

Para la detección cualitativa de ARN viral del coronavirus SARS-CoV-2 humano extraído de muestras de exudado nasal y nasofaríngeo.

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Puede consultarse un glosario de símbolos en quidel.com/glossary.

ÍNDICE

RESUMEN Y EXPLICACIÓN	2
PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO.....	3
MATERIALES SUMINISTRADOS	4
MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS	4
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	4
Conservación y manipulación de los reactivos del kit	5
Indicaciones de inestabilidad o deterioro de los reactivos	6
Obtención, conservación y manipulación de muestras.....	6
Conservación de los extractos de ácidos nucleicos.....	6
Instrucciones de programación para la extracción de ácidos nucleicos del sistema NucliSENS easyMAG de bioMérieux.....	6
PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS.....	8
Procedimiento de rehidratación de la mezcla maestra	8
Procedimiento de configuración de la RT-PCR.....	8
CONTROL DE CALIDAD	9
RENDIMIENTO CLÍNICO	11
RENDIMIENTO ANALÍTICO	12
Límite de detección	12
REACTIVIDAD ANALÍTICA (Inclusividad).....	15
ESPECIFICIDAD ANALÍTICA (Reactividad cruzada)	16
LIMITACIONES.....	18
SERVICIO DE ATENCIÓN AL CLIENTE Y SERVICIO TÉCNICO	18
PROPIEDAD INTELECTUAL	19
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
ANEXO (protocolos de programación y análisis específicos de cada termociclador).....	20
Instrucciones de programación del Applied Biosystems 7500 Fast Dx	20

Procedimiento de prueba del termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Dx	21
Instrucciones de programación de Applied Biosystems 7500 Standard	22
Procedimiento de prueba del termociclador Applied Biosystems 7500 Standard	24
Procedimiento de programación del termociclador Bio-Rad CFX96 Touch	25
Procedimiento de prueba del termociclador Bio-Rad CFX96 Touch.....	26
Instrucciones de programación de Qiagen Rotor-Gene Q	27
Análisis de prueba de Qiagen Rotor-Gene Q	29
Instrucciones de programación de Roche LightCycler 480 Instrument II.....	30
Creación de una plantilla de análisis de LightCycler 480 II Assay	30
Creación de un procedimiento de análisis en LightCycler 480 II Assay	31
Instrucciones de programación de Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro	32
Creación de un procedimiento de análisis en Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro	33
GLOSARIO	36



USO INDICADO

El Lyra SARS-CoV-2 Assay es una prueba de RT-PCR en tiempo real destinada a la detección cualitativa del ácido nucleico *in vitro* del SARS-CoV-2 en muestras de exudados nasales, nasofaríngeos (NF) y orofaríngeos (OF) de pacientes en los que su médico sospecha la presencia de COVID-19. El análisis se centra en la poliproteína no estructural (pp1ab) del virus SARS-CoV-2. La prueba autorizada consiste en la extracción de ácidos nucleicos utilizando los sistemas NucliSENS easyMAG o EMAG de bioMérieux, seguido de la realización de RT-PCR en un instrumento de PCR en tiempo real aprobado por la FDA.

Los resultados son para la identificación de ARN del SARS-CoV-2. Por lo general, el SARS-CoV-2 es detectable en muestras de las vías respiratorias superiores durante la fase aguda de la infección. Los resultados positivos son indicativos de la presencia de ARN del SARS-CoV-2; la correlación clínica con los antecedentes del paciente y otra información de diagnóstico es necesaria para determinar el estado de infección del paciente. Los resultados positivos no descartan una infección bacteriana ni coinfección por otros virus. Los laboratorios de Estados Unidos y sus territorios deben notificar todos los resultados positivos a las autoridades sanitarias públicas pertinentes.

Los resultados negativos no excluyen una infección por SARS-CoV-2 y no se deben utilizar como la única base de la toma de decisiones para la gestión del paciente. Los resultados negativos deben combinarse con las observaciones clínicas, los antecedentes del paciente y la información epidemiológica.

El Lyra SARS-CoV-2 Assay está diseñado para su uso por parte de personal de laboratorio clínico cualificado y formado que haya recibido instrucción y formación sobre las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El SARS-CoV-2, también conocido como el virus causante de la COVID-19, se identificó por primera vez en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei (China), en diciembre de 2019. Se cree que el virus, como en el caso de los novedosos coronavirus causantes del SARS-1 y del MERS, se originó en murciélagos; sin embargo, es posible que el SARS-CoV-2 haya tenido un hospedador intermedio, como los pangolines, los cerdos o las civetas.¹ A comienzos de marzo de 2020, la infección en seres humanos se ha extendido a más de 74 países, ha infectado a más de 92 000 personas y ha causado la muerte a más de 3100 personas.¹ El 11 de marzo, la OMS declaró la infección por el SARS-CoV-2 una pandemia mundial.

Se cree que el tiempo medio de incubación es de 5,1 días y se espera que los síntomas permanezcan durante 12 días desde la infección.³ Los síntomas de la COVID-19 son similares a los de otras enfermedades respiratorias víricas, e incluyen fiebre, tos y dificultad para respirar.⁴

El Lyra SARS-CoV-2 Assay se ha diseñado para detectar específicamente ARN del SARS-CoV-2.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El Lyra SARS-CoV-2 Assay detecta ARN viral del SARS-CoV-2 extraído de una muestra de un paciente mediante los sistemas NucliSENS® easyMAG® o EMAG® de bioMérieux. Se realiza una prueba reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) múltiple en tiempo real, en condiciones optimizadas, en un único tubo y se generan amplicones para el virus específico (si está presente) y el control de proceso (PRC) presente en la muestra. Esta reacción se realiza con uno de seis termocicladores: 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. La identificación del virus SARS-CoV-2 se produce mediante cebadores específicos de la diana y sondas marcadas con fluorescencia que hibridan con una región conservada de la poliproteína no estructural del virus SARS-CoV-2.

Marcadores de las sondas del Lyra SARS-CoV-2 Assay	
Diana	Colorante
Poliproteína no estructural (pp1ab)	FAM
Control del proceso (PRC)	Quasar® 670

A continuación, se incluye un resumen del procedimiento:

- 1. Recogida de muestras:** Obtenga muestras de exudado nasofaríngeo, orofaríngeo o nasal utilizando técnicas de referencia de los pacientes sintomáticos. Estas muestras se transportan, almacenan y procesan conforme a los procedimientos de laboratorio establecidos. ¹
- 2. Extracción de ácido nucleico:** Extraiga los ácidos nucleicos de las muestras con los sistemas NucliSENS easyMAG o EMAG siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando los reactivos adecuados (véase **Materiales necesarios pero no suministrados**).
Antes del procedimiento de extracción, añada 20 µl del control del proceso (PRC) a cada alícuota de 180 µl de la muestra o los controles. El PRC sirve para monitorizar inhibidores en la muestra extraída, garantiza que se ha realizado la amplificación adecuada y confirma que la extracción de ácidos nucleicos ha sido suficiente.
- 3. Rehidratación de la mezcla maestra:** Vuelva a hidratar la mezcla maestra liofilizada utilizando 135 µl de solución de rehidratación. La mezcla maestra contiene cebadores con oligonucleótidos, fluoróforo y sondas marcadas con extintor de fluorescencia dirigidos a las regiones conservadas del SARS-CoV-2, así como la secuencia del control del proceso. Las sondas están doblemente marcadas, con un colorante indicador en el extremo 5' y un extintor de fluorescencia en el extremo 3'. La mezcla maestra rehidratada es suficiente para ocho reacciones.
- 4. Amplificación y detección de ácido nucleico:** Añada 15 µl de la mezcla maestra rehidratada a cada pocillo (Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, el Roche LightCycler 480) o tubo (Qiagen Rotor-Gene Q). A continuación, añada 5 µl de los ácidos nucleicos extraídos (muestras con PRC) al pocillo o tubo. Coloque la placa o el tubo en el instrumento adecuado.

Una vez añadida la placa de reacción al instrumento, se inicia el protocolo de análisis. El protocolo inicia la transcripción inversa de las dianas del ARN, lo que genera ADN complementario, y se produce la posterior amplificación de las secuencias diana. El Lyra SARS-CoV-2 Assay se basa en la química de TaqMan® y usa una enzima con actividades de transcriptasa inversa, ADN polimerasa y exonucleasa 5'-3'. Durante la amplificación del ADN, esta enzima escinde la unión de la sonda a la secuencia de ADN complementario, y separa el extintor de fluorescencia del colorante indicador. Este paso genera un aumento de la señal de fluorescencia tras la excitación con una fuente luminosa de la longitud de onda apropiada. Con cada ciclo, se separan de sus extintores moléculas adicionales de colorante, lo que genera una señal adicional. Si se logra suficiente fluorescencia, la muestra se notifica como positiva para la secuencia diana detectada.

