

USA - Da utilizzarsi esclusivamente previa autorizzazione  
all'uso di emergenza (EUA)



**Per la rilevazione qualitativa dell'RNA virale del coronavirus umano SARS-CoV-2 estratto da tamponi nasali, rinofaringei e orofaringei.**

Per uso diagnostico *in vitro*.

Alla pagina [quidel.com/glossary](http://quidel.com/glossary) è disponibile un glossario dei simboli.

## INDICE

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE .....	2
PRINCIPIO DELLA PROCEDURA .....	3
MATERIALE FORNITO .....	3
MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO .....	4
AVVERTENZE E PRECAUZIONI .....	4
Conservazione e manipolazione dei reagenti del kit .....	5
Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti .....	5
Raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni .....	6
Conservazione degli estratti di acidi nucleici .....	6
Istruzioni per la programmazione dell'estrazione degli acidi nucleici bioMérieux NucliSENS easyMAG .....	6
PROCEDURA DI DOSAGGIO .....	8
Procedura di reidratazione del master mix .....	8
Procedura di configurazione RT-PCR: .....	8
CONTROLLO QUALITÀ .....	9
PRESTAZIONI ANALITICHE .....	11
Limite di rilevamento .....	11
REATTIVITÀ ANALITICA (inclusività) .....	15
SPECIFICITÀ ANALITICA (Reattività crociata) .....	15
LIMITAZIONI .....	17
ASSISTENZA TECNICA E ALLA CLIENTELA .....	18
PROPRIETÀ INTELLETTUALE .....	18
BIBLIOGRAFIA .....	18
APPENDICE: (programmazione e protocolli di analisi specifici di ciascun termociclatore) .....	19
Istruzioni per la programmazione di Applied Biosystems 7500 Fast Dx .....	19

Procedura di analisi per termociclatore Applied Biosystems 7500 Fast Dx .....	20
Istruzioni per la programmazione di Applied Biosystems 7500 Standard.....	21
Procedura di analisi per termociclatore Applied Biosystems 7500 Standard .....	23
Procedura di programmazione del termociclatore Bio-Rad CFX96 Touch .....	24
Procedura di test del termociclatore Bio-Rad CFX96 Touch .....	25
Istruzioni per la programmazione di Qiagen Rotor-Gene Q.....	26
Ciclo di analisi con Qiagen Rotor-Gene Q .....	28
Istruzioni per la programmazione di Roche LightCycler 480 Instrument II.....	29
Creazione di un modello di ciclo del dosaggio con LightCycler 480 II.....	29
Creazione di una procedura di analisi del dosaggio LightCycler 480 II .....	30
Istruzioni per la programmazione di Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro .....	31
Creazione di una procedura di analisi con Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro .....	32
GLOSSARIO .....	35



## USO PREVISTO

Lyra SARS-CoV-2 Assay è un dosaggio in tempo reale RT-PCR per la rilevazione qualitativa dell'acido nucleico di SARS-CoV-2 in campioni di tamponi nasali, rinofaringei (RF) o orofaringei (OF) ottenuti da pazienti che, a parere dell'operatore sanitario di riferimento, presentano una sospetta infezione da COVID-19. Il dosaggio prende in considerazione la poliproteina non strutturale (pp1ab) del virus SARS-CoV-2. Il test autorizzato consiste nell'estrazione dell'acido nucleico sul sistema bioMérieux NucliSENS® easyMAG® o sul sistema EMAG®, seguita da RT-PCR sullo strumento PCR in tempo reale approvato dalla FDA.

I risultati sono tesi all'identificazione dell'RNA di SARS-CoV-2. Generalmente, SARS-CoV-2 è rilevabile in campioni prelevati dalle alte vie respiratorie nella fase acuta dell'infezione. I risultati positivi sono indicativi della presenza dell'RNA di SARS-CoV-2; per stabilire lo stato infettivo del paziente è necessaria la correlazione clinica con l'anamnesi del paziente e altre informazioni diagnostiche. Un risultato positivo non esclude infezioni batteriche o coinfezioni da altri virus. I laboratori degli Stati Uniti e relativi territori sono tenuti a segnalare tutti i risultati positivi alle autorità sanitarie competenti.

Un risultato negativo non preclude l'infezione da SARS-CoV-2 e non deve essere utilizzato come sola base per le decisioni di gestione dei pazienti. Esso deve essere considerato unitamente alle osservazioni cliniche, all'anamnesi del paziente e alle informazioni epidemiologiche.

Lyra SARS-CoV-2 Assay è destinato all'uso da parte di personale di laboratorio in possesso di una debita qualifica e una formazione specifica nelle tecniche di real-time PCR e nelle procedure diagnostiche *in vitro*.

## RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Il virus SARS-CoV-2, noto anche come COVID-19, è stato identificato per la prima volta a Wuhan, nella provincia cinese dello Hubei, nel dicembre del 2019. Si ritiene che il virus, così come i nuovi coronavirus SARS-1 e MERS, abbia avuto origine nei pipistrelli, tuttavia il SARS-CoV-2 potrebbe avere avuto ospiti intermedi come pangolini, maiali o zibetti.<sup>1</sup> All'inizio di marzo 2020, l'infezione nell'essere umano si era diffusa in 74 Paesi, infettando oltre 92.000 persone e uccidendone oltre 3.100.<sup>1</sup> In data 11 marzo, l'OMS ha dichiarato l'epidemia da SARS-CoV-2 una pandemia globale.

Il tempo medio di incubazione è stimato in 5,1 giorni e la manifestazione dei sintomi è prevista entro 12 giorni dall'infezione.<sup>3</sup> I sintomi di COVID-19 sono simili a quelli di altre malattie respiratorie virali e includono febbre, tosse e dispnea.<sup>4</sup>

Lyra SARS-CoV-2 Assay è progettato per rilevare specificamente l'RNA di SARS-CoV-2.

## PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Lyra SARS-CoV-2 Assay rileva l'RNA virale di SARS-CoV-2 estratto dal campione di un paziente utilizzando il sistema bioMérieux NucliSENS® easyMAG® o il sistema EMAG®. Una reazione in tempo reale RT-PCR Multiplex viene eseguita in condizioni ottimizzate in una singola provetta generando ampliconi (se presenti) per il virus target e il controllo di processo (PRC) presente nel campione. Questa reazione viene eseguita utilizzando uno dei sei termociclatori seguenti: Applied Biosystems® 7500 Fast Dx, Applied Biosystems® 7500 Standard, Roche LightCycler® 480, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96 Touch™, Thermo Fisher QuantStudio™ 7 Pro. L'identificazione del virus SARS-CoV-2 avviene mediante l'uso di primer e sonde etichettate fluorescenti specifici per il target che ibridano una regione conservata della poliproteina non strutturale del virus SARS-CoV-2.

Etichette delle sonde di Lyra SARS-CoV-2 Assay	
Target	Colorante
Poliproteina non strutturale (pp1ab)	FAM
Controllo di processo (PRC)	Quasar® 670

Di seguito è riportato un riepilogo della procedura:

- Raccolta dei campioni:** mediante tecniche standard, ottenere dei tamponi rinofaringei, orofaringei o nasali da pazienti sintomatici. I campioni devono essere trasportati, conservati e processati secondo procedure di laboratorio consolidate. <sup>1</sup>
- Estrazione dell'acido nucleico:** estrarre gli acidi nucleici dai campioni con i sistemi NucliSENS easyMAG o EMAG secondo le istruzioni del produttore e utilizzando i reagenti adeguati (vedere **Materiale necessario ma non fornito**).  
Prima della procedura di estrazione, aggiungere 20 µl di controllo di processo (PRC) a ciascuna aliquota di 180 µl di campione o di controlli. Il PRC consente di monitorare gli inibitori nel campione estratto, assicura che sia avvenuta un'amplificazione adeguata e conferma che l'estrazione degli acidi nucleici sia stata sufficiente.
- Reidratazione del master mix:** reidratare il master mix liofilizzato utilizzando 135 µl di soluzione reidratante. Il master mix contiene primer oligonucleotidici, sonde etichettate con fluoroforo e quencher che hanno come target le regioni conservate di SARS-CoV-2, e una sequenza di controllo del processo. Le sonde presentano una doppia etichettatura con colorante reporter legato all'estremità 5' e un quencher legato all'estremità 3'. Il master mix reidratato è sufficiente per otto reazioni.
- Amplificazione e rilevazione dell'acido nucleico:** aggiungere 15 µl di master mix reidratato a ciascun pozzetto (Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, the Roche LightCycler 480) o provetta (Qiagen Rotor-Gene Q). Quindi, aggiungere 5 µl di acidi nucleici estratti (campione con PRC) al pozzetto della piastra o alla provetta. Collocare la piastra o la provetta nello strumento appropriato.

Il protocollo del dosaggio può essere avviato dopo aver inserito nello strumento la piastra o le provette di reazione. Questo protocollo avvia la trascrizione inversa dei target RNA che generano il DNA complementare, quindi si verifica la successiva amplificazione delle sequenze target. Lyra SARS-CoV-2 Assay si basa sulla chimica TaqMan® e utilizza un enzima con attività di trascrittasi inversa, DNA polimerasi e attività esonucleasica 5'-3'. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima scinde la sonda legata alla sequenza di DNA complementare, separando il colorante quencher dal colorante reporter. Questo passaggio genera un aumento del segnale fluorescente a causa dell'eccitazione da parte di una sorgente luminosa di lunghezza d'onda adeguata. A ogni ciclo, nuove molecole di colorante vengono separate dai rispettivi quencher andando a intensificare ulteriormente il segnale. Se viene raggiunta una fluorescenza sufficiente, il campione viene segnalato come positivo per la sequenza target rilevata.

## MATERIALE FORNITO

Cat. N. M120

Kit di rilevazione (96 reazioni) – Conservare a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C		
N.	Componente	Quantità
1	Soluzione reidratante Parte n. M5003	1 flacone/kit da 1,9 ml
2	Lyra SARS-CoV-2 Master Mix Parte n. M5150 Contenuto liofilizzato: enzima DNA polimerasi con attività di trascrittasi inversa coppie di primer oligonucleotidici; sonde oligonucleotidiche	12 flaconi/kit, 8 reazioni/flacone

Kit di rilevazione (96 reazioni) – Conservare a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C		
N.	Componente	Quantità
	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP) Stabilizzanti	
<b>CONTROL</b>	<b>Controllo di processo</b> Parte n. M5273	1 flacone/kit da 2,0 ml
<b>CONTROL +</b>	<b>Controllo positivo</b> contenente RNA sintetico di SARS-CoV-2 , Parte n. M5153	1 flacone/kit da 1,0 ml
<b>CONTROL -</b>	<b>Controllo negativo</b> Parte n. M5275	1 flacone/kit da 1,0 ml

## MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

- Micropipettatori (di capacità compresa tra 1 e 10 µl e tra 100 e 1000 µl)
- Puntali non aerosol per pipette
- Applied Biosystems 7500 Fast Dx, versione software 1.4.
- Applied Biosystems 7500 Standard, versione software 2.0.6
- Roche LightCycler 480 Instrument II, versione software 1.5.0.39
- Qiagen Rotor-Gene Q, versione software 2.0.2.4
- Bio-Rad CFX96 Touch, versione software 3.1
- Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro, versione software 2.0
- Piastra PCR da 96 pozzetti n.
  - ▶ Applied Biosystems 7500 Fast Dx: 4344906
  - ▶ Applied Biosystems 7500 Standard: N8010560
  - ▶ Roche LightCycler 480: 04729692001, pellicola inclusa
  - ▶ Bio-Rad CFX96 Touch: HSP9631, sigilli MSB1001
  - ▶ Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro: 4483354
- Pellicole piastra ottica
- Qiagen Rotor-Disc
- Pellicola termosigillante Qiagen Rotor-Disc
- Centrifuga per piastra da 96 pozzetti
- bioMérieux NucliSENS easyMAG, versione software 2.0
- bioMérieux EMAG, versione software 2.0
- bioMérieux NucliSENS easyMAG Tamponi 1, 2, 3
- Tampone di lisi bioMérieux NucliSENS easyMAG
- Biglie magnetiche di silice bioMérieux NucliSENS easyMAG
- Materiali monouso bioMérieux NucliSENS easyMAG
- Pipettatore Biohit

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Le normative nazionali e locali in vigore per la notifica delle malattie segnalabili vengono continuamente aggiornate e comprendono svariati organismi di sorveglianza e indagine dei focolai. I laboratori sono tenuti a seguire le normative statali e/o locali e a consultarsi con i laboratori sanitari pubblici locali e/o statali per conoscere le linee guida di invio dei campioni di isolati e/o clinici.

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- I risultati positivi sono indicativi della presenza dell'RNA di SARS-CoV-2.
- I laboratori degli Stati Uniti e relativi territori sono tenuti a segnalare tutti i risultati positivi alle autorità sanitarie competenti.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software bioMérieux NucliSENS easyMAG versione 2.0. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Applied Biosystems 7500 Fast Dx versione 1.4. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Applied Biosystems Standard versione 2.0.6. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.

- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Roche LightCycler® 480 Instrument II, versione 1.5.0.39. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Qiagen Rotor-Gene Q, versione 2.0.2.4. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Bio-Rad CFX96 Touch, versione 3.1. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro, versione 2.0. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Le caratteristiche prestazionali di questo test sono state stabilite esclusivamente con i tipi di campioni indicati nella **sezione Uso previsto**. Le prestazioni di questo dosaggio con altri tipi di campioni non sono state valutate.
- Questo prodotto è destinato all'uso esclusivo da parte di personale in possesso di un'adeguata formazione sulle tecniche di PCR e RT-PCR.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infetti. Seguire le precauzioni universali quando si manipolano i campioni, questo kit e il relativo contenuto.
- Per ottenere risultati corretti è essenziale che le condizioni di raccolta, conservazione e trasporto dei campioni siano adeguate.
- Conservare i reagenti del dosaggio come indicato sulle relative etichette.
- Durante l'utilizzo del kit indossare idonei indumenti protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il volto.
- Per ottenere risultati accurati, pipettare con delicatezza utilizzando solo apparecchiature calibrate.
- Pulire e disinfettare con cura tutte le superfici con una soluzione di candeggina al 10% e poi con acqua per biologia molecolare.
- Utilizzare micropipette con barriera aerosol o con puntali a spostamento positivo per tutte le procedure.
- Evitare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti del kit. Attenersi alle buone pratiche di laboratorio.
- Non mischiare reagenti di kit con numeri di lotto diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti con questo kit.
- Non usare il prodotto dopo la data di scadenza.
- Un'adeguata pianificazione del flusso di lavoro è essenziale per ridurre al minimo il rischio di contaminazione. Programmare sempre il flusso di lavoro del laboratorio in maniera unidirezionale, iniziando dalla pre-amplificazione e procedendo con l'amplificazione e la rilevazione.
- Nelle aree di pre-amplificazione e amplificazione, utilizzare gli appositi materiali e attrezzature.
- Non consentire spostamenti crociati di personale o attrezzature tra aree diverse.
- Conservare sempre il materiale per l'amplificazione separatamente dal materiale per la pre-amplificazione.
- Non aprire le provette dei campioni né rimuovere il sigillo delle piastre dopo l'amplificazione.
- Smaltire adeguatamente il materiale amplificato secondo le leggi e le normative locali al fine di ridurre al minimo il rischio di contaminazione da ampliconi.
- Non utilizzare per il processamento dell'acido nucleico target materiali specifici per la preparazione dei reagenti o dei campioni.
- Indossare idonei indumenti protettivi, guanti e protezione per gli occhi/il viso quando si manipola il contenuto del kit.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo la manipolazione.
- Per ulteriori informazioni su simboli di pericolo, sicurezza, manipolazione e smaltimento dei componenti di questo kit, consultare la scheda di sicurezza (SDS) reperibile su [quidel.com](http://quidel.com).

## CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI REAGENTI DEL KIT

- Conservare il kit sigillato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino alla data di scadenza indicata sulla confezione esterna del kit.
- Il master mix reidratato deve essere utilizzato entro 2 ore dalla reidratazione e il master mix residuo può essere conservato a -20 °C per un massimo di 24 ore. Proteggere il master mix dalla luce durante la conservazione.

### Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

La torbidità della soluzione reidratante entro la data di scadenza può indicare un deterioramento di questo reagente. Contattare l'assistenza tecnica Quidel per la sostituzione.

## RACCOLTA, CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni rinofaringei, orofaringei o nasali devono essere raccolti, trasportati, conservati e processati secondo la norma CLSI M41-A<sup>2</sup>. I campioni devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino al momento del test. Se non è possibile analizzare i campioni entro 72 ore dalla raccolta, è necessario congelarli ad almeno -70 °C fino al momento dell'analisi.

I seguenti terreni di trasporto virale (M4, M4-RT, M5, M6, MTM e UTM) (1 ml e 3 ml) sono compatibili con i dosaggi respiratori Lyra.

Il terreno di trasporto virale CDC (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/Viral-Transport-Medium.pdf>) è compatibile con Lyra SARS-CoV-2 Assay.

## Conservazione degli estratti di acidi nucleici

Gli eluati ottenuti con NucliSENS easyMAG possono essere conservati a temperatura ambiente (tra 20 °C e 25 °C) per 2 ore, tra 2 °C e 8 °C per 24 ore e tra -20 °C e -70 °C per un mese.

## Istruzioni per la programmazione dell'estrazione degli acidi nucleici bioMérieux NucliSENS easyMAG

**Nota:** in ciascun ciclo di estrazione devono essere inclusi un controllo positivo (ossia Lyra SARS-CoV-2, Controllo positivo n. M5153) e un controllo di processo negativo (ossia Lyra Controllo negativo n. 5275 o terreni di trasporto virali o campioni CoV negativi caratterizzati precedentemente).

1. Accendere lo strumento e attendere che la spia diventa arancione. Quindi accendere il computer/avviare il software NucliSENS easyMAG. Accedere al software solo quando la spia dello strumento diventa verde.



2. Effettuare la scansione del codice a barre dei reagenti dopo aver premuto i pulsanti "Strumento" e "Stock reagenti".



3. Per inserire i campioni, premere il pulsante "Uso quotidiano" che rimanda per impostazione predefinita



alla schermata "Definisci richiesta". Selezionare le impostazioni seguenti:

- a. Sample ID (ID campione): inserire il **nome del campione** utilizzando la tastiera.
- b. Matrix (Matrice): selezionare **Other** (Altro) dal menu a discesa
- c. Request (Richiesta): selezionare **Generic** (Generico) dal menu a discesa
- d. Volume (ml): selezionare **0,200** dal menu a discesa
- e. Eluate (Eluato) (µl): selezionare **50** dal menu a discesa
- f. Type (Tipo): Primary (Primario)
- g. Priority (Priorità): Normal (Normale)



4. Premendo il pulsante "Save" (Salva), il campione sarà visualizzato nella finestra "Unassigned Sample" (Campione non assegnato) sul lato sinistro della schermata. Premere il pulsante "Enter New Extraction Request"



(Nuova richiesta di estrazione) e ripetere la procedura per eventuali altri campioni. In alternativa, è possibile inserire più campioni premendo il pulsante "Auto Create New Extraction Requests" (Crea

automaticamente nuove richieste di estrazione)




5. Una volta creati tutti i campioni, andare a "Organize Runs" (Organizza cicli) facendo clic sull'icona



nella parte superiore della pagina. Per creare un ciclo, premere il pulsante "Create Run" (Crea ciclo). Inserire un nome per il ciclo o utilizzare il nome predefinito.




6. Aggiungere i campioni al ciclo utilizzando il pulsante "Auto Fill Run" (Riempì automaticamente il ciclo)  (riempie automaticamente fino a 24 campioni dall'elenco "Unassigned Samples" [Campioni non assegnati] a sinistra sulla schermata). In alternativa, è possibile inserire e togliere singoli campioni dal ciclo utilizzando le




icone di posizionamento destra e sinistra dopo aver selezionato il campione desiderato. È possibile modificare l'ordine dei campioni all'interno del ciclo con i pulsanti "Move Extraction Request Up/Down"



(Sposta richiesta di estrazione in alto/in basso)

7. Ottenere da 1 a 3 recipienti di campione (rispettivamente per un numero di campioni compreso tra 8 e 24) e aggiungere 20 µl di controllo di processo a ciascun pozzetto utilizzato.
8. Aggiungere 180 µl di ciascun campione nel pozzetto previsto.
9. Andare a "Load Run" (Carica ciclo) premendo il pulsante  nella parte superiore della schermata. Inserire i puntali e i recipienti dei campioni nello strumento.
10. Inserire il codice a barre dei recipienti dei campione.
11. Inserire il codice a barre delle biglie di silice da utilizzare.
12. Chiudere il coperchio dello strumento.
13. Assegnare le biglie di silice ai campioni come segue:
- Fare clic sul simbolo dei reagenti sotto al numero 1 nell'immagine seguente. Il numero di lotto delle biglie di silice dovrebbe venire visualizzato sotto alla scheda Silica (Silice) al numero 2 nell'immagine seguente.
  - Evidenziare e selezionare i campioni del ciclo cui devono essere assegnate le biglie (nella casella contenente il numero 3 nell'immagine seguente).



- Fare clic sull'icona di posizionamento  (sotto al numero 4 nell'immagine seguente) per assegnare il numero di lotto della silice ai campioni selezionati.
- Se si seleziona il simbolo delle biglie a destra del numero 5 nell'immagine seguente, viene visualizzato il numero di lotto delle biglie di silice di ciascun campione.




14. Stampare l'elenco di lavoro toccando l'icona "Load Run" (Carica ciclo) e quindi premendo l'icona "Print Work



List" (Stampa elenco di lavoro)



15. Premere il pulsante "Dispense Lysis" (Dispensa lisi) . Il processo di lisi sullo strumento richiederà circa 12 minuti.

16. Per ogni recipiente di campione preparare le particelle magnetiche utilizzando il pipettatore e i puntali Biohit per un massimo di otto reazioni come segue:
- Utilizzando 1 puntale e il Programma 1, aspirare 550 µl di acqua priva di nucleasi e dispensare in una provetta microfuga da 1,5 ml priva di DNAsi/RNAsi.
  - Agitare tramite vortex la silice magnetica. Utilizzando 1 puntale e il Programma 1, aspirare 550 µl di silice magnetica, dispensare nell'acqua e miscelare tramite vortex.
  - Utilizzando 1 puntale e il Programma 2, aspirare 1050 µl della miscela di silice magnetica e ricollocarne 25 µl nella stessa provetta.
  - Dispensare 125 µl di miscela di silice magnetica in ciascuno degli 8 pozzetti di una piastra a striscia ELISA. Gettare il puntale.
  - Al termine della lisi (NB: lo stato dello strumento in calce alla schermata deve essere "IDLE" [INATTIVO]!), utilizzando 8 puntali e il Programma 3, aspirare 100 µl di miscela di silice magnetica dai pozzetti della striscia, dispensare 100 µl di miscela di silice magnetica nei pozzetti della striscia, quindi aspirare 100 µl di miscela di silice magnetica dai pozzetti della striscia.
  - Inserire i puntali nel liquido all'interno dei recipienti dei campioni. Aspirare 800 µl di miscela di silice magnetica, quindi ridispensarne 900 µl nel recipiente. Aspirare 1000 µl di miscela di silice magnetica dal recipiente e ridispensarne 1000 µl nel recipiente. Ripetere l'aspirazione/dispensazione di 1000 µl altre due volte.



17. Chiudere lo strumento e premere il pulsante "Start" (Avvio) per iniziare il ciclo.
18. Al termine del ciclo, trasferire l'acido nucleico purificato nelle provette prive di nucleasi. Gli eluati ottenuti con NucliSENS easyMAG possono essere conservati a temperatura ambiente (tra 20 °C e 25 °C) per 2 ore, tra 2 °C e 8 °C per 8 ore e tra -20 °C e -70 °C per un mese.

## PROCEDURA DI DOSAGGIO

Eseguire le procedure seguenti a una temperatura ambiente controllata compresa tra 20 °C e 25 °C.

### Procedura di reidratazione del master mix

- Determinare il numero di campioni estratti da analizzare e ottenere il numero corretto di otto flaconi di master mix liofilizzato per l'analisi.
- Riporre i reagenti non utilizzati nelle condizioni di conservazione adeguate.
- Aprire con cautela il master mix per evitare di compromettere il pellet.
- Aggiungere 135 µl di soluzione reidratante al master mix.
- Tenere il flacone a temperatura ambiente per 1-2 minuti per consentire la reidratazione del pellet.
- Con la pipetta, aspirare e rilasciare delicatamente 2-3 volte evitando la formazione di bolle prima di dispensare nel primo pozzetto o nella prima provetta.

**Nota:** il master mix reidratato è sufficiente per otto reazioni.

**Nota:** il master mix reidratato può essere conservato a temperatura ambiente (tra 20 °C e 25 °C) per un massimo di 24 ore. Per una conservazione più prolungata, il master mix reidratato deve essere richiuso, sigillato con parafilm e conservato in posizione verticale a ≤-20 °C per un massimo di 14 giorni. Proteggere il master mix dalla luce durante la conservazione.

### Procedura di configurazione RT-PCR:

- Aggiungere 15 µl di master mix reidratato a ciascun pozzetto della piastra o a ciascuna provetta.
- Aggiungere 5 µl di acido nucleico estratto (campione con controllo di processo) al pozzetto della piastra o a ciascuna provetta. Non è necessario miscelare i reagenti.  
**Nota:** utilizzare un nuovo puntale per micropipettatore con barriera per ciascun campione estratto.
- Sigillare la piastra o le provette.
- Centrifugare la piastra o le provette per almeno 15 secondi. Verificare che tutto il liquido si trovi sul fondo dei pozzetti della piastra o delle provette.
- Accendere il termociclatore appropriato.
- Inserire la piastra o le provette nell'apposito termociclatore.



**NOTA:** per la programmazione e i protocolli di analisi specifici di ciascun termociclatore, fare riferimento all'Appendice(pagina 17).

## CONTROLLO QUALITÀ

Lyra SARS-CoV-2 Assay include diversi controlli per monitorare le prestazioni del dosaggio.

1. Il **controllo di processo (PRC)** consiste in un batteriofago MS2 inattivato e stabilizzato contenente il genoma dell'RNA. Va usato durante l'estrazione e l'amplificazione nel dosaggio. Questo controllo deve essere aggiunto a ciascuna aliquota del campione prima dell'estrazione. Il PRC consente di monitorare gli inibitori nel campione estratto, assicura che sia avvenuta un'amplificazione adeguata e conferma che l'estrazione degli acidi nucleici sia stata sufficiente.
2. Il **controllo positivo** (contenente RNA sintetico di SARS-CoV-2, Parte M5153) deve essere trattato come un campione di paziente e va incluso in ogni ciclo di estrazione e di RT-PCR.
3. Il **controllo negativo** (Parte M5275) deve essere trattato come un campione di paziente e va incluso in ogni ciclo di estrazione e di RT-PCR.
4. Il mancato esito del **controllo positivo** o del **controllo negativo** invalida il ciclo di RT-PCR, pertanto i risultati non devono essere comunicati. Il ciclo di RT-PCR deve essere ripetuto innanzitutto con i campioni e i controlli estratti. Eseguire nuovamente l'estrazione e rianalizzare un'altra aliquota dei controlli e dei campioni o ottenere nuovi campioni e ripetere l'analisi se i controlli non vanno di nuovo a buon fine.

Risultati attesi dei controlli (Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Bio-Rad CFX96 Touch, Qiagen Rotor-Gene Q o Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro)					
Tipo di controllo/Nome	Utilizzato per il monitoraggio	SARS-CoV-2	Valori Ct attesi	PRC	Valori Ct attesi
<b>Controllo positivo</b>	Sostanziale insuccesso del reagente, compresa l'integrità del primer e della sonda	+	5,0 ≤ Ct ≤ 30,0	+/-	np <sup>1</sup>
<b>Controllo negativo</b>	Contaminazione del reagente e/o ambientale	-	Nessun elemento rilevato	+	5,0 ≤ Ct ≤ 30,0

<sup>1</sup>Non è necessario un valore Ct per ottenere un'indicazione positiva dal controllo di processo.

