONAL.....	21
SERVICIO DE ATENCIÓN AL CLIENTE Y SERVICIO TÉCNICO	21
PROPIEDAD INTELECTUAL	21



USO INDICADO

El ensayo Lyra para adenovirus es un ensayo diagnóstico *in vitro* de reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) en tiempo real para la detección cualitativa de ADN de adenovirus humano (AdVH) aislado de muestras de exudado nasal y exudado nasofaríngeo obtenidas de personas con signos y síntomas de infecciones respiratorias agudas. El uso indicado de esta prueba es ayudar en el diagnóstico del AdVH conjuntamente con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

La prueba detecta, aunque no diferencia, especies de AdVH (A, B, C, D, E y F) o serotipos (AdVH 1-52).

Los resultados negativos no excluyen una infección por AdVH y no se deben utilizar como la única base de diagnóstico, tratamiento u otras decisiones administrativas del paciente.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los adenovirus (AdVH; familia Adenoviridae) son virus de ADN de doble cadena, no encapsulados. Actualmente hay 52 serotipos que se dividen en 6 grupos, A a F. La mayoría de los AdVH se asocian con infecciones respiratorias y oculares. En general, las infecciones por AdVH en adultos tienen una baja morbilidad salvo en personas inmunodeprimidas y en aquellas que viven en condiciones de hacinamiento, en los que las infecciones pueden causar neumonía atípica. La propagación del virus se produce habitualmente a través de fómites o gotitas aerosolizadas con infección de las membranas mucosas de los ojos, las vías respiratorias y el intestino.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo detecta ácidos nucleicos virales que se han extraído de la muestra del paciente. Se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) en tiempo real, en condiciones optimizadas, en un único tubo generando amplicones para AdVH y el control del proceso (PRC). La identificación de AdVH y el PRC se produce mediante el uso de cebadores específicos de la diana y sondas marcadas con fluorescencia que hibridan con regiones conservadas en los genomas del AdVH y el PRC.

Etiquetas de la sonda Lyra	
Diana	Colorante
AdVH	FAM
PRC	Cy5

A continuación, se explica un resumen del procedimiento:

1. **Obtención de muestras:** Obtenga muestras de exudados nasales o nasofaríngeos utilizando técnicas estándar de pacientes con síntomas. Transporte, conserve y procese estas muestras conforme a los procedimientos establecidos de laboratorio.¹
2. **Extracción de ácidos nucleicos:** Extraiga los ácidos nucleicos de las muestras con el sistema NucliSENS® easyMAG® siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando los reactivos adecuados (véase **Materiales necesarios pero no suministrados**). El uso de otros sistemas de extracción con el ensayo Lyra para adenovirus no se ha validado. La validación de estos otros sistemas es responsabilidad del usuario final. Antes del procedimiento de extracción, añada 20 µl del PRC a cada alícuota de la muestra de 180 µl. El PRC sirve para monitorizar inhibidores en la muestra extraída, asegurar que se ha realizado la amplificación adecuada y confirmar que la extracción de ácidos nucleicos ha sido suficiente.
3. **Rehidratación de la mezcla maestra:** Vuelva a hidratar la mezcla maestra liofilizada utilizando la solución de rehidratación. La mezcla maestra contiene cebadores con oligonucleótidos, fluoróforo y sondas marcadas con extintores cuyo objetivo son las regiones conservadas de AdvH, así como la secuencia del PRC.
4. **Amplificación y detección de ácidos nucleicos:** Añada 15 µl de la mezcla maestra rehidratada a cada uno de los pocillos de la placa. Luego añada 5 µl de ácidos nucleicos extraídos (muestra con PRC) al pocillo de la placa. Coloque la placa en el instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems® 7500 Fast, o Applied Biosystems® (ABI) 7500 Fast Dx (“Instrumento ABI 7500 Fast Dx”).

Una vez que la placa se ha añadido al instrumento, inicie el protocolo de ensayo. Este protocolo inicia la amplificación de los amplicones diana del ADN. El ensayo Lyra para adenovirus se basa en la química TaqMan® y usa una enzima con transcriptasa inversa, ADN polimerasa y actividades 5'-3' exonucleasa. Durante la amplificación del ADN, esta enzima escinde la unión de la sonda en la secuencia de ADN complementario, separando el colorante de extinción del colorante de notificación. Este paso genera un aumento de la señal de fluorescencia por la excitación con una fuente luminosa de la longitud de onda apropiada. Con cada ciclo, moléculas adicionales de colorante se separan de sus extintores lo que genera una señal adicional. Si se logra suficiente fluorescencia en 45 ciclos en el instrumento ABI® 7500 Fast o ABI 7500 Fast Dx, la muestra se informa como positiva para el ácido nucleico detectado.

MATERIALES SUMINISTRADOS

Kit de detección

n.º ref. M113 (96 reacciones). Conservar a una temperatura a 2 °C a 8 °C.

Componente	Cantidad
Solución de rehidratación Pieza M5003	1 vial/kit 1,9 ml
Mezcla maestra Lyra para adenovirus Pieza M5072 Contenido liofilizado: enzima ADN polimerasa Cebadores y sondas dNTP Estabilizantes	12 viales/kit, 8 reacciones/vial
Control del proceso (PRC) Pieza M5005 Identidad: Bacteriófago MS2	1 vial/kit 2,0 ml

MATERIALES OPCIONALES

- Controles externos para AdvH (es decir, Lyra Adenovirus Control Set, n.º M110 que sirve como un control de extracción y procesamiento externo).

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Micropipetas (intervalo de 1 a 10 µl y de 100 a 1000 µl)
- Puntas de pipetas anti-aerosoles
- Instrumento ABI 7500 Fast Dx o 7500 Fast (versión de software 1.4 o superior)
- Placa de PCR de 96 pocillos
- Películas de placa óptica
- Centrifuga de placas para placa ABI de 96 pocillos

- Software bioMérieux NucliSENS easyMAG (versión 2.0)
- Tampones bioMérieux NucliSENS easyMAG 1, 2, 3
- Tampón de lisis bioMérieux NucliSENS easyMAG
- Microesferas magnéticas de sílice bioMérieux NucliSENS easyMAG
- Desechables bioMérieux NucliSENS easyMAG
- Pipeta Biohit

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso diagnóstico *in vitro*
- El ensayo se ha validado utilizando el software bioMérieux NucliSENS easyMAG versión 2.0 y el software ABI 7500 Fast Dx versión 1.4 o superior. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar estas versiones del software.
- Las características de rendimiento de esta prueba se han establecido con los tipos de muestras que aparecen en la **sección Uso indicado** exclusivamente. El rendimiento de este ensayo con otros tipos de muestras no se ha evaluado.
- El uso de otros sistemas de extracción de ácidos nucleicos distintos del sistema bioMérieux NucliSENS easyMAG no se ha validado. La validación de estos otros sistemas es responsabilidad del usuario final.
- El uso de condiciones en los ciclos distintas de las indicadas en la sección **Configuración del programa del termociclador (instrumento ABI 7500 Fast Dx)** podría generar resultados erróneos.
- El uso de este producto se debe limitar a personal con la suficiente formación en las técnicas de PCR y RT-PCR.
- Trate todas las muestras como potencialmente infecciosas. Siga las precauciones universales cuando manipule las muestras, este kit y su contenido.
- Los procedimientos adecuados de obtención, conservación y transporte de las muestras son fundamentales para la obtención de resultados correctos.
- Conserve los reactivos del ensayo tal como se indica en las etiquetas de cada uno de ellos.
- Para obtener resultados precisos, pipetee cuidadosamente utilizando solo equipo calibrado.
- Limpie y desinfecte a fondo todas las superficies con una solución de lejía al 10 % seguida de agua de grado molecular.
- Utilice micropipetas con una barrera para aerosoles o puntas para desplazamiento positivo para todos los procedimientos.
- Evite la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos del kit. Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- No mezcle los reactivos de kits con diferentes números de lote.
- No use reactivos de otros fabricantes con este kit.
- No use el producto después de su fecha de caducidad.
- La planificación adecuada del flujo de trabajo es fundamental para minimizar el riesgo de contaminación. Planifique siempre un flujo de trabajo de laboratorio de forma unidireccional, comenzando con la preamplificación y avanzando por la amplificación y detección.
- Use suministros y equipos dedicados en las zonas de preamplificación y amplificación.
- **No permita el movimiento cruzado de personal o equipo entre áreas.**
- Mantenga los suministros de amplificación siempre separados de los suministros de preamplificación.
- No abra los tubos de muestras ni las placas sin sellar posamplificación.
- Deseche cuidadosamente el material amplificado conforme a las leyes y normativas locales para minimizar el riesgo de contaminación por amplicones.
- No use suministros dedicados para la preparación de muestras y reactivos en el procesamiento de ácidos nucleicos diana.
- La prueba debe realizarse en una zona que disponga de la ventilación adecuada.
- Deseche los envases y contenido no utilizado conforme a los requerimientos locales, estatales y federales reglamentarios.
- Vista preferentemente ropa protectora, guantes y protección para ojos/cara cuando esté manipulando los componentes del kit.
- Lavarse bien las manos después de manipular el kit.
- Para obtener información adicional sobre símbolos de peligro, seguridad, manipulación y eliminación de los componentes de este kit, consulte la Ficha de datos de seguridad (*Safety Data Sheet, SDS*) que se encuentra en quidel.com.

CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE LOS REACTIVOS DEL KIT

- Conserve el kit sin abrir a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la parte exterior de la caja del kit.
- La mezcla maestra rehidratada se puede conservar a temperatura ambiente o a una temperatura de 2 °C a 8 °C durante un período máximo de 4 horas o a -20 °C durante un período de hasta 3 días.
- La mezcla maestra rehidratada se debe volver a tapar, sellar con Parafilm y conservar en posición vertical. Proteja la mezcla maestra de la luz cuando la conserve.

INDICACIONES DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

La turbidez de la solución de rehidratación podría indicar el deterioro de este reactivo. Póngase en contacto con el servicio técnico para obtener un repuesto.

OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS

Las muestras que se utilizan para la validación del ensayo Lyra para adenovirus se obtuvieron mediante técnicas estándar de pacientes con síntomas de infección de las vías respiratorias superiores. Estas muestras se obtuvieron, transportaron, conservaron y procesaron conforme a M41-A del CLSI. Brevemente, las muestras se deben transportar refrigeradas a una temperatura de 2 °C a 8 °C. Las muestras no extraídas se pueden conservar refrigeradas (de 2 °C a 8 °C) o congelarlas a -20 °C durante un período de hasta 7 días antes de procesarlas.

Se realizaron una serie de estudios que evaluaron diversos medios de transporte viral de uso habitual a un volumen de 2 ml: M4, M4-RT, M5, M6 y UTM. No se observó ninguna diferencia importante en el rendimiento del ensayo entre los cinco tipos diferentes de medios de transporte viral.

CONSERVACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS



Los extractos de ácidos nucleicos se pueden conservar a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C), de 2 °C a 8 °C, o a ≤-20 °C durante un período de hasta 30 días. El ADN extraído es estable durante hasta tres ciclos de congelación/descongelación cuando se conserva a ≤-20 °C.

CONFIGURACIÓN DEL PROGRAMA DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (SISTEMA BIOMÉRIEUX NUCLISENS EASYMAG)

Nota: Se deben incluir en cada análisis de extracción un control de extracción/procesamiento positivo para AdVH (es decir, Lyra Adenovirus Control Set, n.º de ref. M110 o muestra positiva para AdVH caracterizada previamente) y un control externo negativo (es decir, medios de transporte viral o muestra negativa para AdVH caracterizada previamente).

1. Encienda el instrumento y espere a que la luz del instrumento aparezca de color naranja. Luego encienda el ordenador/inicie el software del sistema bioMérieux NucliSENS easyMAG.













2. Lea el código de barras de los reactivos después de pulsar los botones «Instrumento»  e «Inventario de reactivos» .

3. Para introducir las muestras, pulse el botón «Uso diario» , que le dirigirá de manera predeterminada a

la pantalla «Definir solicitud» . Seleccione los siguientes parámetros:

- a. ID de muestra: introduzca el **nombre de la muestra** utilizando el teclado.
- b. Matriz: seleccione **Otro** en el menú desplegable.
- c. Solicitud: seleccione **Genérica** en el menú desplegable.
- d. Volumen (ml): seleccione **0,200** en el menú desplegable.
- e. Eluya (µl): seleccione **50** en el menú desplegable.
- f. Tipo: primario
- g. Prioridad: normal

4. Después de pulsar el botón «Guardar» , la muestra aparecerá en la ventana «Muestra no asignada» en el lateral izquierdo de la pantalla. Pulse el botón «Introducir nueva solicitud de extracción»  y repita el proceso con las muestras adicionales. Alternativamente, se pueden introducir varias muestras pulsando el botón «Crear automáticamente nuevas solicitudes de extracción» .
5. Una vez que se hayan creado todas las muestras, vaya a «Organizar análisis» haciendo clic en el icono  cerca de la parte superior de la página. Cree un análisis pulsando el botón «Crear análisis» . Introduzca el nombre del análisis o utilice el predeterminado.
6. Añada muestras al análisis utilizando el botón «Rellenar automáticamente análisis»  (rellena automáticamente hasta 24 muestras de la «lista de muestras no asignadas» en el lateral izquierdo de la pantalla). Alternativamente, las muestras individuales se deben meter y sacar del análisis utilizando los «iconos de posicionamiento» izquierdo y derecho  después de seleccionar la muestra apropiada. El orden de las muestras en el análisis se puede cambiar utilizando los botones «Subir/bajar solicitud de extracción» .
7. Obtenga de 1 a 3 recipientes de muestras (para 8 - 24 muestras, respectivamente) y añada 20 µl del PRC a cada uno de los pocillos de muestra utilizados.
8. Añada 180 µl de cada muestra al pocillo apropiado según se haya designado.
9. Vaya a «Cargar análisis» pulsando el botón  cerca de la parte superior de la pantalla. Inserte las puntas y los recipientes de muestras en el instrumento.
10. Introduzca los códigos de barras de los recipientes de muestras.
11. Introduzca los códigos de barras de las microesferas de sílice que se van a utilizar.
12. Asigne las microesferas de sílice a las muestras como se indica a continuación:
- Haga clic en el símbolo de los reactivos (número 1 en la siguiente imagen). El número de lote de las microesferas de sílice debe aparecer debajo de la ficha Sílice (número 2 en la siguiente imagen).
 - Resalte y seleccione las muestras en las que es necesario asignar las microesferas (número 3 en la siguiente imagen).
 - Haga clic en el icono de posición  (número 4 en la siguiente imagen) para asignar el número de lote de sílice a las muestras seleccionadas.
 - Si se selecciona el símbolo de las microesferas (a la derecha del número 5 en la siguiente imagen), el número de lote de las microesferas de sílice se debe visualizar para cada muestra.



13. Imprima la lista de trabajo tocando el icono «Cargar análisis» y, a continuación, pulsando el icono «Imprimir



lista de trabajo»



14. Pulse el botón «Dispensar lisis». La lisis en el instrumento tardará en completarse aproximadamente 12 minutos.
15. Para cada recipiente de muestra, prepare las partículas magnéticas utilizando la pipeta Biohit y las puntas para un máximo de ocho reacciones, tal como se indica a continuación:
- Utilizando 1 punta y el Programa 1, aspire 550 μ l de agua libre de nucleasa y dispéñselos en un tubo de microcentrífuga libre de desoxirribonucleasa/ribonucleasa de 1,5 ml.
 - Agite en un mezclador vórtex la sílice magnética. Utilizando 1 punta y el Programa 1, aspire 550 μ l de sílice magnética, dispense en agua y mezcle con un mezclador vórtex.
 - Utilizando 1 punta y el Programa 2, aspire 1050 μ l de la mezcla de sílice magnética y dispense 25 μ l de nuevo al mismo tubo.
 - Dispense 125 μ l de la mezcla de sílice magnética 8 veces a 8 pocillos de la placa de tiras ELISA. Deseche la punta.
 - Una vez finalizada la lisis (Nota: el «Estado del instrumento» en la parte inferior de la pantalla debe ser 'IDLE' [EN REPOSO]), utilizando 8 puntas y el Programa 3, aspire 100 μ l de la mezcla de sílice magnética de los pocillos de las tiras, luego dispense 100 μ l de la mezcla de sílice magnética a los pocillos de las tiras y aspire 100 μ l de la mezcla de sílice magnética en los pocillos de las tiras de nuevo para mezclar la solución.
 - Introduzca las puntas en el líquido de los recipientes de muestras. Aspire 800 μ l, luego dispense 900 μ l de la mezcla de sílice magnética de nuevo al recipiente. Aspire 1000 μ l de la mezcla de sílice magnética del recipiente y dispense 1000 μ l de sílice magnética de nuevo al recipiente. Repita la aspiración/dispensación de 1000 μ l dos veces más.