MATERIALES SUMINISTRADOS

N.º de ref. M120

Kit de detección (96 reacciones). Conservar a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.		
N.º	Componente	Cantidad
1	Solución de rehidratación Pieza M5003	1 vial/kit 1,9 ml
2	Mezcla maestra de Lyra SARS-CoV-2 Pieza N.º M5150 Contenidos liofilizados: Enzima ADN polimerasa con actividad de transcriptasa inversa Pares de cebadores con oligonucleótidos; sondas de oligonucleótidos dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP) Estabilizantes	12 viales/kit, 8 reacciones/vial
CONTROL	Control del proceso Pieza N.º M5273	1 vial/kit 2,0 ml
CONTROL +	Control positivo con ARN sintético de SARS-CoV-2 Pieza N.º M5153	1 vial/kit 1,0 ml
CONTROL -	Control negativo Pieza N.º M5275	1 vial/kit 1,0 ml

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Micropipetas (intervalo de 1 a 10 µl y de 100 a 1000 µl)
- Puntas de pipetas antiaerosoles
- Applied Biosystems 7500 Fast Dx, versión del software 1.4
- Applied Biosystems 7500 Standard, versión del software 2.0.6
- Roche LightCycler 480 Instrument II, versión del software 1.5.0.39
- Qiagen Rotor-Gene Q, versión del software 2.0.2.4
- Bio-Rad CFX96 Touch, versión del software 3.1
- Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro, versión del software 2.0
- N.º de placa de PCR de 96 pocillos:
 - ▶ Applied Biosystems 7500 Fast Dx: 4344906
 - ▶ Applied Biosystems 7500 Standard: N8010560
 - ▶ Roche LightCycler 480: 04729692001, lámina incluida
 - ▶ Bio-Rad CFX96 Touch: HSP9631, precintos MSB1001
 - ▶ Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro: 4483354
- Películas de placa óptica
- Qiagen Rotor-Disc
- Película de termosellado Qiagen Rotor-Disc
- Centrífuga de placas para placa de 96 pocillos
- Software de NucliSENS easyMAG de bioMérieux versión 2.0
- Software de EMAG de bioMérieux versión 2.0
- Tampones de NucliSENS easyMAG de bioMérieux 1, 2, 3
- Tampón de lisis de NucliSENS easyMAG de bioMérieux
- Microesferas magnéticas de sílice NucliSENS easyMAG de bioMérieux
- Desechables de NucliSENS easyMAG de bioMérieux
- Pipeta Biohit

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Las normativas locales, estatales y federales sobre la notificación de enfermedades notificables se actualizan continuamente e incluyen una serie de organismos para la vigilancia e investigaciones de epidemias. Los laboratorios tienen la responsabilidad de seguir sus normativas estatales y/o locales y deben consultar a sus laboratorios de salud pública locales y/o estatales sobre las directrices de envío de muestras aisladas y/o clínicas.

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Los resultados positivos son indicativos de la presencia de ARN del SARS-CoV-2.
- Los laboratorios de Estados Unidos y sus territorios deben notificar todos los resultados positivos a las autoridades sanitarias públicas pertinentes.

- El análisis se ha validado utilizando el software de NucliSENS easyMAG de bioMérieux versión 2.0. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El análisis se ha validado utilizando el software Applied Biosystems 7500 Fast Dx versión 1.4. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El análisis se ha validado mediante el software Applied Biosystems Standard versión 2.0.6. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- Este análisis se ha validado mediante el software de Roche LightCycler 480 Instrument II, versión 1.5.0.39. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El análisis se ha validado mediante el software de Qiagen Rotor-Gene Q, versión 2.0.2.4. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El análisis se ha validado mediante el software de Bio-Rad CFX96 Touch, versión 3.1. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El análisis se ha validado utilizando el software de Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro, versión 2.0. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- Las características de rendimiento de esta prueba se han establecido con los tipos de muestras que aparecen en el **Apartado de uso previsto** solamente. No se han evaluado los resultados de este análisis con otros tipos de muestras.
- El uso de este producto debe limitarse a personal con la suficiente formación en las técnicas de PCR y RT-PCR.
- Trate todas las muestras como potencialmente infecciosas. Siga las precauciones universales cuando manipule las muestras, este kit y su contenido.
- Los procedimientos adecuados de obtención, conservación y transporte de las muestras son fundamentales para la obtención de resultados correctos.
- Conserve los reactivos del análisis tal como se indica en las etiquetas de cada uno de ellos.
- Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección facial cuando utilice este kit.
- Para obtener resultados precisos, pipetee cuidadosamente utilizando solo equipos calibrados.
- Limpie y desinfecte a fondo todas las superficies con una solución de lejía al 10 % seguida de agua de grado molecular.
- Utilice micropipetas con una barrera para aerosoles o puntas para desplazamiento positivo para todos los procedimientos.
- Evite la contaminación microbiana y la contaminación cruzada de los reactivos del kit. Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- No mezcle los reactivos de kits con números de lote distintos.
- No use reactivos de otros fabricantes con este kit.
- No use el producto después de su fecha de caducidad.
- La planificación adecuada del flujo de trabajo es fundamental para minimizar el riesgo de contaminación. Planifique siempre un flujo de trabajo de laboratorio de forma unidireccional, comenzando con la preamplificación y avanzando por la amplificación y detección.
- Use suministros y equipos especializados en las zonas de preamplificación y amplificación.
- No permita el movimiento cruzado de personal o equipo entre las zonas.
- Mantenga siempre separados los suministros de amplificación de los suministros de preamplificación
- No abra los tubos de muestras ni desprecinte las placas tras la amplificación.
- Para minimizar el riesgo de contaminación por amplicones, deseche cuidadosamente el material amplificado de conformidad con las leyes y normativas locales.
- No use suministros especializados para la preparación de muestras o reactivos en el procesamiento de ácidos nucleicos diana.
- Utilice prendas protectoras, guantes y protección ocular/facial adecuada cuando manipule el contenido del kit.
- Lávese bien las manos después de la manipulación.
- Para obtener información adicional sobre símbolos de peligro, seguridad, manipulación y eliminación de los componentes de este kit, consulte la Ficha de datos de seguridad (FDS) en quidel.com.

CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE LOS REACTIVOS DEL KIT

- Conserve el kit sin abrir a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la parte exterior de la caja del kit.
- La mezcla maestra rehidratada debe utilizarse dentro de las dos horas siguientes a la rehidratación y la mezcla maestra residual puede conservarse a -20 °C durante un máximo de 24 horas. Proteja la mezcla maestra de la luz cuando la conserve.

Indicaciones de inestabilidad o deterioro de los reactivos

La turbidez de la solución de rehidratación, aunque sea anterior a la fecha de caducidad, podría indicar el deterioro de este reactivo. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel para obtener un repuesto.

OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras nasofaríngeas, orofaríngeas o nasales deben obtenerse, transportarse, conservarse y procesarse conforme a la norma M41-A del CLSI.² Las muestras deben conservarse entre 2 °C y 8 °C hasta realizar el análisis. Si las muestras no se pueden analizar en las 72 horas siguientes a su obtención, deben congelarse a una temperatura de -70 °C o inferior hasta su análisis.

Los siguientes medios de transporte vírico (M4, M4-RT, M5, M6, MTM y UTM) (1 ml y 3 ml) son compatibles con los análisis respiratorios Lyra.

El medio de transporte vírico recomendado por los CDC (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/Viral-Transport-Medium.pdf>) es compatible con el Lyra SARS-CoV-2 Assay.

Conservación de los extractos de ácidos nucleicos

Los eluidos del sistema NucliSENS easyMAG se pueden conservar a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C) durante 2 horas, de 2 °C a 8 °C durante 24 horas y 1 mes de -20 °C a -70 °C.

Instrucciones de programación para la extracción de ácidos nucleicos del sistema NucliSENS easyMAG de bioMérieux

Nota: Debe incluirse en cada análisis de extracción un control positivo (es decir, Lyra SARS-CoV-2, control positivo n.º M5153) y un control de proceso negativo (es decir, Lyra SARS-CoV-2, control negativo n.º 5275, medios de transporte viral o una muestra negativa para CoV caracterizada previamente).


1. Encienda el instrumento y espere a que la luz aparezca de color naranja. Luego encienda el ordenador/inicie el software NucliSENS easyMAG. No inicie sesión en el software hasta que la luz del instrumento se haya puesto verde.

2. Lea el código de barras de los reactivos después de pulsar los botones “Instrument” (instrumento)  y


“Reagent Inventory” (inventario de reactivos)



3. Para introducir las muestras, pulse el botón “Daily Use” (uso diario) ,

que le dirigirá de manera predeterminada a la pantalla “Define Request” (definir solicitud) .

- Seleccione los siguientes parámetros:
- a. ID de muestra: introduzca el **nombre de la muestra** utilizando el teclado.
 - b. Matriz: seleccione **Other** (otro) en el menú desplegable.
 - c. Solicitud: seleccione **Generic** (genérica) en el menú desplegable.
 - d. Volumen (ml): seleccione **0,200** en el menú desplegable.
 - e. Eluido (µl): seleccione **50** en el menú desplegable.
 - f. Tipo: primario
 - g. Prioridad: normal


, la muestra aparecerá en la ventana “Unassigned Sample” (muestra no asignada) en el lateral izquierdo de la pantalla. Pulse el botón “Enter New Extraction Request”

(introducir nueva solicitud de extracción)  y repita el proceso con las muestras adicionales. De forma

alternativa, se pueden introducir varias muestras pulsando el botón “Auto Create New Extraction Requests”



(crear automáticamente nuevas solicitudes de extracción)

5. Una vez que se hayan creado todas las muestras, vaya a “Organize Runs” (organizar análisis) haciendo clic en el icono  cerca de la parte superior de la página. Cree un análisis pulsando el botón “Create Run” (crear análisis)



Introduzca el nombre del análisis o utilice el nombre predeterminado.