Risultati attesi dei controlli (Roche LightCycler 480)					
Tipo di controllo/Nome	Utilizzato per il monitoraggio	SARS-CoV-2	Valori Ct attesi	PRC	Valori Ct attesi
<b>Controllo positivo</b>	Sostanziale insuccesso del reagente, compresa l'integrità del primer e della sonda	+	5,0 ≤ Ct ≤ 40,0	+/-	np <sup>1</sup>
<b>Controllo negativo</b>	Contaminazione del reagente e/o ambientale	-	Nessun elemento rilevato	+	5,0 ≤ Ct ≤ 40,0

<sup>1</sup>Non è necessario un valore Ct per ottenere un'indicazione positiva dal controllo di processo.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEI CAMPIONI DEL PAZIENTE

Interpretazione dei risultati di Lyra SARS-CoV-2 Assay su Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Bio-Rad CFX96 Touch, Qiagen Rotor-Gene Q o Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro				
Risultato del dosaggio	Rilevatore: SARS-CoV-2	Rilevatore: controllo di processo	Interpretazione dei risultati	Note e indicazioni speciali
Negativo	Nessun Ct rilevato	$5,0 \leq Ct \leq 30,0$	Nessun RNA virale di SARS-CoV-2 rilevato; PRC rilevato.	
Positivo per SARS-CoV-2	$5,0 \leq Ct \leq 30,0$	np <sup>1</sup>	RNA virale del virus SARS-CoV-2 rilevato.	
Nulla	Nessun Ct rilevato	Nessun Ct rilevato	Nessun RNA virale di SARS-CoV-2 e nessun RNA del PRC rilevato.	Test non valido. Rianalizzare lo stesso campione purificato. Se il test risulta nuovamente non valido, ripetere l'estrazione e l'analisi con un'altra aliquota dello stesso campione o ottenere un nuovo campione ed eseguire nuovamente l'analisi.
Interpretazione dei risultati di Lyra SARS-CoV-2 Assay su Roche LightCycler 480				
Risultato del dosaggio	Rilevatore: SARS-CoV-2	Rilevatore: controllo di processo	Interpretazione dei risultati	Note e indicazioni speciali
Negativo	Nessun Ct rilevato	$5,0 \leq Ct \leq 40,0$	Nessun RNA virale di SARS-CoV-2 rilevato; PRC rilevato.	
Positivo per SARS-CoV-2	$5,0 \leq Ct \leq 40,0$	np <sup>1</sup>	RNA virale del virus SARS-CoV-2 rilevato.	
Nulla	Nessun Ct rilevato	Nessun Ct rilevato	Nessun RNA virale di SARS-CoV-2 e nessun RNA del PRC rilevato.	Test non valido. Rianalizzare lo stesso campione purificato. Se il test risulta nuovamente non valido, ripetere l'estrazione e l'analisi con un'altra aliquota dello stesso campione o ottenere un nuovo campione ed eseguire nuovamente l'analisi.

<sup>1</sup> Non è necessario un valore Ct per ottenere un'indicazione positiva dal controllo di processo.

## PRESTAZIONI CLINICHE

Le prestazioni cliniche di Lyra SARS-CoV-2 Assay sono state valutate mediante due (2) diversi studi:

- Uno studio in cui sono stati utilizzati duecentosessantacinque (265) campioni di tamponi rinofaringei freschi o congelati (rispettivamente 36 e 229) raccolti in UTM da pazienti statunitensi.
- Uno studio completamente artificiale in cui sono stati utilizzati campioni di tamponi rinofaringei positivi.

Tutti i duecentosessantacinque (265) campioni sono risultati negativi per il SARS-CoV-2 quando estratti con il sistema NucliSENS easyMAG e analizzati con Lyra SARS-CoV-2 Assay.

Centoventiquattro (124) campioni inclusi in questo studio sono risultati positivi per altri virus respiratori circolanti identificati da dosaggi approvati dalla FDA:

<b>Virus circolante</b>	<b>N. di campioni positivi</b>
Influenza A	30
RSV	4
Coronavirus stagionale (non identificato)	10
Coronavirus 229e	20
Coronavirus OC43	20
Coronavirus NL63	20
Coronavirus HKU1	20

L'RNA virale è stato ottenuto da BEI Resources per l'uso nello studio clinico artificiale. L'RNA genomico è stato estratto da una preparazione di lisato cellulare e surnatante di cellule di epitelio renale di Cercopithecus aethiops (Vero E6, ATCC® CRL-1586™) infettate da coronavirus 2 correlato a SARS (SARS-CoV-2), isolato USA-WA1/2020, utilizzando Qiagen QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen 52904). L'RNA genomico virale è in uno sfondo di acido nucleico cellulare e carrier RNA. Il numero di copie del genoma è stato stabilito utilizzando il sistema Bio-Rad QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR™).

Sono stati creati novantadue (92) campioni artificiali positivi sottoponendo a spiking novantadue (92) campioni clinici individuali risultati negativi al SARS-CoV-2 con Lyra SARS-CoV-2 Assay prima dello spiking con una di tre concentrazioni di RNA genomico di SARS-CoV-2. Quarantaquattro (44) campioni sono stati sottoposti a spiking con 1x LoD (8,00E-01 cp/μl) di RNA. Altri ventiquattro (24) campioni sono stati sottoposti a spiking con 3x LoD (2,40E00 cp/μl) di RNA. Altri ventiquattro (24) campioni sono stati sottoposti a spiking con 5x LoD (4,00E00 cp/μl) di RNA. Tutti i campioni sono stati estratti e analizzati secondo le istruzioni del foglietto illustrativo di Lyra SARS-CoV-2 Assay.

Tutti i novantadue (92) campioni artificiali sono risultati positivi con Lyra SARS-CoV-2 Assay. I risultati relativi ai campioni artificiali positivi sono riportati nella tabella seguente:

<b>Valutazione clinica dei campioni sottoposti a spiking di tamponi rinofaringei</b>			
Concentrazione di RNA nel campione	N. positivi/n. analizzati	Ct SARS-CoV-2 medio	% CV
non spiked	0/92	n/p	n/p
1x LoD	44/44	26,9	5,7
3 x LoD	24/24	22,8	3,4
5 x LoD	24/24	22,4	3,0

Le prestazioni rispetto ai risultati attesi sono le seguenti:

Percentuale di concordanza positiva 92/92 = 100% (IC al 95%: 95,99%-100%)

Percentuale di concordanza negativa 92/92 = 100% (IC al 95%: 95,99%-100%)

## PRESTAZIONI ANALITICHE

### Limite di rilevamento

Il limite di rilevamento (LoD) di Lyra SARS-CoV-2 Assay ha utilizzato diluizioni limitanti di RNA genomico di SARS-CoV-2 in matrice rinofaringea negativa. Ciascuna diluizione è stata estratta utilizzando il sistema NucliSENS easyMAG e analizzata su Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Roche LightCycler 480, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96 Touch o Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro. La sensibilità analitica (LoD) è definita come la concentrazione minima a cui almeno il 95% di tutti i duplicati risulta positivo.

L'RNA genomico è stato estratto da una preparazione di lisato cellulare e surnatante di cellule di epitelio renale di Cercopithecus aethiops (Vero E6, ATCC® CRL-1586™) infettate da coronavirus 2 correlato a SARS (SARS-CoV-2), isolato USA-WA1/2020, utilizzando Qiagen QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen 52904). L'RNA genomico virale è in

uno sfondo di acido nucleico cellulare e carrier RNA. Il numero di copie del genoma è stato stabilito utilizzando il sistema Bio-Rad QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR).

Questo studio ha consentito di determinare il LoD per Lyra SARS-CoV-2 Assay in 8,00E-01 copie/μl di RNA genomico, in seguito confermato analizzando 20 duplicati.

<b>LoD in campioni rinofaringei con Applied Biosystems 7500 Fast Dx</b>				
<b>Concentrazione</b>	<b>Duplicato</b>	<b>C<sub>t</sub> SARS-CoV-2</b>	<b>C<sub>t</sub> PRC</b>	<b>Interpretazione</b>
8,00E-01 copie/μl di RNA genomico	1	23,95	18,54	Positivo
	2	26,59	18,28	Positivo
	3	26,19	18,32	Positivo
	4	25,13	18,41	Positivo
	5	24,88	18,74	Positivo
	6	24,84	19,18	Positivo
	7	25,51	18,82	Positivo
	8	25,20	18,58	Positivo
	9	24,69	18,71	Positivo
	10	24,57	18,67	Positivo
	11	23,86	18,75	Positivo
	12	24,58	18,91	Positivo
	13	25,19	19,03	Positivo
	14	25,84	19,05	Positivo
	15	26,58	19,10	Positivo
	16	26,72	19,15	Positivo
	17	24,16	19,06	Positivo
	18	25,15	18,91	Positivo
	19	25,51	19,05	Positivo
	20	24,41	19,07	Positivo

<b>LoD in campioni orofaringei con Applied Biosystems 7500 Fast Dx</b>				
<b>Concentrazione</b>	<b>Duplicato</b>	<b>C<sub>t</sub> SARS-CoV-2</b>	<b>C<sub>t</sub> PRC</b>	<b>Interpretazione</b>
8,00E-01 copie/μl di RNA genomico	1	27,26	19,38	Positivo
	2	28,99	19,22	Positivo
	3	27,3	19,51	Positivo
	4	26,09	19,27	Positivo
	5	26,88	19,61	Positivo
	6	26,02	19,19	Positivo
	7	26,37	19,21	Positivo
	8	25,01	19,30	Positivo
	9	25,14	19,06	Positivo
	10	26,21	19,03	Positivo
	11	27,79	19,27	Positivo
	12	28,83	19,12	Positivo
	13	28,83	19,19	Positivo
	14	26,81	19,50	Positivo
	15	25,1	19,30	Positivo
	16	26,2	19,11	Positivo
	17	26,74	19,00	Positivo
	18	25,28	19,13	Positivo
	19	26,27	19,31	Positivo
	20	26,37	19,24	Positivo

LoD in campioni rinofaringei con Applied Biosystems 7500 Standard				
Concentrazione	Duplicato	C <sub>t</sub> SARS-CoV-2	C <sub>t</sub> PRC	Interpretazione
8,00E-01 copie/ $\mu$ l di RNA genomico	1	26,63	19,26	Positivo
	2	29,15	19,28	Positivo
	3	25,67	19,69	Positivo
	4	25,53	20,07	Positivo
	5	26,15	20,50	Positivo
	6	26,71	20,50	Positivo
	7	26,11	19,14	Positivo
	8	26,94	19,18	Positivo
	9	25,62	18,64	Positivo
	10	25,80	18,80	Positivo
	11	26,76	19,15	Positivo
	12	26,15	19,63	Positivo
	13	27,42	19,44	Positivo
	14	27,51	19,99	Positivo
	15	26,07	19,9	Positivo
	16	25,92	18,81	Positivo
	17	27,95	20,02	Positivo
	18	27,71	19,27	Positivo
	19	26,51	18,86	Positivo
	20		Non determinato	19,11

LoD in campioni rinofaringei con Roche LightCycler 480*				
Concentrazione	Duplicato	C <sub>t</sub> SARS-CoV-2	C <sub>t</sub> PRC	Interpretazione
8,00E-01 copie/ $\mu$ l di RNA genomico	1	32,91	31,73	Positivo
	2	34,54	32,9	Positivo
	3	34,83	32,25	Positivo
	4	34,94	31,7	Positivo
	5	33,81	32,14	Positivo
	6	34,36	32,37	Positivo
	7	33,90	32,10	Positivo
	8	33,83	32,80	Positivo
	9	33,8	31,86	Positivo
	10	34,28	32,27	Positivo
	11	33,63	32,81	Positivo
	12	33,72	32,45	Positivo
	13	34,86	33,17	Positivo
	14	34,57	32,64	Positivo
	15	34,48	32,92	Positivo
	16	33,61	32,82	Positivo
	17	33,87	33,34	Positivo
	18	34,44	33,36	Positivo
	19	34,22	32,55	Positivo
	20		33,77	32,97

\* I risultati includono 10 cicli non rilevati dagli altri strumenti

LoD in campioni rinofaringei con Qiagen Rotor-Gene Q				
Concentrazione	Duplicato	C <sub>t</sub> SARS-CoV-2	C <sub>t</sub> PRC	Interpretazione
8,00E-01 copie/ $\mu$ l di RNA genomico	1	24,01	19,08	Positivo
	2	24,04	19,36	Positivo
	3	24,85	19,44	Positivo
	4	23,23	19,13	Positivo
	5	24,39	19,07	Positivo

LoD in campioni rinofaringei con Qiagen Rotor-Gene Q				
Concentrazione	Duplicato	Ct SARS-CoV-2	Ct PRC	Interpretazione
	6	23,89	18,94	Positivo
	7	23,78	18,80	Positivo
	8	24,82	18,86	Positivo
	9	23,87	18,83	Positivo
	10	24,05	18,90	Positivo
	11	23,28	18,84	Positivo
	12	24,36	18,71	Positivo
	13	23,85	18,87	Positivo
	14	23,54	18,88	Positivo
	15	24,84	19,20	Positivo
	16	23,63	19,01	Positivo
	17	24,18	18,97	Positivo
	18	23,47	19,01	Positivo
	19	23,58	18,94	Positivo
20	23,89	19,02	Positivo	

LoD in campioni rinofaringei con Bio-Rad CFX96 Touch				
Concentrazione	Duplicato	Ct SARS-CoV-2	Ct PRC	Interpretazione
8,00E-01 copie/ $\mu$ l di RNA genomico	1	27,19	21,25	Positivo
	2	25,57	21,35	Positivo
	3	25,80	22,68	Positivo
	4	27,93	21,3	Positivo
	5	29,03	21,09	Positivo
	6	25,79	21,45	Positivo
	7	25,65	21,19	Positivo
	8	26,26	21,16	Positivo
	9	29,46	21,41	Positivo
	10	25,09	21,45	Positivo
	11	25,68	21,36	Positivo
	12	28,51	21,49	Positivo
	13	25,5	21,97	Positivo
	14	26,81	21,36	Positivo
	15	26,17	21,1	Positivo
	16	25,04	21,91	Positivo
	17	25,47	22,08	Positivo
	18	25,54	21,26	Positivo
	19	25,77	22,29	Positivo
	20	25,59	22,16	Positivo

LoD in campioni rinofaringei con Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro				
Concentrazione	Duplicato	Ct SARS-CoV-2	Ct PRC	Interpretazione
8,00E-01 copie/ $\mu$ l di RNA genomico	1	24,25	20,21	Positivo
	2	26,7	20,9	Positivo
	3	27,14	20,6	Positivo
	4	27,28	20,81	Positivo
	5	29,60	20,78	Positivo
	6	26,99	20,65	Positivo
	7	28,75	20,82	Positivo
	8	27,63	20,76	Positivo
	9	29,80	20,65	Positivo
	10	26,60	20,55	Positivo
	11	27,23	20,54	Positivo
	12	29,81	20,73	Positivo

LoD in campioni rinofaringei con Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro				
Concentrazione	Duplicato	Ct SARS-CoV-2	Ct PRC	Interpretazione
	13	26,59	20,88	Positivo
	14	27,23	20,87	Positivo
	15	26,63	20,62	Positivo
	16	26,07	20,84	Positivo
	17	25,14	20,81	Positivo
	18	27,34	20,6	Positivo
	19	29,22	20,67	Positivo
	20	26,37	20,38	Positivo

## REATTIVITÀ ANALITICA (INCLUSIVITÀ)

L'inclusività di Lyra SARS-CoV-2 Assay è stata stabilita testando l'RNA genomico del coronavirus 2 correlato a SARS (SARS-CoV-2), isolato USA-WA1/2020, mediante analisi *in silico*. L'analisi *in silico* ha dimostrato che i primer di Lyra SARS-CoV-2 sono conservati al 100% in 257 sequenze di SARS-CoV-2 disponibili presso l'NCBI (National Center for Biotechnology Information, Centro nazionale per le informazione sulle biotecnologie) e la GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data, Iniziativa globale sulla condivisione di tutti i dati sull'influenza) alla data del 5 marzo 2020.