16. Cierre el instrumento y pulse el botón «Iniciar» para comenzar el análisis.
17. Una vez terminado el análisis, transfiera los ácidos nucleicos a los tubos sin nucleasa. Los eluidos se pueden conservar a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C), de 2 °C a 8 °C, o a \leq -20 °C durante un mes. El ADN extraído es estable hasta tres ciclos de congelación/descongelación cuando se conserva a -20 °C.

CONFIGURACIÓN DEL PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR (INSTRUMENTO 7500 FAST AND ABI 7500 FAST DX)

1. Inicie el paquete de software ABI 7500 Fast y ABI 7500 Fast Dx (versión 1.4 o superior).
2. Se abrirá el cuadro de diálogo **Documento para inicio rápido**. Seleccione el botón **Crear documento nuevo** para iniciar el **Asistente para nuevo documento**. Siga los pasos a continuación para iniciar el protocolo del ensayo Lyra para adenovirus.

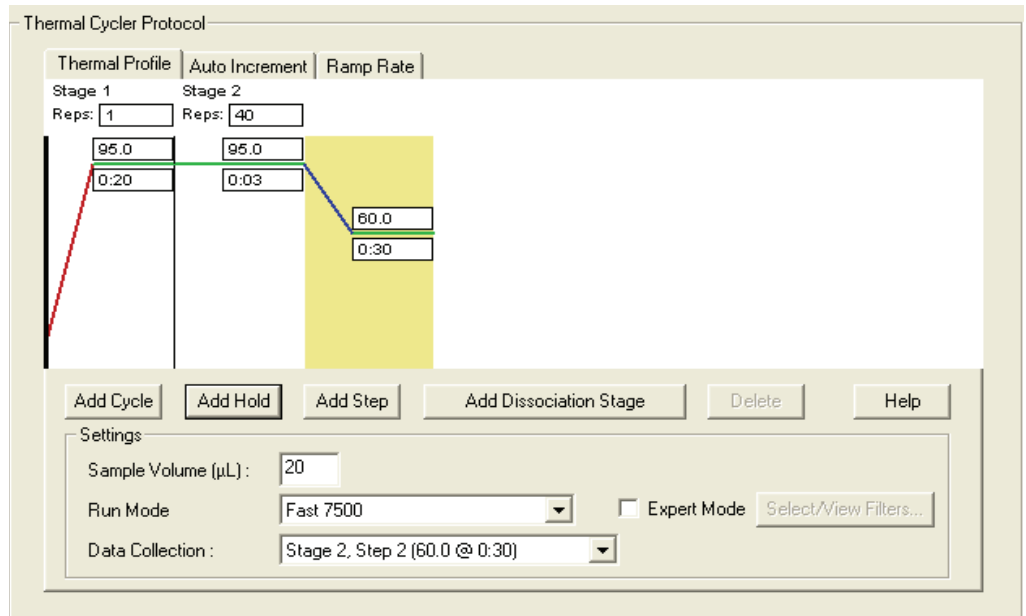
- a. **Definir documento:** La mayoría de los siguientes parámetros deberían ser los valores predeterminados. En caso contrario, cámbielos en consonancia.
 - i. Confirme o introduzca la siguiente información:

Ensayo:	Curva estándar (cuantificación absoluta)
Recipiente:	Transparente de 96 pocillos
Plantilla:	Documento en blanco
Modo de análisis:	Fast 7500
Usuario:	<i>su nombre de usuario</i>
Comentarios:	SDS v1.4
Nombre de la placa:	'Lyra HAdV'

- ii. Seleccione el botón **Siguiente**.
- iii. **Seleccione los detectores:** Se deben añadir detectores nuevos para AdVH y el PRC. Para cada diana, seleccione el botón **Detector nuevo** para abrir la ventana emergente **Detector nuevo**. Alternativamente, use el botón **Crear otro** de la ventana emergente **Detector nuevo** para los últimos dos detectores. Introduzca la siguiente información para cada detector:

Nombre	Colorante de notificación	Colorante de extinción	Color
AdVH	FAM	(ninguno)	(Seleccionar)
PRC	Cy5	(ninguno)	(Seleccionar)

- iv. Seleccione un único color para representar cada uno de los detectores.
- v. Resalte los detectores nuevos y añádalos a la columna **Detectores en el documento** utilizando el botón **Añadir**.
- vi. Seleccione **(ninguno)** en el menú desplegable **Referencia pasiva**.
- vii. Seleccione el botón **Siguiente**.
- viii. Seleccione el botón **Terminar** sin configurar ninguno de los pocillos.
- b. El asistente se cerrará y se abrirá el software, comenzando con la ficha **Configuración**. Esto mostrará la placa de muestras que se configuró durante el inicio rápido. Para la configuración inicial, no es necesario cambiar nada.
- c. Defina el protocolo del termociclador:
 - i. Seleccione la ficha **Instrumento** para configurar la temperatura y duración de los ciclos del ensayo Lyra para adenovirus.
 - ii. En **Perfil térmico** debe haber un protocolo predeterminado de 2 fases (véase la figura a continuación). Cada fase tendrá 3 cuadros de texto modificables por el usuario. El valor del cuadro superior representa el número de repeticiones o ciclos para esa fase. El valor del cuadro central representa la temperatura (°C) y el valor del cuadro inferior representa el tiempo (minutos: segundos).



iii. Realice los siguientes cambios en el **Protocolo del termociclador** predeterminado:

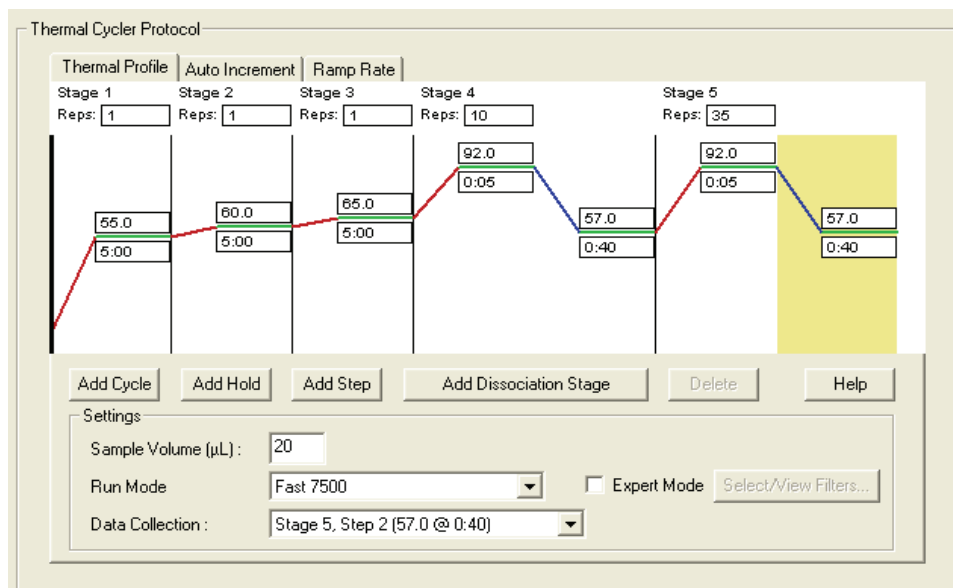
1. Fase 1
 - a. Repet.: 1
 - b. Temp.: 55
 - c. Duración: 5:00
2. Seleccione la barra entre las fases 1 y 2. Seleccione el botón «**Añadir espera**» para agregar otra fase
3. Fase 2
 - a. Repet.: 1
 - b. Temp.: 60
 - c. Duración: 5:00
4. Seleccione la barra entre las fases 2 y 3. Seleccione el botón «**Añadir espera**» para agregar otra fase
5. Fase 3
 - a. Repet.: 1
 - b. Temp.: 65
 - c. Duración: 5:00
6. Fase 4 (fase de amplificación en 2 pasos)
 - a. Repet.: 10
 - b. Paso 1
 - i. Temp.: 92
 - ii. Duración: 0:05
 - c. Paso 2
 - i. Temp.: 57
 - ii. Duración: 0:40
7. Seleccione la barra a la derecha de la fase 4. Seleccione el botón **Añadir ciclo** para agregar otra fase.
8. Fase 5 (fase de amplificación en 2 pasos)
 - a. Repet.: 35
 - b. Paso 1
 - i. Temp.: 92
 - ii. Duración: 0:05
 - c. Paso 2
 - i. Temp.: 57
 - ii. Duración: 0:40
9. Si se ha añadido la fase equivocada, la fase se puede eliminar pulsando el botón **Eliminar** después de resaltar la fase entre las líneas verticales.