6. Añada muestras al análisis utilizando el botón “Auto Fill Run” (análisis de llenado automático) (se rellenan automáticamente hasta 24 muestras de la “lista de muestras no asignadas” en el lateral izquierdo de la pantalla). De forma alternativa, se pueden meter y sacar del análisis muestras individuales utilizando los “Positioning



icons” (iconos de posicionamiento) izquierdo y derecho después de seleccionar la muestra apropiada. El orden de las muestras en el análisis se puede cambiar utilizando los botones “Move Extraction



Request Up/Down” (subir/bajar solicitud de extracción)

7. Obtenga de 1 a 3 recipientes de muestras (para 8 a 24 muestras, respectivamente) y añada 20 µl de control de proceso a cada uno de los pocillos de muestra utilizados.
8. Añada 180 µl de cada muestra al pocillo apropiado según se haya designado.



9. Vaya a “Load Run” (cargar análisis) pulsando el botón cerca de la parte superior de la pantalla. Inserte las puntas y los recipientes de muestras en el instrumento.

10. Introduzca los códigos de barras de los recipientes de muestras.

11. Introduzca los códigos de barras de las microesferas de sílice que se van a utilizar.

12. Cierre la tapa del instrumento.

13. Asigne las microesferas de sílice a las muestras como se indica a continuación:

- a. Haga clic en el símbolo de los reactivos por debajo del número 1 en la siguiente imagen. El número de lote de las microesferas de sílice debe aparecer debajo de la ficha de Sílice en el número 2 en la siguiente imagen.

- b. Resalte y seleccione las muestras en el análisis para las que sea necesario asignar las microesferas (en el cuadro en el que figura el número 3 en la siguiente imagen).



- c. Haga clic en el icono de posicionamiento (debajo del número 4 en la siguiente imagen) para asignar el número de lote de sílice a las muestras seleccionadas.

- d. Si se selecciona el símbolo de las microesferas (a la derecha del número 5 en la siguiente imagen), el número de lote de las microesferas de sílice debe visualizarse para cada muestra.



14. Imprima la lista de trabajo pulsando el icono «Load Run» (cargar análisis) y, a continuación, pulsando el icono



«Print Work List» (imprimir lista de trabajo)



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



17. Cierre el instrumento y pulse el botón “Start” (iniciar) para comenzar el análisis.
18. Una vez terminado el análisis, transfiera los ácidos nucleicos purificados a los tubos sin nucleasa. Los eluidos del sistema NucliSENS easyMAG se pueden conservar a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C) durante 2 horas, de 2 °C a 8 °C durante 8 horas y 1 mes de -20 °C a -70 °C.

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

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

Procedimiento de rehidratación de la mezcla maestra

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

Nota: La mezcla maestra rehidratada es suficiente para 8 reacciones.

Nota: La mezcla maestra rehidratada se puede conservar a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C) durante un máximo de 24 horas. Para un período de conservación más largo, la mezcla maestra rehidratada se debe volver a tapar, sellar con parafilm y conservar en posición vertical a ≤ -20 °C durante un máximo de 14 días. Proteja la mezcla maestra de la luz cuando la conserve.

Procedimiento de configuración de la RT-PCR

- Añada 15 μ l de la mezcla maestra rehidratada a cada uno de los pocillos de la placa o los tubos.
- Añada 5 μ l de ácidos nucleicos extraídos (muestra con el control del proceso) al pocillo de la placa o el tubo. No es necesario mezclar los reactivos.

Nota: Use una punta nueva de micropipeta con barrera con cada una de las muestras extraídas.

3. Selle la placa o los tubos.
4. Centrifugue la placa o los tubos durante al menos 15 segundos. Asegúrese de que todo el líquido esté en la parte inferior de los pocillos de la placa o los tubos.
5. Encienda el termociclador adecuado.
6. Introduzca la placa o los tubos en el termociclador apropiado.

Nota: Consulte el Apéndice (página 20) para conocer los protocolos de programación y análisis específicos de cada termociclador.

CONTROL DE CALIDAD

El Lyra SARS-CoV-2 Assay incorpora diversos controles para monitorizar el rendimiento del análisis.

1. El **Control del proceso (PRC)** consiste en un bacteriófago MS2 inactivado y estabilizado que contiene un genoma de ARN. Se debe utilizar durante la extracción y amplificación en el análisis. Este control se debe añadir a cada una de las alícuotas de la muestra antes de la extracción. El PRC sirve para monitorizar inhibidores en la muestra extraída, garantiza que se ha realizado la amplificación adecuada y confirma que la extracción de ácidos nucleicos ha sido suficiente.
2. El **control positivo** (con ARN sintético de SARS-CoV-2, Pieza M5153) se debe tratar como una muestra de un paciente, y debe incluirse en cada extracción y análisis por RT-PCR.
3. El **Control negativo** (Pieza M5275) se debe tratar como una muestra de un paciente y se debe incluir en cada extracción y análisis por PCR.
4. La falta de aprobación del **control positivo** o el **control negativo** invalida el análisis por RT-PCR y no deben notificarse los resultados. El análisis de RT-PCR se debe repetir con los controles y muestras extraídos primero. Vuelva a extraer y analizar otra alícuota de los controles y las muestras u obtenga nuevas muestras y repita el análisis si los controles tampoco superan el análisis esta vez.

Resultados esperados de los controles (Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Bio-Rad CFX96 Touch, Qiagen Rotor-Gene Q, o Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro)					
Nombre/Tipo de control	Utilizado para controlar	SARS-CoV-2	Valores de Ct previstos	PRC	Valores de Ct previstos
Control positivo	Fallo importante del reactivo, incluida la integridad de los cebadores y las sondas	+	$5,0 \leq Ct \leq 30,0$	+/-	NC ¹
Control negativo	Contaminación ambiental y/o del reactivo	-	No se ha detectado ninguno	+	$5,0 \leq Ct \leq 30,0$

¹No es necesario ningún valor de Ct para que el control del proceso tenga un resultado positivo.

Resultados esperados de los controles (Roche LightCycler 480)					
Nombre/Tipo de control	Utilizado para controlar	SARS-CoV-2	Valores de Ct previstos	PRC	Valores de Ct previstos
Control positivo	Fallo importante del reactivo, incluida la integridad de los cebadores y las sondas	+	$5,0 \leq Ct \leq 40,0$	+/-	NC ¹
Control negativo	Contaminación ambiental y/o del reactivo	-	No se ha detectado ninguno	+	$5,0 \leq Ct \leq 40,0$

¹No es necesario ningún valor de Ct para que el control del proceso tenga un resultado positivo.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES

Tabla 4. Interpretación de los resultados del Lyra SARS-CoV-2 Assay en Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Bio-Rad CFX96 Touch, Qiagen Rotor-Gene Q o Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro

Resultado del ensayo	Detector: SARS-CoV-2	Detector: Control del proceso	Interpretación de los resultados	Notas y orientación especial
Negativo	Ningún valor de Ct detectado	$5,0 \leq Ct \leq 30,0$	No se ha detectado ARN vírico de SARS-CoV-2; PRC detectado.	
SARS-CoV-2 positivo	$5,0 \leq Ct \leq 30,0$ ¹	NC ²	Se ha detectado ARN vírico de SARS-CoV-2.	
No válido	Ningún valor de Ct detectado	Ningún valor de Ct detectado	No se ha detectado ningún ARN vírico de SARS-CoV-2 ni ARN de PRC.	Prueba no válida. Vuelva a analizar la misma muestra purificada. Si la prueba tampoco es válida, vuelva a extraer y repita el análisis con otra alícuota de la misma muestra u obtenga una nueva muestra y repita el análisis.

Interpretación de los resultados del Lyra SARS-CoV-2 Assay en Roche LightCycler 480

Resultado del análisis	Detector: SARS-CoV-2	Detector: Control del proceso	Interpretación de los resultados	Notas y orientación especial
Negativo	Ningún valor de Ct detectado	$5,0 \leq Ct \leq 40,0$	No se ha detectado ARN vírico de SARS-CoV-2; PRC detectado.	
SARS-CoV-2 positivo	$5,0 \leq Ct \leq 40,0$ ¹	NC ²	Se ha detectado ARN vírico de SARS-CoV-2.	
No válido	Ningún valor de Ct detectado	Ningún valor de Ct detectado	No se ha detectado ningún ARN vírico de SARS-CoV-2 ni ARN de PRC.	Prueba no válida. Vuelva a analizar la misma muestra purificada. Si la prueba tampoco es válida, vuelva a extraer y repita el análisis con otra alícuota de la misma muestra u obtenga una nueva muestra y repita el análisis.