## SPECIFICITÀ ANALITICA (REATTIVITÀ CROCIATA)

La specificità analitica del dosaggio è stata stabilita sia mediante analisi dirette di organismi nel dosaggio (analisi WET) sia con analisi *in silico*. Per l'analisi WET sono stati utilizzati 25 microrganismi ad alte concentrazioni identificati dalla FDA come ad alta priorità per la valutazione in considerazione della ragionevole probabilità che possano essere presenti in campioni delle alte vie respiratorie. Tutti i microrganismi sono risultati non rilevabili con Lyra SARS-CoV-2 Assay all'analisi WET riportata di seguito.

Risultati del test di reattività crociata				
Virus/batterio/parassita	Ceppo	Origine/tipo di campione	Concentrazione	Risultati
Adenovirus	Tipo 1	Isolato	1 x 10 <sup>7,53</sup> U/ml	Neg, Neg, Neg
Coronavirus	229e	Isolato	1 x 10 <sup>6,10</sup> U/ml	Neg, Neg, Neg
Coronavirus	OC43	Isolato	9,55 x 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg, Neg, Neg
Coronavirus	NL63	Isolato	1 x 10 <sup>4,67</sup> U/ml	Neg, Neg, Neg
MERS-CoV (inattivato mediante calore)	Florida/USA-2 Saudia Arabia 2014	Isolato	4,17 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg, Neg, Neg
SARS-1	2003-00592	Virus inattivato	Non disponibile	Neg, Neg, Neg
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129	Isolato	3 x 10 <sup>7</sup> CCU/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Z018	Isolato	3,8 x 10 <sup>9</sup> cfu/ml	Neg, Neg, Neg
Influenza A H3N2	Brisbane/10/07	Isolato	1 x 10 <sup>5,07</sup> U/ml	Neg, Neg, Neg
Influenza A H1N1	Nuova Caledonia/20/99	Isolato	1 x 10 <sup>6,66</sup> U/ml	Neg, Neg, Neg
Influenza B	Brisbane/33/08	Isolato	1 x 10 <sup>5,15</sup> U/ml	Neg, Neg, Neg
Parainfluenza	Tipo 1	Isolato	1 x 10 <sup>8,01</sup> U/ml	Neg, Neg, Neg
Parainfluenza	Tipo 2	Isolato	1 x 10 <sup>6,34</sup> U/ml	Neg, Neg, Neg
Parainfluenza	Tipo 3	Isolato	8,51 x 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg, Neg, Neg
Parainfluenza	Tipo 4b	Isolato	1 x 10 <sup>7,53</sup> U/ml	Neg, Neg, Neg
Enterovirus	Tipo 68	Isolato	1 x 10 <sup>6,5</sup> U/ml	Neg, Neg, Neg
Metapneumovirus umano	A1 (IA10-s003)	Isolato	1 x 10 <sup>5,55</sup> U/ml	Neg, Neg, Neg
Virus sinciziale respiratorio	Tipo A (3/2015 isolato n. 3)	Isolato	1 x 10 <sup>5,62</sup> U/ml	Neg, Neg, Neg
Rhinovirus umano	n/d	Virus inattivato	Non disponibile	Neg, Neg, Neg
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	AR-39	Isolato	2,9 x 10 <sup>7</sup> IFU/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Haemophilus influenzae</i>	Tipo b; Egan	Isolato	7,87 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Legionella pneumophila</i>	Philadelphia	Isolato	6,82 x 10 <sup>9</sup> cfu/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Z022; 19f	Isolato	2,26 x 10 <sup>9</sup> cfu/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Bordetella pertussis</i>		Isolato		Neg, Neg, Neg

Risultati del test di reattività crociata				
Virus/batterio/parassita	Ceppo	Origine/tipo di campione	Concentrazione	Risultati
<i>Pneumocystis jirovecii</i> - <i>S. cerevisiae</i> ricombinante	W303-Pji	Isolato	1,56 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml	Neg, Neg, Neg
Matrice rinofaringea negativa	MTM	n/d	n/d	Neg, Neg, Neg
Matrice rinofaringea negativa	MTM	n/d	n/d	Neg, Neg, Neg
Matrice nasale negativa	Trasporto virale CDC	n/d	n/d	Neg, Neg, Neg
Matrice orofaringea negativa	Trasporto virale CDC	n/d	n/d	Neg, Neg, Neg

L'analisi *in silico* si è concentrata su 32 microrganismi identificati dalla FDA come ad alta priorità in considerazione della loro possibile presenza in campioni delle alte vie respiratorie.

Organismi con reattività crociata			
Organismo	N. totale di sequenze	N. di genomi completi	N. di ceppi WGS
Adenovirus	532	532	0
Coronavirus (stagionale)	288	288	0
Enterovirus <sup>B</sup>	2708	2674	34
Virus dell'influenza A <sup>A</sup> B	172455	21444 (+39 A/Messico/4108/2009)	108
Virus dell'influenza B <sup>A</sup> B	53952	6755 (+16 B/Florida/4/2006)	0
Virus dell'influenza C <sup>B</sup>	2205	n/d	n/d
Metapneumovirus umano	145	145	0
Virus parainfluenzale umano 1-4	439	439	0
Parvovirus umano	124	124	0
Virus sinciziale respiratorio umano <sup>B</sup>	1275	1275	0
Rhinovirus	214	214	0
SARS-1	236 <sup>C</sup>	232 (+4 sequenze pp1ab)	0
<i>Bacillus anthracis</i>	4152	69	86
<i>Candida albicans</i>	1541	59	34
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	466	5	20
<i>Chlamydia psittaci</i>	11179	23	45
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	20797	17	194
<i>Coxiella burnetii</i>	419	28	3
<i>Haemophilus influenzae</i>	45267	61	692
Legionella <sup>B</sup>	4843	98	65
Leptospira <sup>B</sup>	64456	133	266
<i>Moraxella catarrhalis</i> <sup>B</sup>	8333	11	184
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	194	194	0
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	808	51	45
<i>Neisseria elongata</i> e <i>N. meningitidis</i> <sup>B</sup>	312050	116	1318
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	487	15	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	195	195	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	634	634	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> <sup>B</sup>	61880	23	508
<i>Streptococcus pneumoniae</i> <sup>B</sup>	1633369	107	8526
<i>Streptococcus pyogenes</i> <sup>B</sup>	46153	201	1733
<i>Streptococcus salivarius</i> <sup>B</sup>	9417	18	48

<sup>A</sup> I numeri dei genomi dell'influenza A e dell'influenza B sono stati ottenuti per i ceppi che includevano tutti gli 8 segmenti, ad eccezione di A/Messico/4108/2009(H1N1) e B/Florida/4/2006; tutte le sequenze geniche disponibili sono state incluse.



<sup>B</sup> Per BLAST, "Max Target Seqs" (Max sequenze target) è stato impostato su 5000. Lyra SARS-CoV-2 Primer e sonde

Organismo	ID Quidel	Sequenza (5'→3')	Dimensioni del prodotto	Gene Target
SARS-CoV-2	QDLCVD_F4	CAAAGCTACTGAGGAGACATTTAAA	96	Poliproteina non strutturale (pp1ab)
	QDLCVD_R3	CCAACTTCCCATGAAAGATGT		
	QDLCVD_FAM_1	TACGTGAAGTGCTGTCTGACAG		

<sup>C</sup> Sono state incluse anche 4 sequenze codificanti della poliproteina.

L'analisi *in silico* ha dimostrato un'omologia <80% tra tutti gli organismi tranne i seguenti: tre (3) sequenze di Enterovirus sono risultate conservate all'80,9% nel primer inverso; tuttavia, il primer diretto è conservato solo al 76% e l'allineamento delle sonde ha evidenziato un'omologia complessiva del 56%. Le sequenze di SARS-1 sono conservate all'≥80% in entrambi i primer, ma l'ultima base delle estremità 3' di entrambi i primer non è conservata. L'analisi WET dell'unico ceppo di SARS-1 disponibile ha evidenziato un risultato non rilevabile.

## LIMITAZIONI

- Un risultato negativo non preclude l'infezione da SARS-CoV-2 e non deve essere utilizzato quale sola base per le decisioni di gestione del paziente.
- Questo test è destinato all'uso per la rilevazione dell'RNA di SARS-CoV-2 in tamponi rinofaringei e orofaringei. L'analisi di altri tipi di campioni potrebbe dare risultati non accurati.
- I tamponi nasali e i tamponi nasali dei turbinati medi sono considerati tipi di campioni accettabili per l'uso con Lyra SARS-CoV-2 Assay, ma le prestazioni con questi tipi di campioni non sono state stabilite. L'analisi dei tamponi nasali e dei turbinati medi (auto-prelevati sotto supervisione di un operatore sanitario o prelevati da quest'ultimo) è limitata ai pazienti con sintomi di COVID-19.
- Errate condizioni di raccolta, conservazione o trasporto dei campioni possono dare luogo a risultati falsi negativi.
- La presenza di inibitori nel campione e/o eventuali errori nella procedura di dosaggio possono dare luogo a risultati falsi negativi.
- I risultati del dosaggio devono essere interpretati da un operatore sanitario in possesso della formazione necessaria congiuntamente all'anamnesi medica del paziente, ai suoi segni e sintomi clinici e ai risultati di altri test diagnostici.
- Gli analiti target (sequenze virali) possono persistere *in vivo*, indipendentemente dalla vitalità del virus. La rilevazione di uno o più analiti target non implica che i virus corrispondenti siano infettivi, né che questi siano gli agenti causativi dei sintomi clinici.
- Esiste un rischio di valori falsi positivi dovuto alla contaminazione crociata da parte di organismi target, dei loro acidi nucleici o del prodotto amplificato oppure a segnali aspecifici nel dosaggio.
- Esiste il rischio di valori falsi negativi dovuto alla presenza di varianti di sequenza nei target virali del dosaggio.
- Le prestazioni del dosaggio non sono state verificate in pazienti immunocompromessi.

## ASSISTENZA TECNICA E ALLA CLIENTELA

Per qualsiasi domanda sull'uso di questo prodotto, rivolgersi all'assistenza tecnica di Quidel al numero 1.800.874.1517 (negli Stati Uniti) oppure scrivere all'indirizzo di posta elettronica [technicalsupport@quidel.com](mailto:technicalsupport@quidel.com). Al di fuori dagli Stati Uniti, ulteriori informazioni sono disponibili presso il proprio distributore oppure direttamente da Quidel chiamando uno dei numeri elencati di seguito. Fare riferimento a **quidel.com** per visualizzare un maggior numero di opzioni per l'assistenza.

Paese	Tel	Indirizzo e-mail
Europa, Medio Oriente e Africa	+353 (91) 412 474 (principale) 0 1800 200441 (numero verde)	<a href="mailto:emeatechnicalsupport@quidel.com">emeatechnicalsupport@quidel.com</a>
Austria	+43 316 231239	
Francia	0 (805) 371674	
Germania	+49 (0) 7154 1593912	
Paesi Bassi	0 800 0224198	
Svizzera	0 800 554864	
Regno Unito	0 800 3688248	
Italia	+39 (800) 620 549	
America del Nord, Asia Pacifico, America Latina	858.552.1100	<a href="mailto:technicalsupport@quidel.com">technicalsupport@quidel.com</a>
Canada	437.266.1704 (principale) 888.415.8764 (numero verde)	<a href="mailto:technicalsupport@quidel.com">technicalsupport@quidel.com</a>
Cina	0400 920 9366 oppure +86 021 3217 8300	<a href="mailto:chinatechnicalservice@quidel.com">chinatechnicalservice@quidel.com</a>

## PROPRIETÀ INTELLETTUALE

I composti coloranti di questo prodotto sono venduti su licenza di Biosearch™ Technologies, Inc. e protetti da brevetti statunitensi e internazionali rilasciati o in corso di elaborazione.

Quasar è un marchio registrato di Biosearch Technologies. NucliSENS, easyMAG e EMAG sono marchi di fabbrica di bioMérieux. TaqMan e LightCycler sono marchi di fabbrica di Roche. Applied Biosystems e QuantStudio sono marchi di fabbrica di Thermo Fisher Scientific. Rotor-Gene Q e QIAamp sono marchi di fabbrica di Qiagen. CFX96 Touch e ddPCR sono marchi di fabbrica di Bio-Rad Laboratories. ATCC e tutti in numeri di catalogo sono marchi registrati di American Type Culture Collection.

## BIBLIOGRAFIA

1. Baker, S., Frias, L., and Bendix, A. Coronavirus live updates: More than 92,000 people have been infected and at least 3,100 have died. The US has reported 6 deaths. Here's everything we know. Business Insider. 3 marzo 2020.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Viral Culture; Approved Guidelines. Documento CLSI n. M41-A [ISBN 1562386239] Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2006.
3. Lauer, S.A., et. al. The incubation period of Coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application, Ann Intern Med. 2020
4. [www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html](http://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html)

## APPENDICE: (PROGRAMMAZIONE E PROTOCOLLI DI ANALISI SPECIFICI DI CIASCUN TERMOCICLATORE)

### Istruzioni per la programmazione di Applied Biosystems 7500 Fast Dx

Per ulteriori informazioni, fare riferimento al Manuale per l'utente Parte 4406991.