iv. En **Configuraciones**, introduzca lo siguiente:

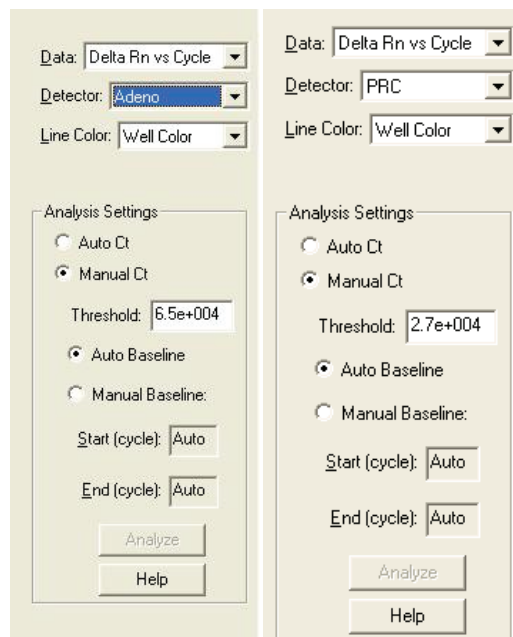
Volumen de muestra (μl):	20 (predeterminado)
Modo de análisis:	7500 Fast (predeterminado)
Obtención de muestras:	Fase 5, paso 2 (57,0 a 0:40)
NOTA: no marque la casilla de verificación al lado del «Modo experto».	

v. A continuación, se muestra una imagen del protocolo final.

**Tenga en cuenta que, según este protocolo, el instrumento ABI 7500 Fast Dx realizará 45 ciclos. No obstante, se programa para que capture exclusivamente los datos de los últimos 35 ciclos. Por tanto, el resultado final (y la tabla de interpretación de los resultados que se muestra a continuación) mostrará los valores de Cts entre 1 y 35 solamente.*



- d. Configure el umbral de cada analito como se indica a continuación (véase la siguiente figura):
- Seleccione la ficha **Resultados**.
 - Seleccione la ficha **Diagrama de amplificación**.
 - Seleccione AdVH en la ficha **Detector** en la esquina superior derecha.
 - En el bloque **Configuración de análisis**, configure el **Umbral** en **6,5e+004**.
 - Seleccione el botón **Inicio automático**.
 - Repita iii-v para el PRC, ajustando el **umbral** a **2,7e+004**.



- e. Guarde el nuevo protocolo como una plantilla para uso en el futuro.
 - i. En la parte superior de la pantalla, seleccione **Archivo** y después **Guardar como**.
 - ii. **Guardar en:** D:\Applied Biosystems\7500 Fast System\Templates\.
 - iii. **Nombre del archivo:** 'Lyra AdvH.'
 - iv. **Guardar como tipo:** 'SDS Templates (*.sdt).'
- f. Salir del software

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Realice los siguientes procedimientos a la temperatura ambiente controlada de 20 °C a 25 °C.

Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos

Consulte la sección titulada: Configuración del programa de extracción de ácidos nucleicos bioMérieux NucliSENS easyMAG System (arriba).

1. Añada 20 µl del PRC al pocillo de extracción de la muestra.
2. Añada 180 µl de la muestra del paciente o del control externo a un pocillo de extracción de muestras.
3. Siga el procedimiento de extracción según las instrucciones del fabricante.
4. Los eluidos se pueden conservar a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C), de 2 °C a 8 °C, o a -20 °C durante un mes. El ADN extraído es estable hasta tres ciclos de congelación/descongelación cuando se conserva a -20 °C.

Procedimiento de rehidratación de la mezcla maestra

1. Determine el número de muestras que se analizará y obtenga el número correcto de viales de mezcla maestra liofilizada para 8 pruebas.
2. Vuelva a guardar los reactivos sin utilizar en las condiciones de conservación adecuadas.
3. Abra cuidadosamente la mezcla maestra para evitar alterar el precipitado.
4. Añada 135 µl de solución de rehidratación a la mezcla maestra.
5. Coloque el vial a temperatura ambiente durante 1 - 2 minutos para permitir la rehidratación del precipitado.
6. Pipetee suavemente hacia arriba y hacia abajo 2 - 3 veces (evitando la formación de burbujas) antes de dispensar en el primer pocillo de la placa.

Nota: el volumen de la mezcla maestra rehidratada es suficiente para ocho reacciones.

Nota: la mezcla maestra rehidratada se puede conservar a temperatura ambiente durante un máximo de 4 horas o a una temperatura de 2 °C a 8 °C o ≤-20 °C durante un máximo de 3 días (consulte más opciones de conservación en la sección Conservación y manejo de los reactivos del kit).

Procedimiento de configuración del PCR:

1. Añada 15 µl de la mezcla maestra rehidratada a cada uno de los pocillos de la placa.
2. Añada 5 µl de ácidos nucleicos extraídos (muestra con PRC) a los pocillos de las placas. No es necesario mezclar los reactivos.
Nota: use una micropipeta con una nueva punta anti-aerosoles con cada una de las muestras extraídas.
3. Selle la placa.
Nota: Quidel sugiere que cada ciclo de termociclador incluya un pocillo con un control externo positivo de AdVH y un control negativo (que contiene un PRC). Ejecute los controles según los requisitos de acreditación o las normativas locales, regionales y/o nacionales y los procedimientos estándar de control de calidad de su laboratorio.
4. Centrifugue la placa durante al menos 15 segundos. Asegúrese de que todo el líquido esté en la parte inferior del tubo.
5. Introduzca la placa en el termociclador.

Protocolo de amplificación – Instrumento ABI 7500 y ABI 7500 Fast Dx

1. Encienda el instrumento ABI 7500 y ABI 7500 Fast Dx.
2. Inicie el paquete de software ABI 7500 y ABI 7500 Fast Dx (versión 1.4 o superior).
3. Se abrirá el cuadro de diálogo **Documento para inicio rápido**.
4. Haga clic en **Crear un nuevo documento**.
5. La mayoría de los siguientes parámetros deberían ser los valores predeterminados. En caso contrario, cámbielos en consonancia.

Ensayo:	Curva estándar (cuantificación absoluta)
Recipiente:	Transparente de 96 pocillos
Plantilla:	Lyra HAdV
Modo de análisis:	Fast 7500
Usuario:	<i>su nombre de usuario</i>
Comentarios:	SDS v1.4 (<i>añadir más si fuera necesario</i>)
Nombre de la placa:	AAMMDD-Lyra HAdV

6. Configuración de la placa de muestras:
 - a. En las fichas **Configuración** y **Placa**, aparecerá la configuración de placa.
 - b. Seleccione todos los pocillos que contengan muestra, haga clic con el botón derecho del ratón y seleccione **Inspector de pocillos** en el menú desplegable. Cuando se abra la ventana emergente **Inspector de pocillos**, seleccione los detectores de AdVH y el PRC.
 - c. Use el **Inspector de pocillos** para introducir los nombres de las muestras. Se debe introducir la identificación de los pacientes en la ventana **Inspector de pocillos**; sin embargo, se recomienda realizar esto antes de volver a suspender la mezcla maestra liofilizada, después del análisis o utilizar la función de importación para minimizar el tiempo en que las reacciones de PCR estarán a temperatura ambiente antes de iniciar el análisis.
 - d. Guarde el análisis como **AAMMDD-Lyra HAdV.sds**.
 - e. Se abrirá una ventana preguntándole por el «Motivo del cambio de la información». Introduzca **«Configuración»** y cualquier otro comentario relevante al análisis.
7. Inicio de la PCR:
 - a. Seleccione la ficha **Instrumento**.
 - b. Introduzca la placa de PCR de 96 pocillos en el instrumento.
 - c. En **Control del Instrumento**, seleccione el botón **Inicio** para iniciar el análisis.
8. Después de la PCR:
 - a. **IMPORTANTE:** cuando haya terminado el análisis, pulse Aceptar. Analice los datos pulsando el botón **«Analizar»** en el menú superior, y guarde el archivo.