¹ Para las muestras que generen un valor Ct entre 0 (Indeterminado) y 5, realice diluciones 1:10 y 1:100 utilizando medios de transporte no inoculados. Extraiga y analice las muestras diluidas según las instrucciones anteriores. Interprete los resultados según la Tabla 4 anterior. Tenga en cuenta que, si la revisión de la curva de amplificación original de la muestra limpia no sugiere un resultado positivo, se puede aplazar el procesamiento de las muestras diluidas. Si las muestras diluidas vuelven a generar valores Ct entre 0 (indeterminado) y 5, póngase en contacto con un representante de Quidel llamando al (800) 874-1517 (llamada sin costo en EE. UU.) o al +1(858) 552-1100 (fuera de EE. UU.) de lunes a viernes, de 8:00 a. m. a 5:00 p. m. (horario de la costa este) para obtener información adicional.

² No es necesario ningún valor de Ct para que el control del proceso tenga un resultado positivo.

RENDIMIENTO CLÍNICO

El rendimiento clínico del Lyra SARS-CoV-2 Assay se evaluó utilizando dos (2) estudios diferentes:

- Un estudio en el que se utilizaron doscientas sesenta y cinco (265) muestras de exudados nasofaríngeos recientes o congeladas obtenidas en UTM (36 y 229, respectivamente) de pacientes en EE. UU.
- Un estudio de muestras positivas totalmente artificial en el que se utilizaron muestras de exudados nasofaríngeos.

Las doscientas sesenta y cinco (265) muestras fueron todas negativas para SARS-CoV-2 cuando se extrajeron con el sistema NucliSENSeasyMAG y se analizaron con el Lyra SARS-CoV-2 Assay.

Ciento veinticuatro (124) muestras incluidas en este estudio fueron positivas para otros virus respiratorios circulantes, identificados mediante análisis aprobados por la FDA:

Virus circulante	N.º de muestras positivas
Gripe A	30
VSR	4
Coronavirus estacional (no identificado)	10
Coronavirus 229e	20
Coronavirus OC43	20
Coronavirus NL63	20
Coronavirus HKU1	20

Se obtuvo ARN viral de BEI Resources para su uso en el estudio clínico artificial. El ARN genómico se extrajo de un preparado de sobrenadante y lisado celular de células epiteliales renales (Vero E6, ATCC® CRL-1586™) de Cercopithecus aethiops infectadas por coronavirus 2 relacionado con el SARS (SARS-CoV-2), aislado USA-WA1/2020, utilizando el kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit de Qiagen (Qiagen 52904). El ARN genómico viral está en un contexto de ácido nucleico celular y ARN transportador. El número de copias del genoma se estableció mediante el sistema Bio-Rad QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR™).

Se crearon noventa y dos (92) muestras artificiales positivas mediante enriquecimiento de noventa y dos (92) muestras clínicas individuales que se determinó que eran negativas para SARS-CoV-2 mediante el Lyra SARS-CoV-2 Assay antes de su enriquecimiento con una de tres concentraciones de ARN genómico de SARS-CoV-2. Cuarenta y cuatro (44) muestras se enriquecieron con 1 x LoD (8,00E-01 cp/μl) de ARN. Veinticuatro muestras (24) adicionales se enriquecieron con 3 x LoD (2,40E00 cp/μl) de ARN. Veinticuatro muestras (24) adicionales se enriquecieron con 5 x LoD (4,00E00 cp/μl) de ARN. Todas las muestras se extrajeron y se analizaron conforme al prospecto del Lyra SARS-CoV-2 Assay.

Las noventa y dos (92) muestras artificiales fueron todas positivas en el Lyra SARS-CoV-2 Assay. Los resultados de las muestras positivas artificiales se presentan en la tabla siguiente:

Evaluación clínica en muestras de exudados nasofaríngeos enriquecidas			
Concentración de ARN de las muestras	N.º positivas/n.º analizadas	Valor medio de Ct de SARS-CoV-2	% CV
No enriquecida	0/92	NC	NC
1 x 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

El rendimiento en comparación con los resultados previstos es:

Conformidad porcentual positiva 92/92 = 100 % (IC del 95 %: 95,99 %-100 %)

Conformidad porcentual negativa 92/92 = 100 % (IC del 95 %: 95,99 %-100 %)

RENDIMIENTO ANALÍTICO

Límite de detección

El límite de detección (LoD) del Lyra SARS-CoV-2 Assay utilizó diluciones limitantes de ARN genómico de SARS-CoV-2 en matriz nasofaríngea negativa. Cada dilución se extrajo mediante el sistema NucliSENS easyMAG y se analizó en 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 sensibilidad analítica (LoD) se define como la concentración más baja para la que al menos el 95 % de todos los duplicados tuvieron un resultado analítico positivo.

El ARN genómico se extrajo de un preparado de sobrenadante y lisado celular de células epiteliales renales (Vero E6, ATCC CRL-1586) de Cercopithecus aethiops infectadas por coronavirus 2 relacionado con el SARS (SARS-CoV-2), aislado USA-WA1/2020, utilizando el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit de Qiagen (Qiagen 52904). El ARN genómico viral está en un contexto de ácido nucleico celular y ARN transportador. El número de copias del genoma se estableció mediante el sistema Bio-Rad QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR).

Este estudio estableció el LoD del Lyra SARS-CoV-2 Assay como 8,00E-01 copias de ARN genómico/ μ l, confirmado posteriormente mediante el análisis de 20 duplicados.

LoD en muestras nasofaríngeas con Applied Biosystems 7500 Fast Dx				
Concentración	Duplicado	Valor de C_t de SARS-CoV-2	Valor de C_t de PRC	Interpretación
8,00E-01 copias de ARN genómico/ μ l	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

LoD en muestras orofaríngeas con Applied Biosystems 7500 Fast Dx				
Concentración	Duplicado	Valor de C_t de SARS-CoV-2	Valor de C_t de PRC	Interpretación
8,00E-01 copias de ARN genómico/ μ l	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

LoD en muestras orofaríngeas con Applied Biosystems 7500 Fast Dx				
Concentración	Duplicado	Valor de C_t de SARS-CoV-2	Valor de C_t de PRC	Interpretación
	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 en muestras nasofaríngeas con Applied Biosystems 7500 Standard				
Concentración	Duplicado	Valor de C_t de SARS-CoV-2	Valor de C_t de PRC	Interpretación
8,00E-01 copias de ARN genómico/ μ l	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	Indeterminado	19,11	Negativo

LoD en muestras nasofaríngeas con Roche LightCycler 480*				
Concentración	Duplicado	Valor de C_t de SARS-CoV-2	Valor de C_t de PRC	Interpretación
8,00E-01 copias de ARN genómico/ μ l	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

LoD en muestras nasofaríngeas con Roche LightCycler 480*				
Concentración	Duplicado	Valor de C _t de SARS-CoV-2	Valor de C _t de PRC	Interpretación
	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	Positivo

* Los resultados incluyen 10 ciclos que no se registran con otros instrumentos

LoD en muestras nasofaríngeas con Qiagen Rotor-Gene Q				
Concentración	Duplicado	Valor de C _t de SARS-CoV-2	Valor de C _t de PRC	Interpretación
8,00E-01 copias de ARN genómico/ μ l	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
	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 en muestras nasofaríngeas con Bio-Rad CFX96 Touch				
Concentración	Duplicado	Valor de C _t de SARS-CoV-2	Valor de C _t de PRC	Interpretación
8,00E-01 copias de ARN genómico/ μ l	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

LoD en muestras nasofaríngeas con Bio-Rad CFX96 Touch				
Concentración	Duplicado	Valor de C _t de SARS-CoV-2	Valor de C _t de PRC	Interpretación
	19	25,77	22,29	Positivo
	20	25,59	22,16	Positivo

LoD en muestras nasofaríngeas con Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro				
Concentración	Duplicado	Valor de C _t de SARS-CoV-2	Valor de C _t de PRC	Interpretación
8,00E-01 copias de ARN genómico/ μ l	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
	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

El Lyra SARS-CoV-2 Assay se evaluó usando el perfil de referencia para SARS-CoV-2 de la FDA. La evaluación de la sensibilidad y la reactividad cruzada con MERS-CoV se realizó utilizando material de referencia (T1), muestras enmascaradas y el protocolo estándar proporcionado por la FDA. En el estudio se incluyó un estudio de búsqueda de los límites y un estudio de confirmación del LdD. Para establecer la especificidad y corroborar el LdD se usaron pruebas de muestras enmascaradas. Los resultados se resumen en la Tabla 13. Las muestras se extrajeron con el sistema bioMérieux NucliSENS easyMAG, y se amplificaron y detectaron con el Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro.

Resumen del resultado de la confirmación del LdD usando el perfil de referencia para SARS-CoV-2 de la FDA			
Materiales de referencia suministrados por la FDA	Tipo de muestra	LdD del producto	Reactividad cruzada
SARS-CoV-2	Hisopado nasofaríngeo	6,0 \times 10 ³ NDU/ml	N/C
MERS-CoV		N/P	ND

NDU/ml: unidades detectables de ARN por NAAT/ml

N/P: No procede

ND: No se ha detectado

REACTIVIDAD ANALÍTICA (INCLUSIVIDAD)

La inclusividad del Lyra SARS-CoV-2 Assay se estableció mediante un análisis de ARN genómico del coronavirus 2 relacionado con SARS (SARS-CoV-2), aislado USA-WA1/2020, por medio de un *análisis informático*.