1. Avviare il programma software 7500 Fast Dx.
2. Si apre la finestra di dialogo **Quick Startup document** (Documento di avvio rapido). Selezionare il pulsante **Create New Document** (Crea nuovo documento) per avviare la **New Document Wizard** (Procedura guidata nuovo documento). Seguire tutti i passaggi per avviare il protocollo di Lyra™ SARS-CoV-2 Assay.

a. Definire il documento: la maggior parte delle voci seguenti dovrebbe corrispondere all'impostazione predefinita. In caso contrario, modificare secondo necessità.

i. Confermare o inserire le informazioni seguenti.

<b>Dosaggio:</b>	Curva standard (Quantificazione assoluta)
<b>Contenitore:</b>	trasparente a 96 pozzetti
<b>Modello:</b>	documento vuoto
<b>Modalità di esecuzione:</b>	Fast 7500
<b>Operatore:</b>	<i>il proprio nome operatore</i>
<b>Commenti:</b>	SDS v1.4
<b>Nome piastra:</b>	"Lyra SARS-CoV-2 Assay"

ii. Selezionare il pulsante **Next** (Avanti).

b. Selezionare i rilevatori: è necessario aggiungere nuovi rilevatori per il SARS-CoV-2 e il controllo di processo (PRC). Per ciascun target, selezionare il pulsante **New Detector** (Nuovo rilevatore) per aprire la finestra popup **New Detector** (Nuovo rilevatore). In alternativa, utilizzare il pulsante **Create Another** (Crea un altro) nella finestra popup **New Detector** (Nuovo rilevatore) per gli ultimi due rilevatori.

i. Inserire le informazioni seguenti per ciascun rilevatore.

Nome	Colorante reporter	Colorante quencher	Colore
SARS-CoV-2	FAM	(nessuno)	(Selezionare)
PRC	Quasar 670	(nessuno)	(Selezionare)

ii. Selezionare un colore univoco che rappresenti ciascun rilevatore.

iii. Evidenziare i nuovi rilevatori e aggiungerli alla colonna **Detectors in Document** (Rilevatori nel documento) utilizzando il pulsante **Add** (Aggiungi).

iv. Selezionare **(none)** (nessuno) nel menu a discesa **Passive Reference** (Riferimento passivo).

v. Selezionare il pulsante **Next** (Avanti).

vi. Selezionare il pulsante **Finish** (Fine) senza impostare alcun pozzetto.

c. La procedura guidata viene chiusa e il software si avvia, visualizzando la scheda **Setup** (Configurazione). La scheda visualizza la piastra dei campioni impostata durante l'avvio rapido. Per la configurazione iniziale non occorre modificare nulla in questa fase.

d. **Definizione del protocollo del termociclatore**: selezionare la scheda Instrument (Strumento) per impostare i tempi e le temperature di RT-PCR di Lyra SARS-CoV-2 Assay. In **Thermal Profile** (Profilo termico) dovrebbe essere presente un protocollo predefinito in 2 fasi. Ciascuna fase include 3 caselle di testo modificabili dall'utente. La prima rappresenta il numero di duplicati o cicli per la fase in questione. La casella centrale rappresenta la temperatura (°C) e quella inferiore rappresenta il tempo (minuti: secondi).

i. Apportare le modifiche seguenti al **protocollo del termociclatore**:

1. Fase 1

- a. Dupl: 1
- b. Temp: 55
- c. Tempo: 5:00

2. Selezionare la barra tra la Fase 1 e la Fase 2. Selezionare il pulsante **Add Hold** (Aggiungi attesa) per aggiungere un'altra fase.

3. Fase 2

- a. Dupl: 1
- b. Temp: 60
- c. Tempo: 5:00

4. Selezionare la barra tra la Fase 2 e la Fase 3. Selezionare il pulsante **Add Hold** (Aggiungi attesa) per aggiungere un'altra fase.
5. Fase 3
  - a. Dupl: 1
  - b. Temp: 65
  - c. Tempo: 5:00
6. Fase 4 (fase di dissociazione in 2 passaggi)
  - a. Dupl: 10
  - b. Passaggio 1
    - i. Temp: 92
    - ii. Tempo: 0:05
  - c. Passaggio 2
    - i. Temp: 57
    - ii. Tempo: 0:40
7. Selezionare la barra a destra della Fase 4. Selezionare il pulsante **Add Cycle** (Aggiungi ciclo) per aggiungere un'altra fase.
8. Fase 5 (fase di dissociazione in 2 passaggi)
  - a. Dupl: 30
  - b. Passaggio 1
    - i. Temp: 92
    - ii. Tempo: 0:05
  - c. Passaggio 2
    - i. Temp: 57
    - ii. Tempo: 0:40
9. Se la fase aggiunta è errata, è possibile rimuoverla premendo il pulsante **Delete** (Elimina) dopo aver evidenziato la fase tra le linee verticali
- ii. In **Settings** (Impostazioni) inserire quanto segue:

Volume del campione (µl):	20 (predefinito)
Modalità di esecuzione:	7500 Fast (predefinito)
Raccolta dei dati:	Fase 5, Passaggio 2 (57,0 a 0:40)
<b>NOTA: non selezionare la casella di spunta "Expert Mode" (Modalità avanzata).</b>	

- e. Impostare la soglia per ciascun analita.
  - i. Selezionare la scheda **Results** (Risultati).
  - ii. Selezionare la scheda **Amplification Plot** (Grafico di amplificazione).
  - iii. Selezionare SARS-CoV-2 nella scheda del rilevatore in alto a destra.
  - iv. Nel blocco **Analysis Settings** (Impostazioni di analisi) impostare **Threshold** (Soglia) su **7,5e+004**.
  - v. Selezionare il pulsante di opzione **Auto Baseline** (Basale automatico).
  - vi. Selezionare PRC nella scheda del rilevatore in alto a destra.
  - vii. Nel blocco **Analysis Settings** (Impostazioni di analisi) impostare **Threshold** (Soglia) su **1,0e+004**.
  - viii. Selezionare il pulsante di opzione **Auto Baseline** (Basale automatico).
- f. Salvare il nuovo protocollo come modello per usi futuri.
  - i. Nella parte superiore della schermata selezionare **File** e quindi **Save As** (Salva con nome).
  - ii. **Salvare nel percorso:** D:\Applied Biosystems\7500 Fast System\Templates\
  - iii. **Nome file:** "Lyra SARS-CoV-2"
  - iv. **Salva come:** "Modelli SDS (\*.sdt)"
- g. Uscire dal software.

## Procedura di analisi per termociclatore Applied Biosystems 7500 Fast Dx

1. Avviare il programma software v1.4 7500 Fast Dx.
2. Si apre la finestra di dialogo **Quick Startup document** (Documento di avvio rapido).
3. Fare clic su **Create a new document** (Crea nuovo documento).
4. La maggior parte delle voci seguenti dovrebbe corrispondere all'impostazione predefinita. In caso contrario, modificare secondo necessità.

<b>Dosaggio:</b>	Curva standard (Quantificazione assoluta)
<b>Contenitore:</b>	Trasparente a 96 pozzetti

<b>Modello:</b>	Lyra SARS-CoV-2
<b>Modalità di esecuzione:</b>	Fast 7500
<b>Operatore:</b>	<i>il proprio nome operatore</i>
<b>Commenti:</b>	SDS v1.4
<b>Nome piastra:</b>	<b>AAMMGG- Lyra SARS-CoV-2</b>

5. Configurare la piastra dei campioni
  - a. Nelle schede **Setup** (Configurazione) e **Plate** (Piastra) viene visualizzata la configurazione della piastra.
  - b. Selezionare tutti i pozzetti destinati a contenere il campione, fare clic con il tasto destro e selezionare **Well Inspector** (Ispettore pozzetto) dal menu a discesa. Quando si apre la finestra popup **Well Inspector** (Ispettore pozzetto), selezionare i rilevatori per SARS-CoV-2 e PRC.
  - c. Utilizzare **Well Inspector** (Ispettore pozzetto) per inserire i nomi dei campioni. Nella finestra Well Inspector (Ispettore pozzetto) è possibile inserire gli ID dei pazienti. Tuttavia, si consiglia di eseguire questa operazione prima di risospesne il master mix liofilizzato, dopo il ciclo o utilizzando la funzione di importazione, per ridurre al minimo i tempi di attesa delle reazioni PCR a temperatura ambiente prima di avviare il ciclo.
  - d. Salvare il ciclo con il nome **AAMMGG- Lyra SARS-CoV-2.sds**.
  - e. Si apre la finestra con la richiesta "Reason for change of entry" (Motivo della modifica del dato). Inserire **Setup** (Configurazione) ed eventuali altri commenti relativi al ciclo.
6. Avvio della PCR
  - a. Selezionare la scheda **Instrument** (Strumento).
  - b. Inserire la piastra PCR a 96 pozzetti nel dispositivo.
  - c. In **Instrument Control** (Controllo strumento), selezionare il pulsante **Start** (Avvio) per iniziare il ciclo.
7. Dopo la PCR
 

**IMPORTANTE:** premere OK al termine del ciclo.

  - a. Analizzare i dati premendo il pulsante **Analyze** (Analizza) nel menu in alto e salvare il file.
  - b. Salvare il file premendo **Save Document** (Salva documento) nella barra attività. Si apre la finestra con la richiesta "Reason for change of entry" (Motivo della modifica del dato).
  - c. Inserire **Data analysis post run** (Analisi dei dati post ciclo) ed eventuali altri commenti relativi al ciclo

## Istruzioni per la programmazione di Applied Biosystems 7500 Standard

Per ulteriori informazioni, fare riferimento al Manuale per l'utente Parte 4387783 rev. C.

1. Avviare il programma software 7500 Standard.
2. Selezionare il pulsante **Advanced Setup** (Configurazione avanzata) per aprire Setup and Experiment Properties (Proprietà di configurazione ed esperimento). Seguire tutti i passaggi per avviare il protocollo di Lyra SARS-CoV-2.
  - a. Experiment Name (Nome esperimento): il nome dell'esperimento da immettere è SARS-CoV-2. Lasciare vuoti i campi Barcode (Codice a barre), User Name (Nome utente) e Comments (Note)
  - b. Definire la configurazione dell'esperimento: selezionare 7500 (96 pozzetti), Quantitation- Standard Curve (Curva standard di quantificazione), TaqMan Reagents (Reagenti TaqMan) e Standard (~2 ore per completare un ciclo)
3. Nel menu in alto a sinistra, selezionare **Plate Setup** (Configurazione piastra)
  - a. Definire i target: è necessario aggiungere nuovi rilevatori per il SARS-CoV-2 e il controllo di processo (PRC).
    - i. Inserire le informazioni seguenti per ciascun rilevatore.
 

Nome	Colorante reporter	Colorante quencher	Colore
SARS-CoV-2	FAM	(nessuno)	(Selezionare)
PRC	Quasar 670	(nessuno)	(Selezionare)
    - ii. Selezionare il pulsante **Add New Target** (Aggiungi nuovo target) per ogni target.
    - iii. Da ogni menu a discesa, selezionare reporter, quencher e colore
    - iv. Selezionare un colore univoco che rappresenti ciascun rilevatore
  - b. Assign Targets and Samples (Assegnare target e campioni): in questa scheda nell'angolo inferiore sinistro, selezionare **none** (nessuno) come Passive Reference (Riferimento passivo).
4. Selezionare **Run Method** (Esegui metodo) nel menu in alto a sinistra

- a. Impostare il **Reaction Volume** (Volume di reazione) per pozzetto su 20 µl nella visualizzazione **Graphical** (grafica) o **Tabular View** (tabulare)
- b. Definire il protocollo del termociclatore: nella visualizzazione **grafica** o **tabulare**, il profilo predefinito dovrebbe prevedere 2 fasi di attesa e un periodo di funzionamento in 2 passaggi. Ciascuna fase include 3 caselle di testo modificabili dall'utente. La prima casella riporta il tasso di rampa (%) per quella fase, la seconda casella riporta la temperatura (°C), mentre la terza riporta il tempo (minuti:secondi).
  - i. Apportare le modifiche seguenti al protocollo del termociclatore:
    1. Passaggio 1 Prima **fase di attesa**
      - a. Tasso di rampa: 100%
      - b. Temp: 55
      - c. Tempo: 5:00
    2. Passaggio 1 Seconda **fase di attesa**.
      - a. Tasso di rampa: 100%
      - b. Temp: 60
      - c. Tempo: 5:00
    3. Evidenziare la seconda **fase di attesa** e selezionare il pulsante **Add Stage** (Aggiungi fase). Nel menu a discesa, selezionare **Holding** (Attesa)
    4. Passaggio 1 **Terza fase di attesa**
      - a. Tasso di rampa: 100%
      - b. Temp: 65
      - c. Tempo: 5:00
    5. Prima **fase di funzionamento (ciclo) in 2 passaggi**
      - a. Numero di cicli: 10
      - b. NON selezionare Enable Auto Delta (Abilita Auto Delta)
      - c. Passaggio 1
        - i. Tasso di rampa: 100%
        - ii. Temp: 92
        - iii. Tempo: 0:05
      - d. Passaggio 2
        - i. Tasso di rampa: 100%
        - ii. Temp: 57
        - iii. Tempo: 0:40
        - iv. Disattivare la raccolta dati selezionando il pulsante **Data Selection** (Selezione dati) in fondo al passaggio.
    6. Evidenziare il passaggio 2 e selezionare il pulsante **Add Stage** (Aggiungi fase). Nel menu a discesa, selezionare **Cycling** (Funzionamento)
    7. Seconda **fase di funzionamento (ciclo) in 2 passaggi**
      - a. Numero di cicli: 30
      - b. NON selezionare Enable Auto Delta (Abilita Auto Delta)
      - c. Passaggio 1
        - i. Tasso di rampa: 100%
        - ii. Temp: 92
        - iii. Tempo: 0:05
      - d. Passaggio 2
        - i. Tasso di rampa: 100%
        - ii. Temp: 57
        - iii. Tempo: 0:40
        - iv. Assicurarsi che per questo passaggio la raccolta dati sia attivata (configurazione predefinita)
    8. Se la fase aggiunta è errata, è possibile rimuoverla premendo il pulsante **Undo "Add Stage"** (Annulla "Aggiungi fase") subito dopo aver aggiunto la fase oppure evidenziare la fase tra le linee verticali e selezionare il pulsante **Delete Selected** (Elimina selezione)
5. Impostare la soglia per ciascun analita.
  - a. Selezionare la scheda **Analysis** (Analisi) nel menu in alto a sinistra.
  - b. Selezionare il pulsante **Analysis Settings** (Impostazioni analisi) nell'angolo in alto a destra.