- b. Guarde el archivo pulsando **Guardar documento** en la barra de tareas. Se abrirá una ventana preguntándole por el «Motivo del cambio de la información». Introduzca «**Análisis de datos posterior al análisis**» y cualquier otro comentario relevante al análisis.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Interpretación de los resultados del ensayo Lyra para adenovirus			
Resultado del ensayo	Detector: AdvH	Detector: PRC	Interpretación de los resultados
Negativo para AdvH	Ct <5,0 o Ct >35,0	5,0 ≤ Ct ≤ 35,0	No se ha detectado ADN de AdvH; PRC detectado
AdvH Positivo	5,0 ≤ Ct ≤ 35,0	N/C*	Se ha detectado ADN de AdvH
No válido	Ct <1,0 o Ct >35,0	Ct <1,0 o Ct >35,0	No se ha detectado ADN de AdvH ni PRC; prueba no válida. Vuelva a analizar la misma muestra purificada. Si esta prueba tampoco es válida, vuelva a extraer y repita el análisis con otra alícuota de la misma muestra u obtenga una nueva muestra y repita el análisis.
No válido	Indeterminado	Indeterminado	No determinado. Vuelva a analizar la misma muestra purificada. Si la prueba tampoco es válida, vuelva a extraer y repita el análisis con otra alícuota de la misma muestra u obtenga una nueva muestra y repita el análisis.

*No es necesario ningún valor de Ct para que el PRC tenga un resultado positivo.

CONTROL DE CALIDAD

El ensayo Lyra para adenovirus incorpora diversos controles para monitorizar el rendimiento del ensayo.

1. El PRC se debe utilizar durante la extracción y amplificación en el ensayo. Este control se debe añadir a cada alícuota de la muestra antes de la extracción (consulte más información en la sección titulada Principio del procedimiento).
2. Los controles externos positivos para AdvH disponibles comercialmente se pueden tratar como una muestra del paciente y se deben utilizar conforme a los requisitos de acreditación o las normativas locales, regionales y/o nacionales y los procedimientos estándar de control de calidad de su laboratorio. Las muestras positivas para AdvH caracterizadas previamente se pueden utilizar en lugar de un control comercial para AdvH.
3. Los medios de transporte viral (UTM, M4, M4-RT, M5 o M6) o la muestra negativa caracterizada previamente (que contiene un PRC) se pueden utilizar como un control externo negativo. Estos se pueden tratar como una muestra del paciente y se deben utilizar conforme a los requisitos de acreditación o las normativas locales, regionales y/o nacionales y los procedimientos estándar de control de calidad de su laboratorio.

LIMITACIONES

- Esta prueba no diferencia serotipos ni especies de AdvH. Se necesitan más análisis si se requiere la diferenciación por especies o serotipo.
- Los resultados negativos no excluyen una infección con el AdvH y no deben utilizarse como la única base de una decisión sobre el tratamiento.
- Incluya siempre un control negativo (que contiene un PRC) y, al menos, un control positivo en cada análisis de amplificación/detección realizado.
- La falta de controles (positivo, negativo y/o PRC) invalida el análisis y los resultados no se deben informar.
- Si el control positivo no es positivo dentro del intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, la repetición del análisis debe realizarse a partir del ácido nucleico purificado y utilizando una nueva alícuota del control positivo. Si los resultados de la repetición siguen siendo no válidos, no deben informarse y el análisis debe repetirse a partir de la muestra original o debe obtenerse y analizarse una nueva muestra.

- Si el PRC no es positivo o el control negativo no es válido, la repetición del análisis debe realizarse a partir de la muestra original utilizando nuevas alícuotas del PRC y el control negativo. Si los resultados de la repetición siguen siendo no válidos, no deben informarse y debe obtenerse y analizarse una nueva muestra.
- Los inhibidores presentes en la muestra y/o los errores en el seguimiento del procedimiento del ensayo pueden provocar resultados falsos negativos.
- Un profesional sanitario con formación debe interpretar los resultados del ensayo junto con los antecedentes médicos, los signos clínicos y los síntomas del paciente, así como los resultados de otras pruebas diagnósticas.
- No se ha establecido el rendimiento del ensayo en personas que recibieron corticosteroides por vía nasal.
- No se ha establecido el rendimiento del ensayo en personas que recibieron la vacuna para la gripe por vía nasal.
- El efecto de las sustancias interferentes solamente se ha evaluado para las sustancias que aparecen en el etiquetado. La interferencia por otras sustancias diferentes a las que se describen en la sección «Especificidad analítica – Sustancias interferentes» a continuación puede conducir a resultados erróneos.
- El efecto de la reactividad cruzada y la interferencia solamente se ha evaluado con los microorganismos que se indican en la etiqueta. La reactividad cruzada con microorganismos de las vías respiratorias diferentes a los indicados en la sección «Interferencia y reactividad cruzada microbiológicas» a continuación puede conducir a resultados erróneos.
- Los analitos diana del ensayo (secuencia de ácido nucleico del AdVH) pueden persistir *in vivo*, con independencia de la viabilidad del virus. La detección de analitos diana no implica que el virus correspondiente sea infeccioso ni que sea el agente causante de los síntomas clínicos.
- La detección de las secuencias virales depende de que se realice de un modo adecuado la obtención, manipulación, transporte, conservación y preparación (incluida la extracción) de las muestras. En caso de no seguir los procedimientos adecuados en alguno de estos pasos, se pueden producir resultados incorrectos. Existe el riesgo de obtener valores falsos negativos como consecuencia de una obtención, transporte o manipulación inadecuados de las muestras.
- Existe un riesgo de valores falsos positivos como resultado de contaminación cruzada por microorganismos diana, sus ácidos nucleicos o producto amplificado, o de señales no específicas en el ensayo.
- Existe un riesgo de valores falsos negativos debido a la presencia de variantes de secuencia en la diana viral del ensayo.
- No se ha establecido el rendimiento del ensayo Lyra para adenovirus en pacientes inmunodeprimidos.
- En el estudio de reactividad analítica (inclusividad), fue necesario repetir el análisis en tres tipos de AdVH estudiados y finalmente se detectaron a 250x LoD (ADV-21/Serotipo B) y 6x LoD (ADV-15 y ADV-17/Serotipo D) para sus respectivos serotipos.
- Los valores predictivos positivos y negativos dependen en gran medida de la prevalencia y pueden variar dependiendo de la población analizada. El rendimiento del ensayo Lyra para adenovirus utilizando el instrumento ABI 7500 Fast Dx se estableció durante los inviernos de 2013 y 2014.

VALORES PREVISTOS

Se realizó un estudio clínico prospectivo con el ensayo Lyra para adenovirus utilizando el instrumento ABI 7500 Fast Dx. El análisis se realizó con mil doscientas cuarenta y una (1241) muestras de exudado nasal y exudado nasofaríngeo obtenidas de tres centros de todo Estados Unidos durante los inviernos de 2013 y 2014 (enero-marzo de 2013 y diciembre-febrero de 2014). La prevalencia general promedio (todos los centros combinados) para AdVH fue de 2,8 %. La tabla a continuación proporciona los valores previstos para AdVH.