El *análisis informático* demostró que los cebadores para Lyra SARS-CoV-2 se conservan en >95 % para 41 270 y 301 386 secuencias de SARS-CoV-2 disponibles en NCBI (17 de diciembre de 2020) y GISAID (30 de diciembre de 2020), respectivamente.

A 30 de diciembre de 2020, GISAID tenía 4529 secuencias de la variante VU1 202012/01 del Reino Unido y de la variante 501Y.V2 de Sudáfrica. El análisis *informático* demostró que los cebadores Lyra SARS-CoV-2 se conservan en >95 % para estas variantes. 5 variantes del Reino Unido tienen un SNP alineado en el extremo 3'. Se pidió una secuencia de ARN que representaba una secuencia variante del Reino Unido con el SNP y otra que representaba una secuencia de control (MN908947.3) y se analizaron en el ensayo Lyra SARS-CoV-2. Ambos moldes de ARN dieron resultados idénticos, lo que indica que el SNP alineado en el extremo 3' no interfiere en la detección. Este resultado se correlaciona con estudios anteriores sobre SNP alineados con el extremo 3' de un cebador para Lyra.

Los cebadores para Lyra SARS-CoV-2 se conservan en un 95-100 % para 342 656 secuencias de SARS-CoV-2 disponibles en NCBI y GISAID con fecha al 30 de diciembre de 2020.

ESPECIFICIDAD ANALÍTICA (REACTIVIDAD CRUZADA)

La especificidad analítica del análisis se determinó mediante un análisis directo de microorganismos en el análisis (análisis “en húmedo”) y mediante un análisis *in silico*. El análisis en húmedo utilizó 25 microorganismos, en concentraciones elevadas, identificados por la FDA como alta prioridad para evaluación debido a la probabilidad razonable de que puedan estar presentes en muestras de las vías respiratorias altas. Los microorganismos fueron indetectables con el Lyra SARS-CoV-2 Assay cuando se analizaron en húmedo como se muestra a continuación.

Resultados de las pruebas de reactividad cruzada				
Virus/bacteria/parásito	Cepa	Fuente/Tipo de muestra	Concentración	Resultados
Adenovirus	Tipo 1	Aislado	1 x 10 ^{7,53} U/ml	Neg, Neg, Neg
Coronavirus	229e	Aislado	1 x 10 ^{6,10} U/ml	Neg, Neg, Neg
Coronavirus	OC43	Aislado	9,55 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml	Neg, Neg, Neg
Coronavirus	NL63	Aislado	1 x 10 ^{4,67} U/ml	Neg, Neg, Neg
MERS-CoV (inactivado por calor)	Florida/USA-2 Saudia Arabia 2014	Aislado	4,17 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	Neg, Neg, Neg
SARS -1	2003-00592	Virus inactivado	No disponible	Neg, Neg, Neg
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129	Aislado	3 x 10 ⁷ UCC/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Z018	Aislado	3,8 x 10 ⁹ UFC/ml	Neg, Neg, Neg
Gripe A H3N2	Brisbane/10/07	Cepa aislada	1 x 10 ^{5,07} U/ml	Neg, Neg, Neg
Gripe A H1N1	Nueva Caledonia/20/99	Aislado	1 x 10 ^{6,66} U/ml	Neg, Neg, Neg
Gripe B	Brisbane/33/08	Cepa aislada	1 x 10 ^{5,15} U/ml	Neg, Neg, Neg
Paragripal	Tipo 1	Aislado	1 x 10 ^{8,01} U/ml	Neg, Neg, Neg
Paragripal	Tipo 2	Aislado	1 x 10 ^{6,34} U/ml	Neg, Neg, Neg
Paragripal	Tipo 3	Aislado	8,51 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /ml	Neg, Neg, Neg
Paragripal	Tipo 4b	Aislado	1 x 10 ^{7,53} U/ml	Neg, Neg, Neg
Enterovirus	Tipo 68	Aislado	1 x 10 ^{6,5} U/ml	Neg, Neg, Neg
Metapneumovirus humano	A1 (IA10-s003)	Cepa aislada	1 x 10 ^{5,55} U/ml	Neg, Neg, Neg
Virus sincicial respiratorio	Tipo A (3/2015 aislado n.º 3)	Cepa aislada	1 x 10 ^{5,62} U/ml	Neg, Neg, Neg
Rinovirus humano	N/C	Virus inactivado	No disponible	Neg, Neg, Neg
<i>Chlamydomydia pneumoniae</i>	AR-39	Aislado	2,9 x 10 ⁷ IFU/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Haemophilus influenzae</i>	Tipo b; Eagan	Aislado	7,87 x 10 ⁸ UFC/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Legionella pneumophila</i>	Philadelphia	Aislado	6,82 x 10 ⁹ UFC/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Z022; 19f	Aislado	2,26 x 10 ⁹ UFC/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Bordetella pertussis</i>		Aislado		Neg, Neg, Neg
<i>Pneumocystis jirovecii</i> -S. cerevisiae Recombinante	W303-Pji	Aislado	1,56 x 10 ⁸ UFC/ml	Neg, Neg, Neg
Matriz nasofaríngea negativa	MTM	N/C	N/C	Neg, Neg, Neg
Matriz nasofaríngea negativa	MTM	N/C	N/C	Neg, Neg, Neg
Matriz nasal negativa	Transporte viral según los CDC	N/C	N/C	Neg, Neg, Neg

Resultados de las pruebas de reactividad cruzada				
Virus/bacteria/parásito	Cepa	Fuente/Tipo de muestra	Concentración	Resultados
Matriz nasofaríngea negativa	Transporte viral según los CDC	N/C	N/C	Neg, Neg, Neg

El análisis *in silico* se centró en 32 microorganismos identificados por la FDA como de alta prioridad debido a su posible presencia en muestras de las vías respiratorias altas.

Microorganismos con reactividad cruzada			
Microorganismo	N.º total de secuencias	N.º de genomas completos	N.º de cepas WGS
Adenovirus	532	532	0
Coronavirus (estacional)	288	288	0
Enterovirus ^B	2708	2674	34
Virus de la gripe A ^{A B}	172 455	21 444 (+39 A/México/4108/2009)	108
Virus de la gripe B ^{A B}	53 952	6755 (+16 B/Florida/4/2006)	0
Virus de la gripe C ^B	2205	N/C	N/C
Metapneumovirus humano	145	145	0
Virus paragripal tipo 1-4	439	439	0
Parecovirus humano	124	124	0
Virus sincicial respiratorio humano ^B	1275	1275	0
Rinovirus	214	214	0
SARS-1	236 ^C	232 (+4 secuencias 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>	11 179	23	45
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	20 797	17	194
<i>Coxiella burnetii</i>	419	28	3
<i>Haemophilus influenzae</i>	45 267	61	692
Legionella ^B	4843	98	65
Leptospira ^B	64 456	133	266
<i>Moraxella catarrhalis</i> ^B	8333	11	184
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	194	194	0
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	808	51	45
<i>Neisseria elongata</i> y <i>N. meningitidis</i> ^B	312 050	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> ^B	61 880	23	508
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ^B	1 633 369	107	8526
<i>Streptococcus pyogenes</i> ^B	46 153	201	1733
<i>Streptococcus salivarius</i> ^B	9417	18	48

^A Los recuentos del genoma de las gripes A y B se consiguieron para las cepas que incluían los 8 segmentos, excepto las cepas A/México/4108/2009(H1N1) y B/Florida/4/2006; se incluyeron todas las secuencias génicas disponibles.

^B Para BLAST, las “sec. diana máx.” se establecieron en 5000.

^C También se incluyeron 4 secuencias CDS de la poliproteína.

El análisis *informático* demostró una homología <80 % con todos los microorganismos, excepto los siguientes: tres (3) secuencias de Enterovirus se conservan en un 80,9 % para el cebador inverso; sin embargo, el cebador directo solo se conserva en un 76 % y la alineación de la sonda tuvo un homología global del 56 %. Las secuencias de SARS-1 se conservan en ≥80 % con ambos cebadores; sin embargo, la última base en los extremos 3' de ambos cebadores no se conserva. El análisis en húmedo de la única cepa de SARS-1 disponible fue indetectable.

LIMITACIONES

- Los resultados negativos no excluyen una infección por el SARS-CoV-2 y no deben utilizarse como la única base para una decisión sobre el tratamiento del paciente.
- Esta prueba está destinada a la detección de ARN del SARS-CoV-2 en muestras de exudado nasofaríngeo y orofaríngeo. El análisis de otros tipos de muestras puede provocar resultados inexactos.
- Las muestras de exudados nasales y del cornete nasal medio se consideran tipos de muestras aceptables para su uso con el Lyra SARS-CoV-2 Assay, pero no se ha establecido el rendimiento con estos tipos de muestras. El análisis de las muestras de exudados nasales y del cornete nasal medio (recogidas por el propio paciente bajo supervisión o recogidas por un profesional sanitario) se limita a pacientes con síntomas de COVID-19.
- Los procedimientos inadecuados de obtención, conservación o transporte de las muestras pueden provocar resultados falsos negativos.
- Los inhibidores presentes en la muestra y/o los errores en el seguimiento del procedimiento del análisis pueden provocar resultados falsos negativos.
- Un profesional sanitario con formación debe interpretar los resultados del análisis junto con los antecedentes médicos, los signos clínicos y los síntomas del paciente, así como los resultados de otras pruebas diagnósticas.
- Pueden persistir analitos diana (secuencias virales) *in vivo*, con independencia de la viabilidad del virus. La detección de analitos diana no implica que los virus correspondientes sean infecciosos ni que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos.
- Existe un riesgo de valores falsos positivos como resultado de contaminación cruzada por microorganismos diana, sus ácidos nucleicos o producto amplificado, o de señales no específicas en el análisis.
- Existe un riesgo de valores falsos negativos debido a la presencia de variantes de secuencia en las dianas virales del análisis.
- No se han estipulado los resultados del análisis en pacientes inmunodeprimidos.
- El rendimiento del dispositivo no se ha evaluado en muestras de individuos que han sido infectados con variantes emergentes de SARS-CoV-2 de interés para la salud pública.