- c. d. Evidenziare SARS-CoV-2 e deselezionare la casella **Use Default Settings** (Usa impostazioni predefinite). Deselezionare **Automatic Threshold** (Soglia automatica) e modificare il valore soglia a 75.000. Lasciare selezionato **Automatic Baseline** (Basale automatico).
- d. d. Evidenziare PCR e deselezionare la casella **Use Default Settings** (Usa impostazioni predefinite). Deselezionare **Automatic Threshold** (Soglia automatica) e modificare il valore soglia a 10.000. Lasciare selezionato **Automatic Baseline** (Basale automatico).
- e. In fondo alla casella, selezionare **Apply Analysis Settings** (Applica impostazioni analisi)

Target	Soglia	Inizio basale	Fine basale
SARS-CoV-2	75.000	Auto	Auto
PRC	10.000	Auto	Auto

- i. Salvare il nuovo protocollo come modello per usi futuri.
  - i. Nella parte superiore dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto a **Save** (Salva)
  - ii. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
  - iii. Salvare in una cartella adeguata
  - iv. **Nome file:** "Lyra SARS-CoV-2"
  - v. **Salva come tipo:** 'file modello documenti esperimento (\*.edt)'
  - vi. Uscire dal software.

## Procedura di analisi per termociclatore Applied Biosystems 7500 Standard

1. Avviare il programma software 7500 Standard v2.06.
2. Si apre la finestra di dialogo **Quick Startup document** (Documento di avvio rapido).
3. Fare clic su **Create a new document** (Crea nuovo documento).
4. La maggior parte delle voci seguenti dovrebbe corrispondere all'impostazione predefinita. In caso contrario, modificare secondo necessità.

<b>Dosaggio:</b>	Curva standard (Quantificazione assoluta)
<b>Contenitore:</b>	trasparente a 96 pozzetti
<b>Modello:</b>	Lyra SARS-CoV-2
<b>Modalità di esecuzione:</b>	Fast 7500
<b>Operatore:</b>	<i>il proprio nome operatore</i>
<b>Commenti:</b>	SDS v1.4
<b>Nome piastra:</b>	<b>AAMMGG- Lyra SARS-CoV-2</b>

5. Configurare la piastra dei campioni
  - a. Nelle schede **Setup** (Configurazione) e **Plate** (Piastra) viene visualizzata la configurazione della piastra.
  - b. Selezionare tutti i pozzetti destinati a contenere il campione, fare clic con il tasto destro e selezionare **Well Inspector** (Ispettore pozzetto) dal menu a discesa. Quando si apre la finestra popup **Well Inspector** (Ispettore pozzetto), selezionare i rilevatori per SARS-CoV-2 e PRC.
  - c. Utilizzare **Well Inspector** (Ispettore pozzetto) per inserire i nomi dei campioni. Nella finestra Well Inspector (Ispettore pozzetto) è possibile inserire gli ID dei pazienti. Tuttavia, si consiglia di eseguire questa operazione prima di risospendere il master mix liofilizzato, dopo il ciclo o utilizzando la funzione di importazione, per ridurre al minimo i tempi di attesa delle reazioni PCR a temperatura ambiente prima di avviare il ciclo.
  - d. Salvare il ciclo con il nome **AAMMGG- Lyra SARS-CoV-2.sds**.
  - e. Si apre la finestra con la richiesta "Reason for change of entry" (Motivo della modifica del dato). Inserire **"Setup"** (Configurazione) ed eventuali altri commenti relativi al ciclo.
6. Avvio della PCR
  - a. Selezionare la scheda **Instrument** (Strumento).
  - b. Inserire la piastra PCR a 96 pozzetti nel dispositivo.
  - c. In **Instrument Control** (Controllo strumento), selezionare il pulsante **Start** (Avvio) per iniziare il ciclo.
7. Dopo la PCR
 

**IMPORTANTE:** premere OK al termine del ciclo.

  - a. Analizzare i dati premendo il pulsante **"Analyze"** (Analizza) nel menu in alto e salvare il file.
  - b. Salvare il file premendo **Save Document** (Salva documento) nella barra attività. Si apre la finestra con la richiesta "Reason for change of entry" (Motivo della modifica del dato).
  - c. Inserire **"Data analysis post run"** (Analisi dei dati post ciclo) ed eventuali altri commenti relativi al ciclo.
8. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 4)

# Procedura di programmazione del termociclatore Bio-Rad CFX96 Touch

Per ulteriori informazioni, fare riferimento al Manuale per l'utente Parte 10010424 rev. D.

## Istruzioni per la programmazione:

1. Avviare il programma software CFX96 Touch
2. Nella finestra popup **Startup Wizard** (Procedura guidata avviamento), **selezionare come strumento** il **CFX96** dal menu a discesa
3. In **Select Run Type** (Seleziona tipo di ciclo) premere il pulsante **User-defined** (Definito dall'utente)
4. Creare un nuovo protocollo per il termociclatore selezionando **Create New** (Crea nuovo) dalla finestra **Run Setup** (Configurazione ciclo)
5. In **Protocol Editor** (Editor protocollo), apportare le seguenti modifiche alle condizioni del ciclo:
  - a. Modificare il **Sample Volume** (Volume campione) a **20 µl**
  - b. In **Tools** (Strumenti) nella barra strumenti in alto a sinistra selezionare **Run Time Calculator** (Avvia calcolatore tempo) e selezionare **96 Wells-All Channels** (96 pozzetti-tutti i canali)
  - c. **Passaggio 1** (attesa)
    - i. Dupl: 1
    - ii. Temp: 55C
    - iii. Tempo: 5:00
  - d. **Passaggio 2** (attesa)
    - i. Dupl: 1
    - ii. Temp: 60C
    - iii. Tempo: 5:00
  - e. **Passaggio 3** (attesa)
    - i. Dupl: 1
    - ii. Temp: 65C
    - iii. Tempo: 5:00
    - iv. Rimuovere la lettura piastra da questa fase selezionando il pulsante **Remove Plate Read** (Rimuovi lettura piastra) in basso a sinistra
  - f. **Passaggio 4** (fase di amplificazione in 2 passaggi)
    - i. Evidenziare **step 3** (passaggio 3), andare nella parte inferiore sinistra della finestra e selezionare **Insert Step** (Inserisci passaggio) un totale di 2 volte, fino a raggiungere il passaggio 5 (nella parte superiore sinistra della finestra del menu a discesa, assicurarsi che in **Insert Step** (Inserisci passaggio) sia selezionato **After** (Dopo)).
    - ii. Evidenziare **step 4** (passaggio 4) e immettere le seguenti impostazioni:
      1. Temp: 92
      2. Tempo: 0:05
    - iii. Evidenziare **step 5** (passaggio 5) e immettere le seguenti impostazioni:
      1. Temp: 57
      2. Tempo: 0:40
      3. Sulla parte sinistra dello schermo, selezionare **Remove Plate Read** (Rimuovi lettura piastra)
    - iv. Selezionare **step 6** (passaggio 6), il **GOTO step** (passaggio GOTO), e modificare lo stato in **GOTO step 4** (passaggio GOTO 4) e modificare il numero di volte a **9**
  - g. **Passaggio 7** (fase di amplificazione in 2 passaggi)
    - i. Dopo aver evidenziato il passaggio 6, selezionare il pulsante **Insert Step** (Inserisci passaggio) nella parte inferiore sinistra della finestra un totale di 2 volte (fino a raggiungere il passaggio 8)
    - ii. Evidenziare **step 7** (passaggio 7) e immettere le seguenti impostazioni:
      1. Temp: 92
      2. Tempo: 0:05
    - iii. Evidenziare **step 8** (passaggio 8) e immettere le seguenti impostazioni:
      1. Temp: 57
      2. Tempo: 0:40
      3. Sulla sinistra della finestra, selezionare il pulsante **Add Plate Read to Step** (Aggiungi lettura piastra al passaggio)
      4. Evidenziare **step 8** (passaggio 8) e selezionare il pulsante **Insert GOTO** (Inserisci GOTO) nella parte inferiore sinistra della finestra



- iv. Selezionare **step 9** (passaggio 9), il **GOTO step** (passaggio GOTO), e modificare lo stato in **GOTO step 7** (passaggio GOTO 7) e il numero di ripetizione delle volte a **29**
- h. Salvare le nuove condizioni di ciclo come protocollo per uso futuro
  - i. Nella parte superiore sinistra dello schermo, selezionare il pulsante **Save** (Salva)
  - ii. Salvare nella cartella **ExpressLoad**
  - iii. **Denominare** il file "Lyra SARS-CoV-2"
  - iv. **Salvare come** "File di protocollo (\*.prcl)"
  - v. Selezionare **Save** (Salva)
  - vi. Fare clic su **Ok** nella finestra dell'editor del protocollo
- 6. Definire la configurazione della piastra
  - a. Nella finestra **Run Setup** (Impostazione ciclo), selezionare la scheda **Plate** (Piastra)
  - b. In **Express Load** (Caricamento rapido) nel menu a discesa, selezionare **Quick Plate 96 wells All Channels.pltd** (Piastra rapida 96 pozzetti tutti i canali.pltd)
  - c. Selezionare il pulsante **Edit Selected** (Modifica selezione) per personalizzare la configurazione della piastra
  - d. Nella barra strumenti superiore, selezionare **Settings** (Impostazioni). È necessario configurare le impostazioni predefinite.
    - i. **Plate Size** (Dimensioni piastra) selezionare **96 Wells (96 pozzetti)**
    - ii. **Plate Type** (Tipo piastra) selezionare **BR Clear (Trasparente BR)**
    - iii. **Number Convention** (Convenzione numerica) selezionare **Scientific Notation (Numerazione scientifica)**
    - iv. **Units** (Unità) selezionare **Copy Number (Numero copia)**
  - e. Lasciare **Scan Mode** (Modalità scansione) impostata su **All Channels** (Tutti i canali) nella parte superiore della finestra
  - f. Selezionare il pulsante **Select Fluorophores** (Seleziona fluorofori) nella parte superiore destra della finestra Plate Editor (Editor piastra)
    - i. Deselezionare tutti i fluorofori predefiniti
    - ii. Selezionare **FAM** e **Cy5** e fare clic su **OK**
  - g. Nella finestra **Plate Editor** (Editor piastra), evidenziare l'intera piastra e fare clic sulla casella di controllo davanti a tutti i fluorofori: **FAM** e **Cy5**
  - h. Selezionare il pulsante **Experiment Settings** (Impostazioni esperimento) per definire i target
    - i. Nella parte inferiore sinistra della finestra **Experiment Settings** (Impostazioni esperimento) nella casella **New** (Nuovo), digitare **SARS-CoV-2** e selezionare **Add** (Aggiungi)
    - ii. Ripetere il tutto per il **PRC**
    - iii. Selezionare **OK**
  - i. Nella finestra **Plate Editor** (Editor piastra) accanto a **FAM** nel menu a discesa in **Target Name** (Nome target), selezionare **SARS-CoV-2** e per **Cy5** selezionare **PRC**
  - j. Salvare la nuova configurazione della piastra per uso futuro
    - i. Nella parte superiore sinistra dello schermo, selezionare il pulsante **Save** (Salva)
    - ii. Salvare nella cartella **ExpressLoad**
    - iii. **Denominare** il file "Piastra Lyra SARS-CoV-2"
    - iv. **Salva come** "File piastra (\*.pltd)"
    - v. Selezionare **Save** (Salva)
    - vi. Fare clic su **Ok** nella finestra **Plate Editor** (Editor piastra)
  - k. Uscire dal software

## Procedura di test del termociclatore Bio-Rad CFX96 Touch

### Istruzioni per l'analisi:

1. Aprire il file del ciclo da analizzare
2. In alto a sinistra, selezionare **Quantification Tab** (Scheda quantificazione)
3. Nella curva di amplificazione, selezionare la casella davanti a **Log Scale** (Scala Log)
4. Selezionare **Settings** (Impostazioni) nella barra degli strumenti in alto a sinistra nello schermo
  - a. Per **Cq Determination Mode** (Modalità determinazione Cq), selezionare **Single Threshold** (Soglia unica)
  - b. In **Baseline Setting** (Impostazione basale), selezionare **Baseline Subtracted Curve Fit** (Adattamento curva sottratta basale)
  - c. In **Analysis Mode** (Modalità analisi), selezionare **Target**

- d. In **Cycles to Analyze** (Cicli da analizzare), scegliere 1-30, quindi fare clic su **OK**
- e. È necessario configurare i cicli basali e la soglia per ciascun target
  - i. Assicurarsi che nel grafico di amplificazione sia selezionata solo la **casella SARS-CoV-2**
  - ii. Andare a **Settings** (Impostazioni) nella barra degli strumenti e selezionare **Baseline Threshold** (Soglia basale)
    1. Nella parte superiore della casella, selezionare **Auto Calculated** (Calcolo automatico) per **Baseline Cycles** (Cicli basali)
    2. Per **Single Threshold** (Soglia unica) in fondo alla casella, selezionare **User Defined** (Definita dall'utente)
      - a. Impostare su **164**
      - b. Selezionare **OK**
  - iii. **Deselezionare** la **casella SARS-CoV-2** e **selezionare** la **casella PRC** nel grafico di amplificazione
  - iv. Andare a **Settings** (Impostazioni) nella barra degli strumenti e selezionare **Baseline Threshold** (Soglia basale)
    1. Nella parte superiore della casella, selezionare **Auto Calculated** (Calcolo automatico) per **Baseline Cycles** (Cicli basali)
    2. Per **Single Threshold** (Soglia unica) in fondo alla casella, selezionare **User Defined** (Definita dall'utente)
      - a. Impostare su **100**
      - b. Selezionare **OK**
5. Uscire dal software
6. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 4)

## Istruzioni per la programmazione di Qiagen Rotor-Gene Q

Per ulteriori informazioni, fare riferimento al Manuale per l'utente Parte 1065453EN.