Valores previstos para el invierno de 2013 y 2014 (combinado)					
Edad	N.º muestras analizadas	Ensayo Lyra para adenovirus positivo	Valor previsto	Positivo total por el método de referencia	Prevalencia observada
<1	73	8	11,0 %	1	1,4 %
1 a 5	452	60	13,3 %	24	5,3 %
6 a 10	157	10	6,4 %	4	2,5 %
11 a 15	67	4	6,0 %	2	3,0 %
16 a 21	55	3	5,5 %	1	1,8 %
>21	437	4	0,9 %	3	0,7 %
Total	1241	89	7,2 %	35	2,8 %

RENDIMIENTO CLÍNICO

La evaluación del ensayo Lyra para adenovirus se produjo en un estudio prospectivo multicéntrico utilizando mil doscientas cuarenta y una (1241) muestras recientes obtenidas de las vías respiratorias superiores en tres centros de Estados Unidos (una *in situ*). Estos datos se complementaron con los resultados obtenidos del análisis de ciento cinco (105) muestras congeladas, seleccionadas retrospectivamente, obtenidas de las vías respiratorias superiores en un único centro de Estados Unidos. Todas las muestras prospectivas y retrospectivas se procesaron utilizando el sistema bioMérieux NucliSENS easyMag para extraer los ácidos nucleicos virales. El instrumento ABI 7500 Fast Dx se utilizó con el ensayo Lyra para adenovirus para la amplificación y detección del ADN diana.

Estudio clínico prospectivo

Para el estudio prospectivo, el ensayo Lyra para adenovirus con el instrumento ABI 7500 Fast Dx se comparó con un kit de detección directa para muestras respiratorias aprobado por la FDA. El kit es un método compuesto de cultivo viral con tinción directa con un antígeno fluorescente (CDFA) seguido por tinción directa con un anticuerpo fluorescente de la muestra (SDFA). Una muestra era positiva si la CDFA o SDFA era positiva. Para que una muestra se considere negativa, tanto la CDFA como la SDFA deben ser negativas.

A continuación, se indican los datos demográficos por sexo y edad de las muestras obtenidas prospectivamente.

Distribución por edad y sexo en el estudio clínico prospectivo		
Sexo	Mujer	Hombre
Total	651	590
Edad		
<1	31	42
1 a 5	210	242
6 a 10	86	71
11 a 15	31	36
16 a 21	33	22
>21	260	177

Se obtuvieron mil doscientas cuarenta y una (1241) muestras recientes y se transportaron a cada laboratorio para su análisis con el ensayo Lyra para adenovirus. Los centros 2 y 3 realizaron la extracción y análisis de todas las muestras obtenidas en sus centros. Las muestras obtenidas en el centro 1 se enviaron a un laboratorio de análisis *in situ* donde se extrajeron y analizaron utilizando el ensayo Lyra para adenovirus. Las muestras obtenidas en estos centros se extrajeron en las 72 horas siguientes a la obtención utilizando el sistema bioMérieux NucliSENS easyMag y después se analizaron utilizando el ensayo Lyra para adenovirus en el instrumento ABI 7500 Fast Dx. Todos los análisis de las referencias con el método de comparación se realizaron en un laboratorio de análisis *in situ*. Las muestras se enviaron diariamente a este lugar con bolsas frías y se cultivaron en las 72 horas siguientes de la obtención.

Dos (2) muestras no fueron válidas cuando se analizaron inicialmente con el ensayo Lyra para adenovirus. Las muestras se volvieron a analizar conforme a las instrucciones de uso y fueron no válidas al repetir el análisis. Las muestras se han eliminado de los datos que se presentan a continuación. La tabla a continuación detalla los resultados de AdvH para el resto de las mil doscientas treinta y nueve (1239) muestras.

Datos combinados de centros – Muestras prospectivas			
Ensayo Lyra para adenovirus	Comparador: CDFA con SDFA		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	35	54*	89
Negativo	0	1150	1150
Total	35	1204	1239
IC del 95 %			
Sensibilidad	35/35	100 %	90,1 % a 100 %
Especificidad	1150/1204	95,5 %	94,2 % a 96,5 %

*Cuarenta y cinco (45) de las cincuenta y cuatro (54) muestras positivas fueron positivas cuando se analizaron en un ensayo de PCR adicional aprobado por la FDA. Cuatro (4) de las cincuenta y cuatro (54) muestras positivas fueron

negativas cuando se analizaron en un ensayo de PCR adicional aprobado por la FDA. Dos (2) de las cincuenta y cuatro (54) muestras positivas fueron no válidas en un ensayo de PCR adicional aprobado por la FDA. Tres (3) de las cincuenta y cuatro (54) muestras positivas carecían de suficiente volumen para más análisis.

Muestras seleccionadas retrospectivamente

Debido a la baja prevalencia de adenovirus en los centros clínicos durante el período del estudio, también se analizaron una serie de muestras seleccionadas retrospectivamente. Se obtuvieron ciento cinco (105) muestras congeladas de exudado nasofaríngeo de un hospital pediátrico en el sur de Estados Unidos. Estas muestras se seleccionaron en función de un resultado cualitativo generado previamente por un panel respiratorio aprobado por la FDA. Todas las muestras se conservaron congeladas a -70°C hasta que se enviaron a un laboratorio de análisis *in situ* donde se extrajeron y analizaron con el ensayo Lyra para adenovirus y el ensayo de comparación, un ensayo de PCR aprobado por la FDA. El usuario que realiza el análisis desconocía la identidad de estas muestras. La tabla a continuación muestra la concordancia del ensayo Lyra para adenovirus con el ensayo de comparación (un ensayo de PCR aprobado por la FDA).

Datos de un solo centro – Muestras seleccionadas retrospectivamente			
Ensayo Lyra para adenovirus	Comparador: Ensayo de PCR aprobado por la FDA		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	27	1*	28
Negativo	0	77	77
Total	27	78	105
IC del 95 %			
Concordancia porcentual positiva	27/27	100 %	87,5 % a 100 %
Concordancia porcentual negativa	77/78	98,7 %	93,1 % a 99,8 %

*Una (1) muestra de una (1) muestra positiva fue positiva cuando se analizó con un ensayo de PCR de terceros aprobado por la FDA.

RENDIMIENTO ANALÍTICO

Límite de detección

La sensibilidad analítica (límite de detección o LoD) del ensayo Lyra para adenovirus se determinó utilizando *stocks* cuantificados (TCID₅₀/ml) de serotipos representativos de seis (6) especies de AdVH diluidos en serie en una matriz nasal negativa. Cada una de las diluciones estudiadas se extrajo en duplicados de 20 por concentración utilizando el sistema bioMérieux NucliSENS easyMag y se analizó en el instrumento ABI 7500 Fast Dx. El análisis se realizó con tres lotes de dispositivos fabricados. El LoD se define como la concentración más baja a la que el 95 % de todos los duplicados tuvieron un resultado de análisis positivo.

Resumen del estudio de LoD		
Especie/serotipo	LoD (TCID ₅₀ /ml)	Valor de Ct promed.
A/31	$8,00 \times 10^{-2}$	28,5
B/3	$8,00 \times 10^{-2}$	28,3
C/1	$8,00 \times 10^{-2}$	28,1
D/19	$1,61 \times 10^1$	28,6
E/4	$1,00 \times 10^0$	27,7
F/41	$3,20 \times 10^{-2}$	28,9

Reactividad analítica (inclusividad)

Para verificar que el ensayo Lyra para adenovirus detecta los cincuenta y dos (52) serotipos conocidos de AdVH, se analizaron inicialmente 49 serotipos en el LoD de las especies o cerca de este (véase arriba). Se estudiaron concentraciones más altas si el microorganismo no se detectaba en el LoD. El ensayo Lyra para adenovirus detectó cada uno de los 49 serotipos estudiados. Tres tipos no se detectaron a 2x LoD. Estos tipos se volvieron a analizar y finalmente se detectaron a 250x LoD (ADV-21/Serotipo B) y 6x LoD (ADV-15 y ADV-17/Serotipo D) para sus respectivos serotipos.