SERVICIO DE ATENCIÓN AL CLIENTE Y SERVICIO TÉCNICO

Si tiene alguna pregunta con respecto al uso de este producto, o si desea comunicar un problema con algún producto, póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel llamando al +1.800.874.1517 (en EE. UU.) o envíe un correo electrónico a technicalsupport@quidel.com. Si se encuentra fuera de EE. UU., puede obtener más información de su distribuidor o directamente de Quidel llamando a uno de los siguientes números de teléfono. Consulte más opciones de servicio técnico en quidel.com.

País	Teléfono	Dirección de correo electrónico
Europa, Oriente Medio y África	+353 (91) 412 474 (principal) 0 1800 200441 (número gratuito)	emeatechnicalsupport@quidel.com
Austria	+43 316 231239	
Bélgica	+32 (2) 793 0180	
Francia	0 (805) 371674	
Alemania	+49 (0) 7154 1593912	
Países Bajos	0 800 0224198	
Suiza	0 800 554864	
Reino Unido	0 800 3688248	
Irlanda	+353 (91) 412 474	
Italia	+39 (800) 620 549	
Norteamérica, Asia-Pacífico, América Latina	858.552.1100	technicalsupport@quidel.com
Canadá	437.266.1704 (principal) 888.415.8764 (número gratuito)	technicalsupport@quidel.com
China	0400 920 9366 o +86 021 3217 8300	chinatechnicalservice@quidel.com

PROPIEDAD INTELECTUAL

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

Quidel y Lyra son marcas registradas de Quidel Corporation. Cualquier otra marca comercial que aparezca en este documento es propiedad de su respectivo dueño y su uso en este documento no implica patrocinio ni respaldo de ningún producto o servicio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 de marzo de 2020.
 2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Viral Culture; Approved Guidelines. CLSI document M41-A [ISBN 1562386239] Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2006.
 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
-

ANEXO (PROTOCOLOS DE PROGRAMACIÓN Y ANÁLISIS ESPECÍFICOS DE CADA TERMOCICLADOR)

Instrucciones de programación del Applied Biosystems 7500 Fast Dx

Consulte la pieza número 4406991 del Manual del usuario para obtener más información.

1. Inicie el paquete de software 7500 Fast Dx.
2. Se abrirá el cuadro de diálogo **Quick Startup document** (documento para inicio rápido). Seleccione el botón **Create New Document (crear nuevo documento) para iniciar el New Document Wizard** (asistente para nuevo documento). Siga cada uno de los pasos para iniciar el protocolo del Lyra SARS-CoV-2 Assay.

- a. **Defina el documento:** la mayoría de los siguientes parámetros deberían ser los valores predeterminados. En caso contrario, cámbielos según corresponda.

- i. Confirme o introduzca la siguiente información.

Análisis:	Curva de calibración (cuantificación absoluta)
Recipiente:	Transparente de 96 pocillos
Plantilla:	Documento en blanco
Modo de análisis:	Fast 7500
Operador:	<i>su nombre de operador</i>
Comentarios:	SDS v1.4
Nombre de la placa:	"Lyra SARS-CoV-2 Assay"

- ii. Seleccione el botón **Next** (siguiente).

- b. **Seleccione detectores:** deben añadirse nuevos detectores para SARS-CoV-2 y el control del proceso (PRC). Para cada diana, seleccione el botón **New Detector**(detector nuevo) para abrir la ventana emergente **New Detector** (detector nuevo). Como alternativa, use el botón **Create Another** (crear otro) de la ventana emergente **New Detector** (detector nuevo) para los últimos dos detectores.

- i. Introduzca la siguiente información para cada detector.

Nombre	Colorante indicador	Colorante de extinción	Color
SARS-CoV-2	FAM	(ninguno)	(Seleccionar)
PRC	Quasar 670	(ninguno)	(Seleccionar)

- ii. Seleccione un único color para representar cada uno de los detectores.

- iii. Resalte los detectores nuevos y añádalos a la columna **Detectors in Document** (detectores en el documento) utilizando el botón **Add** (añadir).

- iv. Seleccione **(none)** (ninguno) en el menú desplegable **Passive reference** (referencia pasiva).

- v. Seleccione el botón **Next** (siguiente).

- vi. Seleccione el botón **Finish** (terminar) sin configurar ninguno de los pocillos.

- c. El asistente se cerrará y se abrirá el software, comenzando con la pestaña **Setup** (Configuración). Esto mostrará la placa de muestras que se configuró durante el inicio rápido. Para la configuración inicial, no es necesario cambiar nada.

- d. Definición del protocolo del termociclador: seleccione la pestaña **Instrument** (instrumento) para configurar las temperaturas y los tiempos de los ciclos de RT-PCR del Lyra SARS-CoV-2 Assay. En **Thermal Profile** (perfil térmico) debe haber un protocolo predeterminado de 2 fases. Cada fase tendrá 3 cuadros de texto modificables por el usuario. El valor del cuadro superior representa el número de repeticiones o ciclos para esa fase. El valor del cuadro central representa la temperatura (°C) y el valor del cuadro inferior representa el tiempo (minutos: segundos).

- i. Realice los siguientes cambios en el **Thermal Cycler Protocol** (protocolo del termociclador) predeterminado:

1. Fase 1

- a. Repetic.: 1
- b. Temp.: 55
- c. Tiempo: 5:00

2. Seleccione la barra entre la Fase 1 y la Fase 2. Seleccione el botón **Add Hold** (añadir espera) para añadir otra fase.

3. Fase 2

- a. Repetic.: 1
- b. Temp.: 60

- c. Tiempo: 5:00
- 4. Seleccione la barra entre la Fase 2 y la Fase 3. Seleccione el botón **Add Hold** (añadir espera) para añadir otra fase.
- 5. Fase 3
 - a. Repetic.: 1
 - b. Temp.: 65
 - c. Tiempo: 5:00
- 6. Fase 4 (fase de disociación en 2 pasos)
 - a. Repet.: 10
 - b. Paso 1
 - i. Temp.: 92
 - ii. Tiempo: 0:05
 - c. Paso 2
 - i. Temp.: 57
 - ii. Tiempo: 0:40
- 7. Seleccione la barra a la derecha de la Fase 4. Seleccione el botón **Add Cycle** (añadir ciclo) para añadir otra fase.
- 8. Fase 5 (fase de disociación en 2 pasos)
 - a. Repet.: 30
 - b. Paso 1
 - i. Temp.: 92
 - ii. Tiempo: 0:05
 - c. Paso 2
 - i. Temp.: 57
 - ii. Tiempo: 0:40
- 9. Si se añade una fase equivocada, la fase se puede eliminar pulsando el botón **Delete** (eliminar) después de resaltar la fase entre las líneas verticales.
- ii. En **Settings** (configuración), introduzca lo siguiente:

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

- e. Configure el umbral de cada analito.
 - i. Seleccione la pestaña **Results** (resultados).
 - ii. Seleccione la pestaña **Amplification Plot** (diagrama de amplificación).
 - iii. Seleccione SARS-CoV-2 en la pestaña Detector (detector) en la esquina superior derecha.
 - iv. En el bloque **Analysis Settings** (configuración de análisis), configure el **Threshold** (umbral) en **7,5e+004**.
 - v. Seleccione el botón **Auto Baseline** (punto de referencia automático).
 - vi. Seleccione PRC en la pestaña Detector (detector) en la esquina superior derecha.
 - vii. En el bloque **Analysis Settings** (configuración de análisis), configure el **Threshold** (umbral) en **1,0e+004**.
 - viii. Seleccione el botón **Auto Baseline** (punto de referencia automático).
- f. Guarde el nuevo protocolo como una plantilla para su uso futuro.
 - i. En la parte superior de la pantalla, seleccione **File** (archivo) y después **Save As** (guardar como).
 - ii. **Guardar en:** D:\Applied Biosystems\7500 Fast System\Templates\
 - iii. **Nombre del archivo:** "Lyra SARS-CoV-2"
 - iv. **Guardar como tipo:** "SDS Templates (*.sdt)"
- g. Salga del software.

Procedimiento de prueba del termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Dx

1. Inicie el paquete de software 7500 Fast Dx v1.4.
2. Se abrirá el cuadro de diálogo **Quick Startup document** (documento para inicio rápido).
3. Haga clic en **Create a new document** (crear un nuevo documento).
4. La mayoría de los siguientes parámetros deberían ser los valores predeterminados. En caso contrario, cámbielos según corresponda.