### Istruzioni per la programmazione:

1. Avviare il programma software Rotor-Gene Q
2. Nella finestra popup **New Run** (Nuovo ciclo), selezionare la scheda **Advanced** (Avanzate) nella parte superiore dello schermo
3. Selezionare **Empty Run** (Ciclo vuoto) e poi **New** (Nuovo) nella finestra popup in basso a destra per avviare la **Advanced Run Wizard** (Procedura guidata ciclo avanzato)
  - a. Selezionare le dimensioni adeguate del rotore nella **Advanced Run Wizard** (Procedura guidata ciclo avanzato) in alto a sinistra nello schermo
  - b. Selezionare la casella che dichiara che il **Locking Ring** (Anello di bloccaggio) è **Attached** (Attaccato) e selezionare **Next** (Avanti)
  - c. Lasciare vuote le sezioni **Operator** (Operatore) e **Notes** (Note)
  - d. Immettere **20 µl** come **Reaction Volume** (Volume di reazione) nella parte inferiore sinistra dello schermo
  - e. Per **Sample Layout** (Disposizione campioni) scegliere **1, 2, 3...**, quindi selezionare **Next** (Avanti)
  - f. In **Channel Setup** (Impostazione canale), selezionare **Create New** (Crea nuovo) per immettere le informazioni relative a ciascun rilevatore
    - i. In **Name** (Nome), immettere **SARS-CoV-2**
    - ii. **Source** (Fonte) selezionare 470 nm
    - iii. **Detector** (Rilevatore) selezionare 510 nm
    - iv. Non regolare l'impostazione predefinita **Gain** (Acquisizione) di 7, dato che verrà impostata in un passaggio successivo
    - v. Selezionare **OK**
  - g. Ripetere il passaggio precedente selezionando **Create New** (Crea nuovo)
    - i. In **Name** (Nome), immettere **PRC**
    - ii. **Source** (Fonte) selezionare 625 nm
    - iii. **Detector** (Rilevatore) selezionare 660 nm
    - iv. Non regolare l'impostazione predefinita **Gain** (Acquisizione) di 7, dato che verrà impostata in un passaggio successivo
    - v. Selezionare **OK**

- h. Selezionare il pulsante **Edit Profile** (Modifica profilo) in centro alla finestra per impostare un profilo di ciclo
- i. Nella finestra **Edit Profile** (Modifica profilo), andare nella parte superiore sinistra dello schermo a **New** (Nuovo), quindi selezionare **Cycling** (Ciclo) nel menu a discesa. Dovrebbe essere visualizzata una fase di attesa e di ciclo in tre passaggi.
  - ii. Modificare la fase di attesa per ottenere una temperatura di **55 °C** e un tempo di **5:00 minuti**
  - iii. Selezionare il pulsante **Insert After** (Inserisci dopo) al centro della finestra popup, quindi selezionare **New Hold at Temperature** (Nuova attesa alla temperatura)
  - iv. Modificare la seconda fase di attesa per ottenere una temperatura di **60 °C** e un tempo di **5:00 minuti**
  - v. Selezionare il pulsante **Insert After** (Inserisci dopo) al centro della finestra popup, quindi selezionare **New Hold at Temperature** (Nuova attesa alla temperatura) per inserire una terza fase di attesa
  - vi. Modificare la terza fase di attesa per ottenere una temperatura di **65 °C** e un tempo di **5:00 minuti**
  - vii. Evidenziare la prima **fase del ciclo** e modificarla come segue:
    1. Questo ciclo viene ripetuto **10** volte
    2. Selezionare **Timed Step** (Passaggio cronometrato) dal menu a discesa nella parte centrale-sinistra dello schermo
    3. Non selezionare **Long Range** (Lungo intervallo) o **Touchdown** sulla sinistra dello schermo
    4. Il primo passaggio:
      - a. **92 °C**
      - b. **5 secondi**
      - c. **Acquisizione non avvenuta**
    5. Selezionare il passaggio due e configurarlo come segue:
      - a. **57 °C**
      - b. **40 secondi**
      - c. **Acquisizione non avvenuta**
    6. Evidenziare il passaggio tre ed eliminarlo selezionando il pulsante “-“ al centro della finestra
    7. Selezionare il pulsante **Insert After** (Inserisci dopo) al centro della finestra popup, quindi selezionare **New Cycling** (Nuova esecuzione del ciclo)
  - viii. Evidenziare la seconda **fase del ciclo** e modificarla come segue:
    1. Questo ciclo viene ripetuto **30** volte
    2. Selezionare **Timed Step** (Passaggio cronometrato) dal menu a discesa nella parte centrale-sinistra dello schermo
    3. Non selezionare **Long Range** (Lungo intervallo) o **Touchdown** sulla sinistra dello schermo
    4. Il primo passaggio:
      - a. **92 °C**
      - b. **5 secondi**
      - c. **Acquisizione non avvenuta**
    5. Selezionare il passaggio due e configurarlo come segue:
      - a. **57 °C**
      - b. **40 secondi**
      - c. Selezionare **Acquiring to Cycling A** (Acquisizione per ciclo A)
        - i. **In Acquiring Channels (Canali di acquisizione)** evidenziare il nome predefinito del canale (Green) e selezionare il pulsante < per spostarlo nell'elenco **Available Channels** (Canali disponibili)
        - ii. Nell'elenco **Available Channels** (Canali disponibili), selezionare **SARS-CoV-2** e il pulsante > per spostarlo nell'elenco **Acquiring Channels** (Canali di acquisizione)
        - iii. Ripetere il passaggio precedente per **PRC**, quindi selezionare **OK**
    6. Evidenziare il passaggio tre ed eliminarlo selezionando il pulsante “-“ al centro della finestra
  - ix. Nella finestra **Edit Profile** (Modifica profilo), selezionare **OK**

- i. Nella finestra **New Run Wizard** (Procedura guidata nuovo ciclo), selezionare **Gain Optimisation** (Ottimizzazione acquisizione)
  - i. Al centro della finestra **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configurazione ottimizzazione auto-acquisizione), selezionare il menu a discesa in **Channel Settings** (Impostazioni canale) e selezionare **SARS-CoV-2**.
  - ii. Selezionare il pulsante **Add** (Aggiungi) a destra
    1. Nella finestra **Auto-Gain Optimisation Channel Settings** (Impostazioni canale ottimizzazione auto-acquisizione), assicurarsi che **Tube Position** (Posizione provetta) per SARS-CoV-2 sia impostata su **1**. A tal fine, è necessario che un controllo positivo contenente SARS-CoV-2 e PRC venga analizzato a ogni ciclo di PCR e collocato nella prima provetta. In caso contrario, l'acquisizione potrebbe non essere impostata correttamente.
    2. Lasciare l'impostazione di **Target Sample Range** (Intervallo target campione) e **Acceptable Gain Range** (Intervallo accettabile acquisizione) impostata sui valori predefiniti, ovvero rispettivamente 5-10 FI e tra -10 e 10.
    3. Selezionare **OK**
    4. Ripetere i passaggi 3. j. ii. 1-3. per il **PRC**
  - iii. Nella finestra **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configurazione ottimizzazione auto-acquisizione), selezionare la casella accanto a **Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition (Esegui ottimizzazione prima della 1° acquisizione)**
  - iv. Selezionare **Close** (Chiudi)
- j. Nella finestra **New Run Wizard** (Procedura guidata nuovo ciclo), selezionare il pulsante **Next** (Avanti)
- k. Salvare il nuovo protocollo come modello per usi futuri
  - i. Nella parte inferiore destra della finestra, selezionare il pulsante **Save Template** (Salva modello)
  - ii. **Salva in:** C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates
  - iii. **Nome file:** "Lyra SARS-CoV-2"
  - iv. **Salva come:** "Modello (\*.ret)"
- l. Uscire dal software

## Ciclo di analisi con Qiagen Rotor-Gene Q

### Istruzioni per l'analisi:

1. In New Run Wizard (Procedura guidata nuovo ciclo), caricare il modello SARS-CoV-2.
2. Premere Start (Avvio).
3. Aprire il file del ciclo da analizzare
4. Nella barra strumenti superiore, selezionare il pulsante **Analysis** (Analisi)
  - a. Selezionare **Quantitation** (Quantificazione), quindi **Cycling A. SARS-CoV-2** (Ciclo A. SARS-CoV-2) e **Show** (Visualizza)
  - b. È necessario stabilire una soglia per SARS-CoV-2
    - i. Nella parte inferiore destra dello schermo al di sotto di **CT Calculation** (Calcolo CT), immettere **0,03** come **SARS-CoV-2 Threshold** (Soglia SARS-CoV-2)
    - ii. Nella casella **Eliminate Cycles before** (Elimina cicli precedenti a), assicurarsi di aver immesso il valore **1**
    - iii. Assicurarsi che il grafico di amplificazione sia impostato su **Log Scale** (Scala Log) (il pulsante di scelta in basso a sinistra nel grafico dice Linear Scale [Scala lineare] o Log Scale [Scala Log])
  - c. Selezionare **Quantitation** (Quantificazione), quindi **Cycling A. PRC** (Ciclo A. PRC) e **Show** (Visualizza)
  - d. È necessario stabilire una soglia per PRC
    - i. Nella parte inferiore destra dello schermo al di sotto di **CT Calculation** (Calcolo CT), immettere **0,05** come **PRC Threshold** (Soglia PRC)
    - ii. Nella casella **Eliminate Cycles before** (Elimina cicli precedenti a), assicurarsi di aver immesso il valore **1**
    - iii. Assicurarsi che il grafico di amplificazione sia impostato su **Log Scale** (Scala Log) (il pulsante di scelta in basso a sinistra nel grafico dice Linear Scale [Scala lineare] o Log Scale [Scala Log])
5. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 4)

# Istruzioni per la programmazione di Roche LightCycler 480 Instrument II

Per ulteriori informazioni, fare riferimento al Manuale per l'utente Parte 05152062001 0208.

## Creazione di un modello di ciclo del dosaggio con LightCycler 480 II

1. Avviare il programma software di LightCycler (LC) 480
2. È necessario stabilire il **Detection Format** (Formato rilevazione) per specificare i canali in cui verrà letta la fluorescenza
  - a. Selezionare **Tools** (Strumenti) in basso a destra nello schermo di avvio
  - b. Selezionare **Detection Formats** (Formati rilevazione), quindi scegliere **New** (Nuovo)
  - c. Denominare il formato "Lyra ® SARS-CoV-2"
  - d. Nella finestra **Filter Combination Selection** (Selezione combinazione filtri), selezionare 465-510 e 618-660
  - e. Nella finestra **Selected Filter Combination List** (Elenco combinazioni filtri selezionate), digitare SARS-CoV-2 per 465-510 e PRC per 618-660
  - f. Lasciare i valori predefiniti su 1 in Melt Factor (Fattore Melt), Quant Factor (Fattore Quant) e Max Integration Time (Tempo massimo integrazione)
  - g. Selezionare **Close** (Chiudi) per salvare il nuovo formato di rilevazione e tornare allo schermo iniziale
  - h. Per accedere al nuovo **Detection Format** (Formato rilevazione), è necessario chiudere e quindi ricaricare il software LC 480
3. Dopo aver chiuso e ricaricato il software, selezionare **White Plates** (Piastre bianche) e **New Experiment** (Nuovo esperimento) nella finestra Experiment Creation (Creazione esperimento)
4. Nella schermata successiva, selezionare "Lyra ® SARS-CoV-2" dal menu a discesa in **Detection Formats** (Formati rilevazione)
5. Immettere **20 µl** come **Reaction Volume** (Volume di reazione) nella parte superiore destra dello schermo
6. Immettere i nomi per ciascuno dei programmi di RT-PCR
  - a. In **Program Name** (Nome programma) immettere **Stage 1** (Fase 1), in **Cycles** (Cicli) immettere **1** e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **none** (nessuna)
  - b. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un programma
  - c. Denominare il programma successivo **Stage 2** (Fase 2), in **Cycles** (Cicli) immettere **1** e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **none** (nessuna)
  - d. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un programma
  - e. Denominare il programma successivo **Stage 3** (Fase 3), in **Cycles** (Cicli) immettere **1** e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **none** (nessuna)
  - f. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un programma
  - g. Denominare il programma successivo **Stage 4** (Fase 4), in **Cycles** (Cicli) immettere **40** e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **quantification** (quantificazione)
7. Impostare i tempi e le temperature dei cicli di RT-PCR
  - a. Evidenziare **Stage 1** (Fase 1) in **Program Name** (Nome programma) e modificare **Stage 1 Temperature Targets** (Temperatura dei target Fase 1) come segue:
    - i. **Target (°C)** impostato su **55**
    - ii. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **none** (nessuna)
    - iii. **Hold [Attesa] (hh:mm:ss)** impostata su **5:00**
    - iv. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 4,4
    - v. **Sec Target (°C), Step Size [Dimensione passaggio] (°C)** e **Step Delay [Ritardo passaggio] (cicli)** devono essere lasciati su 0 per le fasi 1-4.
  - b. Evidenziare **Stage 2** (Fase 2) in **Program Name** (Nome programma) e modificare **Stage 2 Temperature Targets** (Temperatura dei target Fase 2) come segue:
    - i. **Target (°C)** impostato su **60**
    - ii. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **none** (nessuna)
    - iii. **Hold [Attesa] (hh:mm:ss)** impostata su **5:00**
    - iv. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 4,4
  - c. Evidenziare **Stage 3** (Fase 3) in **Program Name** (Nome programma) e modificare **Stage 3 Temperature Targets** (Temperatura dei target Fase 3) come segue:
    - i. **Target (°C)** impostato su **65**
    - ii. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **none** (nessuna)
    - iii. **Hold [Attesa] (hh:mm:ss)** impostata su **5:00**
    - iv. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 4,4

- d. Evidenziare **Stage 4** (Fase 4) in **Program Name** (Nome programma) e modificare **Stage 4 Temperature Targets** (Temperatura dei target Fase 4) come segue:
  - i. Il primo passaggio:
    1. **Target (°C)** impostato su **92**
    2. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **none (nessuna)**
    3. **Hold [Attesa]** (hh:mm:ss) impostata su **0:05**
    4. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 4,4
  - ii. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un passaggio e configurare il secondo passaggio:
    1. **Target (°C)** impostato su **57**
    2. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **single (singola)**
    3. **Hold [Attesa]** (hh:mm:ss) impostata su **0:40**
    4. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 2,2
8. Salvare il nuovo protocollo come modello del ciclo per usi futuri.
  - a. Nell'angolo inferiore sinistro dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto al pulsante **Apply Template** (Usa modello)
  - b. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
  - c. Selezionare **Templates Folder** (Cartella modelli)
  - d. Evidenziare **Run Templates Folder** (Cartella modelli ciclo)
  - e. Denominare il modello di ciclo Lyra<sup>®</sup> SARS-CoV-2 e fare clic sul pulsante di selezione
9. Uscire dal software.