Resumen de reactividad de los serotipos de AdVH			
Especie	Serotipo	Concentración estudiada (TCID ₅₀ /ml)	Múltiplo de LoD detectado
A	AdVH-12	1,60 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-18	1,60 x 10 ⁻¹	2x LoD
B	AdVH-7	1,60 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-11	1,60 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-14	1,60 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-16	1,60 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-21	2,00 x 10 ¹	250x LoD*
	AdVH-34	1,60 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-35	1,60 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-50	1,60 x 10 ⁻¹	2x LoD
C	AdVH-2	1,60 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-5	1,60 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-6	1,60 x 10 ⁻¹	2x LoD
F	AdVH-40	6,40 x 10 ⁻²	2x LoD
D	AdVH-8	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-9	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-10	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-13	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-15	9,66 x 10 ¹	6x LoD*
	AdVH-17	9,66 x 10 ¹	6x LoD*
	AdVH-20	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-22	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-23	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-24	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-25	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-26	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-27	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-28	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-29	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-30	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-32	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-33	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-36	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdVH-37	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
AdVH-39	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD	
AdVH-43	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD	
AdVH-44	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD	
AdVH-45	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD	

Resumen de reactividad de los serotipos de AdvH			
Especie	Serotipo	Concentración estudiada (TCID ₅₀ /ml)	Múltiplo de LoD detectado
	AdvH-46	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdvH-47	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdvH-48	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdvH-49	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD
	AdvH-51	3,22 x 10 ⁻¹	2x LoD

*AdvH-15, AdvH-17 y AdvH-21 requirieron la repetición del análisis y finalmente se detectaron a 6x LoD (AdvH-15 y AdvH-17) y 250x LoD (AdvH-21).

NOTA: la mayoría de los virus se volvieron a cultivar y cuantificaron en TCID₅₀ (dosis infecciosa de cultivo de tejidos al 50 %) para determinación del LoD. La unidad TCID₅₀ es una medida de la infectividad o citotoxicidad en vez del número de microorganismos o copias de ácido nucleico. Es posible que la variabilidad en el valor TCID₅₀/ml no refleje con exactitud las diferencias en la sensibilidad relativa de detección entre diferentes cepas del mismo microorganismo.

No se evaluó la inclusividad de los serotipos 38 y 42 del AdvH D y el serotipo 52 del AdvH G (con frecuencia asociado con la conjuntivitis y la gastroenteritis) ya que el promotor no pudo obtener estas cepas. En su lugar, el fabricante realizó un análisis *in silico* donde alinearon sus sondas y cebadores con las regiones diana de una única secuencia (obtenida de GenBank) para cada uno de estos tipos de adenovirus. La alienación mostró una concordancia del 100 % del cebador directo con los tipos 38, 42 y 52. Para el cebador inverso, se detectaron 3 discordancias en las secuencias de los tipos 38 y 42 (homología del 84 %) y 2 discordancias con la secuencia para el tipo 52 (homología del 89,5 %). Para la sonda, hubo una concordancia del 100 % con los tipos 38 y 42 y 3 discordancias con la secuencia para el tipo 52 (homología del 85 %).

Estudio de reproducibilidad

La reproducibilidad del ensayo Lyra para adenovirus se evaluó en tres (3) laboratorios (dos externos, uno *in situ*). El panel de reproducibilidad consistió en cuatro (4) muestras simuladas que incluyeron muestras moderadamente positivas (5x LoD) y positivas bajas (2x LoD), altamente negativas (0,5x LoD) y negativas (matriz nasal negativa para ADV). Los integrantes del panel positivos para AdvH se crearon cultivando el AdvH tipo 31 en una matriz nasal negativa. Los paneles y los controles (control positivo para ADV y control negativo para ADV) se extrajeron con el sistema bioMérieux NucliSENS easyMAG y se analizaron con el ensayo Lyra para adenovirus ejecutado en el instrumento ABI 7500 Fast Dx. Los paneles y controles fueron analizados en cada centro por 2 usuarios durante 5 días no consecutivos (análisis por triplicado x 2 usuarios x 3 duplicados x 5 días x 3 centros = 90 resultados por nivel para cada virus). Los valores de LoD se basaron en los valores obtenidos en el estudio del LoD.

Resultados de reproducibilidad - Applied Biosystems 7500 Fast Dx												
Panel ID de miembro	Centro 1			Centro 2			Centro 3			Datos combinados de centro		
	Tasa de detección	AVE Ct	% CV	Tasa de detección	AVE Ct	% CV	Tasa de detección	AVE Ct	% CV	Tasa de detección	AVE Ct	% CV
Muy negativo para AdvH (0,5x LoD)	30/30	29,0	4,9	30/30	28,9	4,2	26/30*	27,8	8,8	86/90*	28,6	6,2
Positivo bajo para AdvH (2x LoD)	30/30	26,7	2,3	30/30	26,2	3,0	30/30	26,1	9,3	90/90	26,4	5,9
Moderadamente positivo para AdvH (5x LoD)	30/30	25,2	1,7	30/30	24,8	3,0	30/30	24,1	6,8	90/90	24,8	4,8
Matriz nasal negativa	0/30	N/C	N/C	0/30	N/C	N/C	0/30	N/C	N/C	0/90	N/C	N/C

Resultados de reproducibilidad - Applied Biosystems 7500 Fast Dx												
Panel ID de miembro	Centro 1			Centro 2			Centro 3			Datos combinados de centro		
	Tasa de detección	AVE Ct	% CV	Tasa de detección	AVE Ct	% CV	Tasa de detección	AVE Ct	% CV	Tasa de detección	AVE Ct	% CV
para AdVH												
Control positivo para AdVH	30/30	20,5	2,5	30/30	18,2	3,9	30/30	17,1	3,7	90/90	18,6	8,5
AdVH Control negativo	0/30	N/C	N/C	0/30	N/C	N/C	0/30	N/C	N/C	0/90	N/C	N/C

*Se eliminó un duplicado del análisis porque dio un resultado no válido en el PRC. Tres duplicados dieron un resultado incorrectamente negativo.

Interferencia y reactividad cruzada microbiológicas

La especificidad analítica del ensayo Lyra para adenovirus se evaluó analizando un panel comprendido por 30 virus, 26 bacterias y 1 levadura que representaban los patógenos respiratorios o la flora presentes habitualmente en la nasofaringe. Los microorganismos se analizaron en presencia y ausencia de 2x LoD de AdVH para determinar si se trataba de interferencia o reactividad cruzada, respectivamente. Las muestras se extrajeron utilizando el instrumento NucliSENS easyMAG y se analizaron por triplicado. Todas las muestras positivas para AdVH siguieron dando positivo y todas las muestras negativas para AdVH siguieron dando negativo, lo que indica que no había interferencia ni reactividad cruzada en presencia de los microorganismos estudiados. Cada uno de los microorganismos se analizó tres veces, una vez en presencia del AdVH tipo 4, una vez en presencia del AdVH tipo 31 y una vez en presencia de matriz nasal negativa.

Los microorganismos utilizados para el estudio fueron los siguientes:

Microorganismo	Concentración estudiada (TCID ₅₀ /ml o UFC/ml)	Resultado en el ensayo Lyra para adenovirus	
		Interferencia (+ para AdVH)	Reactividad cruzada (- para AdVH)
<i>Bordetella pertussis</i>	9,08E+08	Positivo	Negativo
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	5,40E+08	Positivo	Negativo
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	0,11 ng/μl	Positivo	Negativo
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2,10E+06	Positivo	Negativo
<i>Legionella pneumophila</i>	1,42E+09	Positivo	Negativo
<i>Mycobacterium intracellualre</i>	1,53E+09	Positivo	Negativo
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9,30E+06	Positivo	Negativo
<i>Mycobacterium avium</i>	3,18E+09	Positivo	Negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	3,16E+06	Positivo	Negativo
<i>Haemophilus influenzae</i>	4,00E+08	Positivo	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,32E+09	Positivo	Negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	6,53E+08	Positivo	Negativo
<i>Proteus mirabilis</i>	1,19E+09	Positivo	Negativo
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,40E+09	Positivo	Negativo
<i>Neisseria meningitidis</i>	1,29E+08	Positivo	Negativo
<i>Neisseria mucosa</i>	1,61E+08	Positivo	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9,75E+08	Positivo	Negativo
<i>Escherichia coli</i>	1,13E+09	Positivo	Negativo
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,26E+09	Positivo	Negativo
<i>Corynebacterium diptheriae</i>	3,44E+08	Positivo	Negativo
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,18E+08	Positivo	Negativo