Análisis:	Curva de calibración (cuantificación absoluta)
Recipiente:	Transparente de 96 pocillos
Plantilla:	Lyra SARS-CoV-2
Modo de análisis:	Fast 7500
Operador:	<i>su nombre de operador</i>
Comentarios:	SDS v1.4
Nombre de la placa:	AAMMDD- Lyra SARS-CoV-2

5. Configuración de la placa de muestras
 - a. En las pestañas **Setup** (configuración) y **Plate** (placa), aparecerá la configuración de la placa.
 - b. Seleccione todos los pocillos que contengan muestra, haga clic con el botón derecho y seleccione **Well Inspector** (inspector de pocillos) en el menú desplegable. Cuando se abra la ventana emergente **Well Inspector** (inspector de pocillos), seleccione los detectores de SARS-CoV- 2 y el PRC.
 - c. Use el **Well Inspector** (inspector de pocillos) para introducir los nombres de la muestras. Puede introducir la identificación de los pacientes en la ventana Well Inspector (inspector de pocillos). Sin embargo, se recomienda realizar esto antes de volver a suspender la mezcla maestra liofilizada, después del análisis o antes de utilizar la función de importación para minimizar el tiempo en que las reacciones de PCR estarán a temperatura ambiente antes de iniciar el análisis.
 - d. Guarde el análisis como **AAMMDD- Lyra SARS-CoV-2.sds**.
 - e. Se abrirá una ventana, "Reason for change of entry", preguntándole por el motivo del cambio de la información. Introduzca "**Setup**" (configuración) y cualquier otro comentario pertinente para el análisis.
6. Inicio de la PCR
 - a. Seleccione la pestaña **Instrument** (instrumento).
 - b. Introduzca en el instrumento la placa de PCR de 96 pocillos.
 - c. En **Instrument Control (control del instrumento)**, seleccione el botón **Start** (inicio) para iniciar el análisis.
7. Después de la PCR

IMPORTANTE: cuando haya terminado el análisis, pulse OK (aceptar).

 - a. Analice los datos pulsando el botón "**Analyze**" (analizar) en el menú superior, y guarde el archivo.
 - b. Guarde el archivo pulsando **Save Document** (guardar documento) en la barra de tareas. Se abrirá una ventana, "Reason for change of entry", preguntándole por el motivo del cambio de la información.
 - c. Introduzca "**Data analysis post run**" (análisis de datos posterior al análisis) y cualquier otro comentario pertinente para el análisis.

Instrucciones de programación de Applied Biosystems 7500 Standard

Consulte la parte número 4387783, Revisión C, del Manual del usuario para obtener más información.

1. Inicie el paquete de software 7500 Standard.
2. Seleccione el botón **Advanced Setup** (configuración avanzada) para abrir Setup (configuración) y Experiment Properties (propiedades del experimento). Siga cada uno de los pasos para iniciar el protocolo de Lyra SARS-CoV-2 Assay.
 - a. Nombre del experimento: introduzca "SARS-CoV-2" como el nombre de experimento. Deje vacíos los campos Barcode (código de barras), User Name (nombre de usuario) y Comments (comentarios).
 - b. Defina la configuración del experimento: seleccione 7500 (96 pocillos), Quantitation- Standard Curve (cuantificación - curva de calibración), TaqMan Reagents (reactivos TaqMan) y Standard (estándar) (~2 horas para realizar un análisis).
3. En el menú superior izquierdo, seleccione **Plate Setup** (configuración de la placa).
 - a. Defina las dianas: se deben añadir nuevos detectores para SARS-CoV-2 y el control del proceso (PRC).
 - i. Introduzca la siguiente información para cada detector.

Nombre	Colorante indicador	Colorante de extinción	Color
SARS-CoV-2	FAM	(ninguno)	(Seleccionar)
PRC	Quasar 670	(ninguno)	(Seleccionar)

- ii. Seleccione el botón **Add New Target** (añadir nueva diana) para cada diana.
- iii. En cada menú desplegable, seleccione indicador, extintor de fluorescencia y color.
- iv. Seleccione un único color para representar cada uno de los detectores.

- b. Asigne dianas y muestras: en esta pestaña en la esquina inferior izquierda, seleccione **none** (ninguno) como la referencia pasiva.
4. Seleccione **Run Method** (método de análisis) en el menú superior izquierdo.
- a. Ajuste el **Reaction Volume** (volumen de reacción) por pocillo a 20 µl en la **Graphical** o **Tabular View** (vista gráfica o tabular).
 - b. Defina el protocolo del termociclador: en la **Graphical** o **Tabular View** (vista gráfica o tabular), el perfil por defecto debe ser 2 fases de espera y un protocolo de ciclado de 2 fases. Cada fase tendrá 3 cuadros de texto modificables por el usuario. El valor del primer cuadro representa la tasa de rampa (%) para esa fase; el valor del segundo cuadro representa la temperatura (°C) y el valor del tercer cuadro representa el tiempo (minutos:segundos).
 - i. Realice los siguientes cambios en Thermal Cyler Protocol (protocolo del termociclador) predeterminado:
 1. Primera **fase de espera** de la fase 1
 - a. Tasa de rampa: 100 %
 - b. Temp.: 55
 - c. Tiempo: 5:00
 2. Segunda **fase de espera** del paso 1
 - a. Tasa de rampa: 100 %
 - b. Temp.: 60
 - c. Tiempo: 5:00
 3. Resalte la segunda **fase de espera** y seleccione el botón **Add Stage** (añadir fase). En el menú desplegable, seleccione **Holding** (espera)
 4. **Tercera fase de espera** del paso 1
 - a. Tasa de rampa: 100 %
 - b. Temp.: 65
 - c. Tiempo: 5:00
 5. Primera fase del **ciclado de 2 pasos**
 - a. Número de ciclos: 10
 - b. NO marque Enable Auto Delta (habilitar Auto Delta)
 - c. Paso 1
 - i. Tasa de rampa: 100 %
 - ii. Temp.: 92
 - iii. Tiempo: 0:05
 - d. Paso 2
 - i. Tasa de rampa: 100 %
 - ii. Temp.: 57
 - iii. Tiempo: 0:40
 - iv. Apague la recogida de datos seleccionando el botón **Data Selection** (selección de datos) en la parte inferior del paso.
 6. Resalte el paso 2 y seleccione el botón **Add Stage** (añadir fase). En el menú desplegable, seleccione **Cycling** (ciclado)
 7. Segunda **fase de ciclado** de 2 pasos
 - a. Número de ciclos: 30
 - b. NO marque Enable Auto Delta (habilitar Auto Delta)
 - c. Paso 1
 - i. Tasa de rampa: 100 %
 - ii. Temp.: 92
 - iii. Tiempo: 0:05
 - d. Paso 2
 - i. Tasa de rampa: 100 %
 - ii. Temp.: 57
 - iii. Tiempo: 0:40
 - iv. Asegúrese de que la recogida de datos se haya encendido para este paso (configuración por defecto).
 8. Si se añade una fase equivocada, la fase se puede eliminar pulsando el botón **Undo** **"Add Stage"** (deshacer "Añadir fase") inmediatamente después de añadir o resaltar la

fase entre las líneas verticales y seleccione el botón **Delete Selected** (eliminar seleccionados).

5. Configure el umbral de cada analito.
 - a. Seleccione la pestaña **Analysis** (análisis) en el menú superior izquierdo.
 - b. Seleccione el botón **Analysis Settings** (configuración de análisis) en la esquina superior derecha.
 - c. Resalte SARS-CoV-2 y deselectione la casilla **Use Default Settings** (usar configuración por defecto). Deselectione **Automatic Threshold** (umbral automático) y cambie el umbral a 75 000. Deje **Automatic Baseline** (punto de referencia automático) seleccionado.
 - d. Resalte PRC y deselectione la casilla **Use Default Settings** (usar configuración por defecto). Deselectione **Automatic Threshold** (umbral automático) y cambie el umbral a 10 000. Deje **Automatic Baseline** (punto de referencia automático) seleccionado.
 - e. En la parte inferior de la casilla, seleccione el botón **Apply Analysis Settings** (aplicar la configuración de análisis).

Diana	Umbral	Inicio del punto de referencia	Final del punto de referencia
SARS-CoV-2	75 000	Auto	Auto
PRC	10 000	Auto	Auto

- i. Guarde el nuevo protocolo como una plantilla para su uso futuro.
 - i. En la parte superior de la pantalla seleccione el menú desplegable junto a **Save** (guardar).
 - ii. Elija **Save as Template** (guardar como plantilla)
 - iii. Guárdelo en una carpeta adecuada.
 - iv. **Nombre del archivo:** "Lyra SARS-CoV-2"
 - v. **Guardar como tipo:** "Experiment Document Template files (*.edt)" (**archivos de plantillas de documentos de experimentos**)
 - vi. Salga del software.

Procedimiento de prueba del termociclador Applied Biosystems 7500 Standard

1. Inicie el paquete de software 7500 Standard v2.06.
2. Se abrirá el cuadro de diálogo **Quick Startup document** (documento para inicio rápido).
3. Haga clic en **Create a new document** (crear un nuevo documento).
4. La mayoría de los siguientes parámetros deberían ser los valores predeterminados. En caso contrario, cámbielos según corresponda.