### Creazione di una procedura di analisi del dosaggio LightCycler 480 II

1. Caricare il modello ciclo Lyra SARS-CoV-2.
2. Premere Start (Avvio).
3. Il modello di analisi può essere stabilito solo al termine dell'esperimento iniziale
4. Nel ciclo Lyra<sup>®</sup> SARS-CoV-2, selezionare il pulsante **Analysis** (Analisi) nella barra del modulo
  - a. Scegliere **Abs Quant/Fit Points** (Quant Abs/Punti adattamento)
  - b. Nella finestra popup **Create New Analysis** (Crea nuova analisi), selezionare il sottoinsieme predefinito dal menu a discesa **subset** (sottoinsieme), quindi selezionare il pulsante di selezione
  - c. Impostare il **Background** (Sfondo) su 2-10 per tutti gli analiti
    - i. Impostare **Min Offset** (Scarto minimo) su 1
    - ii. Impostare **Max Offset** (Scarto massimo) su 9
  - d. Nella parte centrale inferiore dello schermo, assicurarsi che **Color Compensation** (Compensazione colore) sia spenta per tutti gli analiti
  - e. Lasciare le impostazioni predefinite per **First Cycle** (Primo ciclo) su 1 e **Last Cycle** (Ultimo ciclo) su 40
5. Nella parte centrale superiore dello schermo, selezionare **Noise Band** (Banda di rumore)
6. Scegliere il menu a discesa accanto al pulsante **Noise Band** (Banda di rumore) e selezionare **Noise Band Fluorescence** (Banda di rumore fluorescenza)
7. Per ciascun analita sotto al pulsante **Filter Comb** (Comb. filtri), impostare la banda di rumore come segue:
  - a. SARS-CoV-2 su 1,95
  - b. PRC su 1,4619
8. Scegliere **Calculate** (Calcola) in basso a sinistra nello schermo
9. Salvare il nuovo protocollo di analisi come modello per usi futuri.
  - a. Nell'angolo inferiore sinistro dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto al pulsante **Apply Template** (Usa modello)
  - b. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
  - c. Selezionare **Templates Folder** (Cartella modelli)
  - d. Evidenziare **Analysis Templates Folder** (Cartella modelli analisi)
  - e. Denominare il modello di analisi Lyra<sup>®</sup> SARS-CoV-2 e fare clic sul pulsante di selezione
10. Creare un rapporto
  - a. Selezionare l'icona **Save** (Salva) nella barra delle azioni globale sul lato destro dello schermo
  - b. Scegliere il pulsante **Report** sulla barra del modulo sul lato sinistro dello schermo
  - c. Selezionare le impostazioni appropriate e premere il pulsante **Generate** (Genera)
11. Per applicare un modello di analisi a cicli successivi
  - a. Una volta terminato il ciclo, selezionare il pulsante **Analysis** (Analisi) nella barra del modulo
  - b. Scegliere **Abs Quant/Fit Points** (Quant Abs/Punti adattamento)

- c. Nella finestra popup **Create New Analysis** (Crea nuova analisi), selezionare il sottoinsieme predefinito dal menu a discesa **subset** (sottoinsieme), quindi selezionare il pulsante di selezione
  - d. Selezionare il pulsante **Apply Template** (Usa modello) all'estrema sinistra dello schermo e scegliere il modello di analisi Lyra<sup>®</sup> SARS-CoV-2 dalla **Analysis Templates Folder** (Cartella modelli analisi)
  - e. Selezionare yes (sì) nella finestra popup
12. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 4)

## Istruzioni per la programmazione di Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro

Per ulteriori informazioni, fare riferimento al Manuale per l'utente Parte 4489822 Revisione A.

### Istruzioni per la programmazione:

1. Aprire il software Design and Analysis (Progettazione e analisi)
2. Selezionare l'opzione "SET UP PLATE" (IMPOSTA PIASTRA)
3. Dalla barra laterale sullo schermo, selezionare le seguenti proprietà da filtrare:
  - a. Instrument (Strumento) – QuantStudio 7 Pro
  - b. Block (Blocco) – 96-Well 0.2 mL (96 pozzetti da 0,2 ml)
  - c. Run Mode (Modalità ciclo) – Fast (Rapida)
  - d. Le opzioni di analisi vengono lasciate vuote
4. Dalle selezioni della piastra presenti sullo schermo, selezionare il modello di sistema "PCR Only" (Solo PCR) e il sistema andrà automaticamente alla scheda "Run Method" (Esegui metodo)
5. Esegui metodo
  - a. Modificare il volume di reazione a 20,0 µl
  - b. La temperatura della copertura riscaldata abilitata resta di 105,0 gradi C
  - c. Scorrere sulla fase Hold (Attesa) presente nei parametri di ciclo per visualizzare i pulsanti di addizione/sottrazione sia nella parte superiore che nella parte inferiore della prima fase.
  - d. Fare clic con il pulsante sinistro del mouse sul pulsante di addizione destro in alto: verrà visualizzato un elenco delle possibilità di scelta della fase. Scorrere verso il basso e scegliere Hold (Attesa).
  - e. Ripetere i passaggi precedenti in modo che nei parametri di ciclo siano presenti tre fasi di attesa.
  - f. Scorrere sulla fase PCR per visualizzare i pulsanti di addizione/sottrazione in alto e in basso. Fare clic con il pulsante sinistro del mouse sul pulsante di addizione destro in alto: verrà visualizzato un elenco delle possibilità di scelta della fase. Scorrere verso il basso e scegliere PCR.
  - g. Tornare alla prima fase e immettere i seguenti parametri:
    - i. Fase 1 Hold (Attesa)
      1. tasso di rampa 2,63
      2. 55 °C
      3. 5 minuti
    - ii. Fase 2 Hold (Attesa)
      1. tasso di rampa 2,63
      2. 60 °C
      3. 5 minuti
    - iii. Fase 3 Hold (Attesa)
      1. tasso di rampa 2,63
      2. 65 °C
      3. 5 minuti
    - iv. Fase 4 PCR
      1. Passaggio 1:
        - a. tasso di rampa 2,63
        - b. 92 °C
        - c. 5 secondi
      2. Passaggio 2:
        - a. tasso di rampa 2,32
        - b. 57 °C
        - c. 40 secondi
        - d. Fare clic sull'icona della fotocamera al Passaggio 2. Compare una finestra che chiede di confermare se disabilitare la raccolta dati durante questo passaggio. Fare clic su OK.
    - v. In fondo alla Fase 4 PCR, modificare il numero di cicli a 10

- vi. Fase 5 PCR
  - 1. Passaggio 1:
    - a. tasso di rampa 2,63
    - b. 92 °C
    - c. 5 secondi
  - 2. Passaggio 2:
    - a. tasso di rampa 2,32
    - b. 57 °C
    - c. 40 secondi
    - d. Assicurarsi che l'immagine dell'icona della fotocamera sia evidenziata/attivata per la raccolta dati durante i 30 cicli della Fase 5, Passaggio 2.
- vii. In fondo alla Fase 4 PCR, modificare il numero di cicli a 30
- h. Scorrere verso l'alto e scegliere la scheda "Plate Setup" (Configurazione piastra) nella parte superiore dello schermo.
- 6. Configurazione piastra
  - a. Modificare Passive Reference (Riferimento passivo) su "NONE" (NESSUNO)
  - b. Sul lato inferiore destro dello schermo, assicurarsi che sia stata selezionata la scheda Target, quindi evidenziare e premere il pulsante di addizione per aggiungere "Target 1". Premere nuovamente per aggiungere "Target 2".
  - c. Fare clic sulla casella "Target 1" e modificare il nome a CoV-2.
  - d. Fare clic sulla casella reporter associata sotto alla scheda Reporter e scegliere FAM dal menu a discesa.
  - e. Fare clic sulla casella "Target 2" e modificare il nome in PRC.
  - f. Fare clic sulla casella reporter associata sotto alla scheda Reporter e scegliere CY5 dal menu a discesa.
  - g. Evidenziare il pulsante "Actions" (Azioni) situato sul lato superiore destro dello schermo e premere il pulsante a discesa. Nel menu a discesa, scegliere "Analysis Setting" (Impostazione analisi)
  - h. In Analysis Setting (Impostazione analisi), disabilitare le seguenti opzioni per tutti i target:
    - i. Use Default Column (Usa colonna predefinita)
    - ii. Auto Threshold Column (Colonna soglia automatica)
    - iii. Auto Baseline Column (Colonna basale automatico)
    - iv. Baseline Start (Avvio basale) e Baseline End (Termine basale) dovrebbero visualizzare i valori predefiniti 3 e 15
  - i. In "Threshold" (Soglia), fare clic sulla casella associata al target CoV e immettere 70000.
  - j. In "Threshold" (Soglia), fare clic sulla casella associata al target PRC e immettere 20000.
  - k. Fare clic su "Save" (Salva).
  - l. Ritornare al pulsante "Actions" (Azioni) e premere il pulsante a discesa, scegliendo "Save As" (Salva con nome). Ciò consente di salvare il modello in un percorso di propria scelta. Salvare il modello come "Lyra SARS Cov-2 Assay".

### Creazione di una procedura di analisi con Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro

**Nota:** le presenti istruzioni sono rivolte agli utenti che non hanno lo strumento QuantStudio 7 Pro Real-Time PCR e il software Applied Biosystems Design and Analysis 2.2 connessi. L'utente deve aprire il modello Lyra SARS CoV-2 creato in precedenza con il software, salvare eventuali nuovi modelli di analisi campioni su un supporto USB e trasferire il modello nello strumento.

Per la connettività correlata al software e allo strumento, rivolgersi al proprio rappresentante Thermo Fisher/Applied Biosystems QuantStudio.

1. Aprire il modello del dosaggio Lyra SARS CoV-2 generato in precedenza.
2. Fare clic sulla Plate Setup Tab (Scheda configurazione piastra) situata nella parte superiore dello schermo.
3. Sul lato destro dello schermo, assicurarsi che la scheda "Samples" (Campioni) sia evidenziata e premere il pulsante di addizione per aggiungere il numero di campioni da analizzare.
4. Fare clic sulla casella "Sample 1" (Campione 1) per rinominare il campione. Ripetere questo passaggio per tutti gli altri campioni che verranno immessi.
5. Fare clic sul pozzetto situato nella mappa della piastra, quindi selezionare la casella accanto al nome del campione nella barra laterale destra per associare il nome al pozzetto.



- a. L'utente ha anche la possibilità di evidenziare la posizione del pozzetto sulla mappa della piastra e di fare clic sulla casella "Enter sample" (Inserisci campione). Immettere l'ID del campione e premere TAB per passare al pozzetto successivo sulla mappa della piastra. In tal modo, il nome del campione viene automaticamente caricato nella barra laterale.
6. Dopo aver immesso i nomi dei campioni, è possibile evidenziare i pozzetti facendo clic con il tasto sinistro del mouse sul pozzetto iniziale e trascinando il mouse sui pozzetti associati nel ciclo. Per scegliere i target, fare clic sulle caselle di controllo accanto a ciascun target sulla barra laterale.
7. Fare clic sul pulsante Actions (Azioni) sulla parte superiore destra dello schermo e scegliere "Save As" (Salva con nome) nel menu a discesa.
  - a. Viene visualizzata una finestra popup che richiede all'utente di assegnare un nome al file sulla base delle informazioni relative al ciclo di analisi del campione e alla posizione del file da salvare.
  - b. Salvare il file del ciclo di analisi con il nuovo nome (.edt) in un supporto USB inserito nel computer.
8. Trasferire il supporto USB nella porta sulla parte anteriore dello strumento.
9. Tra le opzioni visualizzate sullo schermo dello strumento, premere "Load plate file" (Carica file piastra). QuantStudio 7 Pro è un dispositivo con touchscreen.
10. Sullo schermo "Run Queue" (Coda ciclo), premere "USB drive" (Drive USB) sulla destra. Verranno visualizzati tutti gli eventuali file piastra salvati sul supporto USB.
11. Premere il file piastra associato al ciclo da eseguire.
12. Viene visualizzata una nuova finestra che richiede la posizione dei risultati al termine del ciclo.
  - a. Premere "USB drive Connected" (Unità USB connessa) se l'icona non è già evidenziata e premere "Done" (Fatto).
13. Centrifugare la piastra campioni a 96 pozzetti per assicurare che tutto il liquido si trovi verso il fondo di ciascun pozzetto.
  - a. Assicurarsi che la centrifuga sia ben equilibrata.
  - b. Estrarre delicatamente la piastra dalla centrifuga per assicurarsi che tutti i liquidi restino sul fondo dei pozzetti.
14. Premere l'icona con doppia freccia situata nell'angolo superiore destro dello schermo dello strumento.
  - a. Il cassetto dello strumento si apre sul davanti.
15. Collocare la piastra centrifugata sul portapiastre accertandosi che l'orientamento della piastra sia corretto.
  - a. Il pozzetto A1 deve trovarsi nell'angolo superiore sinistro.
  - b. La piastra apparirà leggermente sospesa sul blocco a causa di due strisce in silicone situate sopra e sotto la piastra. Ciò è normale, e il coperchio dello strumento schiatterà la piastra verso il basso dopo aver chiuso il cassetto.
16. Premere "Start Run" (Avvia ciclo) sullo schermo dello strumento.
  - a. Comparirà una finestra popup che richiede all'utente di confermare che la piastra sia stata caricata.
  - b. In caso affermativo, premere nuovamente "Start Run" (Avvia ciclo), oppure premere "Open Drawer" (Apri cassetto) per collocare la piastra nel blocco, quindi premere "Start Run" (Avvia ciclo).
17. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 4)



Kit M120 – Lyra SARS-CoV-2 Assay



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover,  
Germania



**Quidel Corporation**  
2005 East State Street, Suite 100  
Athens, OH 45701 Stati Uniti  
**quidel.com**

**PIM120100IT00 (07/20)**  
Health Canada: IO312783

## GLOSSARIO

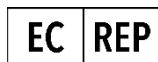
---



Numero di catalogo



Marchio di conformità CE



Rappresentante autorizzato  
nella Comunità Europea



Codice lotto



Data di scadenza



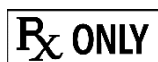
Produttore



Limite di temperatura



Uso previsto



Soggetto a prescrizione medica



Per l'uso, consultare le istruzioni riportate  
sull'etichetta elettronica



Rischi biologici



Per uso diagnostico *in vitro*



Contiene materiale sufficiente per 96 determinazioni



Contenuto/Contiene



Controllo

---