Microorganismo	Concentración estudiada (TCID ₅₀ /ml o UFC/ml)	Resultado en el ensayo Lyra para adenovirus	
		Interferencia (+ para AdVH)	Reactividad cruzada (- para AdVH)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,43E+08	Positivo	Negativo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	6,38E+08	Positivo	Negativo
<i>Streptococcus salivarius</i>	5,40E+08	Positivo	Negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9,23E+08	Positivo	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,08E+08	Positivo	Negativo
<i>Candida albican</i>	9,70E+07	Positivo	Negativo
Coronavirus 229E	2,46E+07	Positivo	Negativo
Coronavirus NL63	1,41E+04	Positivo	Negativo
Coronavirus OC43	2,42E+07	Positivo	Negativo
Virus Coxsackie B4	2,00E+07	Positivo	Negativo
Virus Coxsackie B5/10/2006	3,62E+05	Positivo	Negativo
Citomegalovirus	2,14E+06	Positivo	Negativo
Ecovirus 6	7,60E+08	Positivo	Negativo
Ecovirus 7	4,45E+06	Positivo	Negativo
Ecovirus 9	2,17E+07	Positivo	Negativo
Ecovirus 11	2,17E+05	Positivo	Negativo
Enterovirus 70	2,41E+06	Positivo	Negativo
Enterovirus 71	2,03E+05	Positivo	Negativo
Virus Epstein Barr	9,27E+07	Positivo	Negativo
Cepa MacIntyre tipo 1 del VHS	5,89E+06	Positivo	Negativo
Cepa G tipo 2 del VHS	1,96E+06	Positivo	Negativo
Metapneumovirus (A1) humano	3,66E+05	Positivo	Negativo
Rinovirus 45 humano	2,94E+04	Positivo	Negativo
Rinovirus 52 humano	2,63E+04	Positivo	Negativo
Gripe A/México/4108/2009	4,08E+05	Positivo	Negativo
Gripe A/Port Chalmers	3,55E+08	Positivo	Negativo
Gripe B/Florida/04/2006	1,54E+06	Positivo	Negativo
Sarampión	1,95E+06	Positivo	Negativo
Virus de las paperas	2,75E+08	Positivo	Negativo
Paragripal tipo 1	3,97E+06	Positivo	Negativo
Paragripal tipo 2	3,15E+08	Positivo	Negativo
Paragripal tipo 3	2,36E+07	Positivo	Negativo
Paragripal tipo 4A	1,04E+05	Positivo	Negativo
VSR A (largo)	4,36E+04	Positivo	Negativo
VSR B (lavado/18537/62)	3,43E+05	Positivo	Negativo
Virus zóster de la varicela	1,11E+04	Positivo	Negativo

Especificidad analítica – Sustancias interferentes

El rendimiento del ensayo Lyra para adenovirus se evaluó con sustancias potencialmente interferentes que podría haber en las muestras nasofaríngeas. Las 11 posibles sustancias potencialmente interferentes se evaluaron utilizando AdVH a una concentración de 2x LoD. Cada una de las sustancias interferentes se analizó tres veces, una vez en presencia del AdVH tipo 4, una vez en presencia del AdVH tipo 31 y una vez en presencia de matriz nasal negativa. Todas las muestras positivas para AdVH siguieron dando positivo y todas las muestras negativas para AdVH siguieron dando negativo, lo que indica que no había interferencia en presencia de las sustancias estudiadas.

Nombre de la sustancia	Concentración estudiada
Mucina (glándula submaxilar bovina, tipo I-S)	60 µg/ml
Sangre (humana), anticoagulada con EDTA	2 % (vol/vol)
Neo-Sinefrina	15 % (vol/vol)

Nombre de la sustancia	Concentración estudiada
Aerosol nasal Afrin	15 % (vol/vol)
Gel nasal líquido homeopático Zicam antigoteo para alivio de la alergia que no produce sueño	5 % (vol/vol)
Aerosol nasal de solución salina	15 % (vol/vol) de dosis
Pastillas para la garganta	0,68 g/ml; 1/18 gotas, trituradas; principios activos: 1,7 mg/ml mentol
Zanamivir	3,3-5 mg/ml
Tobramicina	4,0 µg/ml
Mupirocina	6,6-10 mg/ml
Fosfato de oseltamivir	7,5-25 mg/ml

Estudio de contaminación de arrastre/cruzada

Se realizó un estudio de arrastre utilizando un panel de 96 muestras que comprendía 48 muestras altamente positivas ($1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/ml AdVH tipo 4) y 48 muestras negativas (matriz nasal negativa). Las muestras altamente positivas se extrajeron y añadieron a la placa en un patrón de tablero de ajedrez que alternó con las muestras negativas. Esta prueba se repitió a lo largo de un período de 5 días. No hubo evidencia de contaminación de arrastre/cruzada con el ensayo Lyra para adenovirus utilizando el instrumento automatizado de extracción de ácidos nucleicos NucliSens easyMAG y el instrumento ABI 7500 Fast Dx.

MATERIAL ORIGINAL ADICIONAL

1. Guidance on Informed Consent for In Vitro Diagnostic Device Studies Leftover Human Specimens that are Not Individually Identifiable (April 2006) – <http://www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/1588.pdf>.
2. Draft Guidance on Nucleic Acid Based In Vitro Diagnostic Devices for Detection of Microbial Pathogens (Dec 2005) – <http://www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/1560.html>.
3. CLSI EP17-A: Guidance for Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitations (Vol. 2, No. 34) (Oct 2004).
4. CLSI MM13-A: Guidance for the Collection, Transport, Preparation and Storage of Specimens for Molecular Methods (Vol. 25, No. 31) (Dec 2005).
5. CLSI EP7-A2: Guidance for Interference Testing in Clinical Chemistry (Vol. 25, No.27 Second Ed) (Nov 2005).
6. CLSI EP12-A: Guidance for User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance (Vol. 22, No. 14) (Sept 2002).
7. CLSI MM6-A: Guidance for the Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases (Vol. 23, No.28) (Oct 2003).
8. CLSI EP5-A2: Guidance for Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Vol. 24, No. 25 Second Ed.) (Aug 2004).

SERVICIO DE ATENCIÓN AL CLIENTE Y SERVICIO TÉCNICO

Para realizar un pedido o para obtener servicio técnico, llame a un representante de Quidel al 800-874-1517 (en EE. UU.) o al +1 858-552-1100 (fuera de EE. UU.) de lunes a viernes, de 8:00 a. m. a 5:00 p. m. (horario de la costa este). Los pedidos se pueden realizar también por fax en el 740-592-9820. Para recibir servicio técnico por correo electrónico, póngase en contacto con customerservice@quidel.com o technicalsupport@quidel.com. Para servicios fuera de EE. UU., póngase en contacto con su distribuidor local. Puede encontrar más información sobre Quidel y nuestros productos y distribuidores en nuestro sitio web, quidel.com.

PROPIEDAD INTELECTUAL

La compra de este producto otorga al comprador derechos bajo ciertas patentes de Roche para usarlo exclusivamente para ofrecer servicios de diagnóstico *in vitro* en humanos. Mediante el presente documento no se otorga ninguna patente general ni otra licencia de cualquier tipo diferente de este derecho específico de uso.

Los compuestos colorantes de este producto se venden bajo la licencia de Biosearch Technologies, Inc. y están protegidos por patentes estadounidenses e internacionales emitidas o pendientes.

REFERENCIAS

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Viral Culture; Approved Guidelines. CLSI document M41-A [ISBN 1562386239] Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2006.

REF

M113 – Lyra Adenovirus Assay kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Alemania



Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PIM113001ES00 (01/17)

GLOSARIO

REF

Número del catálogo



Marca CE de conformidad

EC REP

Representante Autorizado
en la Comunidad Europea

LOT

Código de lote



Usar antes de



Fabricante



Limites de temperatura



Uso previsto

R_x ONLY

Uso bajo receta solamente



Consulte etiquetado electrónico
para instrucciones de uso



Riesgos biológicos

IVD

Para uso diagnóstico *in vitro*



Contiene una cantidad suficiente para
96 determinaciones

CONT

Contenido / Contiene

CONTROL

Control