Análisis:	Curva de calibración (cuantificación absoluta)
Recipiente:	Transparente de 96 pocillos
Plantilla:	Lyra SARS-CoV-2
Modo de análisis:	Fast 7500
Operador:	<i>su nombre de operador</i>
Comentarios:	SDS v1.4
Nombre de la placa:	AAMMDD- Lyra SARS-CoV-2

5. Configuración de la placa de muestras
 - a. En las pestañas **Setup** (configuración) y **Plate** (placa), aparecerá la configuración de la placa.
 - b. Seleccione todos los pocillos que contengan muestra, haga clic con el botón derecho y seleccione **Well Inspector** (inspector de pocillos) en el menú desplegable. Cuando se abra la ventana emergente **Well Inspector** (inspector de pocillos), seleccione los detectores de SARS-CoV- 2 y el PRC.
 - c. Use el **Well Inspector** (inspector de pocillos) para introducir los nombres de las muestras. Puede introducir la identificación de los pacientes en la ventana Well Inspector (inspector de pocillos). Sin embargo, se recomienda realizar esto antes de volver a suspender la mezcla maestra liofilizada, después del análisis o antes de utilizar la función de importación para minimizar el tiempo en que las reacciones de PCR estarán a temperatura ambiente antes de iniciar el análisis.
 - d. Guarde el análisis como **AAMMDD- Lyra SARS-CoV-2.sds**.
 - e. Se abrirá una ventana, "Reason for change of entry", preguntándole por el motivo del cambio de la información. Introduzca "**Setup**" (configuración) y cualquier otro comentario pertinente para el análisis.
6. Inicio de la PCR
 - a. Seleccione la pestaña **Instrument** (instrumento).
 - b. Introduzca en el instrumento la placa de PCR de 96 pocillos.

- c. En **Instrument Control (control del instrumento)**, seleccione el botón **Start** (inicio) para iniciar el análisis.
7. Después de la PCR

IMPORTANTE: cuando haya terminado el análisis, pulse OK (aceptar).

 - a. Analice los datos pulsando el botón **“Analyze”** (analizar) en el menú superior, y guarde el archivo.
 - b. Guarde el archivo pulsando **Save Document** (guardar documento) en la barra de tareas. Se abrirá una ventana, **“Reason for change of entry”**, preguntándole por el motivo del cambio de la información.
 - c. Introduzca **“Data analysis post run”** (análisis de datos posterior al análisis) y cualquier otro comentario pertinente para el análisis.
8. Interpretación de los resultados (véase la Tabla 4)

Procedimiento de programación del termociclador Bio-Rad CFX96 Touch

Consulte la parte número 10010424, Revisión D, del Manual del usuario para obtener más información.

Instrucciones de programación:

1. Inicie el paquete de software CFX96 Touch.
2. En la ventana emergente **Startup Wizard** (asistente de configuración), **Select instrument** (seleccionar instrumento), seleccione **CFX96** en el menú desplegable.
3. En **Select Run Type** (seleccionar tipo de análisis), pulse el botón **User-defined**(definido por el usuario).
4. Cree un nuevo protocolo de termociclado seleccionando **Create New** (crear nuevo) de la ventana **Run Setup** (configuración del análisis).
5. Realice los siguientes cambios en las condiciones de ciclado en **Protocol Editor** (editor de protocolo).
 - a. En **Sample Volume** (volumen de muestra), cambie el volumen de muestra a **20 ul**
 - b. En **Tools** en la barra de herramientas superior izquierda, seleccione **Run Time Calculator** (calculadora de la duración del análisis) y marque **96 Wells-All Channels** (96 pocillos, todos los canales).
 - c. **Paso 1** (espera)
 - i. Repet.:1
 - ii. Temp.: 55 °C
 - iii. Tiempo: 5:00
 - d. **Paso 2** (espera)
 - i. Repet.:1
 - ii. Temp.: 60 °C
 - iii. Tiempo: 5:00
 - e. **Paso 3** (espera)
 - i. Repet.:1
 - ii. Temp.: 65 °C
 - iii. Tiempo: 5:00
 - iv. Retire la lectura de la placa de esta fase seleccionando el botón **Remove Plate Read** en la parte inferior izquierda.
 - f. **Fase 4** (fase de amplificación en 2 pasos)
 - i. Resalte el **paso 3** y vaya a la parte inferior izquierda de la ventana y seleccione **Insertar Paso** un total de 2 veces hasta llegar al paso 5 (asegúrese de que, en la parte superior izquierda de la ventana, el menú desplegable de **Insertar Paso** tiene seleccionado **Después**).
 - ii. Resalte el **paso 4** y configúrelo como se indica a continuación:
 1. Temp.: 92 °C
 2. Tiempo: 0:05
 - iii. Resalte el **paso 5** y configúrelo como se indica a continuación:
 1. Temp.: 57 °C
 2. Tiempo: 0:40
 3. Vaya a la izquierda de la pantalla y seleccione el botón **Remove Plate Read** (eliminar lectura de la placa).
 - iv. Seleccione el **paso 6**, el **paso GOTO** y cambie al estado **paso GOTO 4** y cambie las veces que debe repetirse a **9**.
 - g. **Paso 7** (fase de amplificación en 2 pasos)
 - i. Con el paso 6 resaltado, seleccione el botón **Insert Step** (insertar paso) en la parte inferior izquierda de la ventana un total de 2 veces (hasta alcanzar el paso 8).
 - ii. Resalte el **paso 7** y configúrelo como se indica a continuación:
 1. Temp.: 92 °C

2. Tiempo: 0:05
 - iii. Resalte el **paso 8** y configúrelo como se indica a continuación:
 1. Temp.: 57 °C
 2. Tiempo: 0:40
 3. A la izquierda de la ventana, seleccione el botón **Add Plate Read to Step** (añadir lectura de la placa al paso).
 4. Resalte el **paso 8** y seleccione el botón **Insert GOTO** (insertar GOTO) en la parte inferior izquierda de la ventana.
 - iv. Seleccione el **paso 9**, el **paso GOTO** y cambie al estado **paso GOTO 7** y cambie las veces que debe repetirse a **29**.
 - h. Guarde las nuevas condiciones de ciclado como protocolo para su uso futuro.
 - i. En la parte superior izquierda de la pantalla, seleccione el botón **Save** (guardar).
 - ii. Guarde en la carpeta **ExpressLoad** (carga rápida)
 - iii. **Nombre** el archivo "Lyra SARS-CoV-2"
 - iv. **Guarde como tipo** "Protocol File (*.prcl)"
 - v. Seleccione **Save** (guardar)
 - vi. Haga clic en **Ok** (aceptar) en la ventana del editor de protocolo.
6. Defina la configuración de la placa.
- a. En la ventana **Run Setup** (configuración del análisis), seleccione la pestaña **Plate** (placa).
 - b. En **Express Load** (carga rápida) en el menú desplegable, seleccione la opción **Quick Plate 96 wells All Channels.pltd**
 - c. Seleccione el botón **Edit Selected** (editar lo seleccionado) para personalizar la configuración de la placa.
 - d. En la barra de herramientas superior, seleccione **Settings** (configuración). Es preciso configurar los ajustes por defecto.
 - i. En **Plate Size (tamaño de la placa)**, seleccione **96 pocillos**
 - ii. En **Plate Type (tipo de placa)**, seleccione **BR Clear (BR transparente)**.
 - iii. En **Number Convention (convención numérica)**, seleccione **Scientific Notation (notación científica)**.
 - iv. En **Units (unidades)** seleccione **Copy Number (número de copias)**.
 - e. Deje el **Scan Mode** (modo de escaneo) configurado en **All Channels** (todos los canales) en la parte superior de la ventana.
 - f. Seleccione el botón **Select Fluorophores** (seleccionar fluoróforos) en la parte superior derecha de la ventana Plate Editor (editor de placas).
 - i. Deseleccione todos los fluoróforos predeterminados.
 - ii. Seleccione **FAM** y **Cy5**, y haga clic en Ok (aceptar).
 - g. En la ventana **Plate Editor** (editor de placas), resalte la opción de placa completa y marque la casilla delante de todos los fluoróforos: **FAM** y **Cy5**
 - h. Seleccione el botón **Experiment Settings**(configuración del experimento) para definir las dianas.
 - i. En la parte inferior izquierda de la ventana **Experiment Settings** (configuración del experimento), en el recuadro **New** (nuevo), introduzca **SARS-CoV-2** y seleccione **Add** (añadir).
 - ii. Repita este proceso para el PRC.
 - iii. Seleccione **Ok** (aceptar)
 - i. En la ventana **Plate Editor** (editor de placas), junto a **FAM** en el menú desplegable bajo **Target Name** (nombre de la diana), seleccione **SARS-CoV-2** y para Cy5, seleccione **PRC**.
 - j. Guarde la nueva configuración de la placa para su uso futuro.
 - i. En la parte superior izquierda de la pantalla, seleccione el botón **Save** (guardar).
 - ii. Guarde en la carpeta **ExpressLoad** (carga rápida)
 - iii. **Nombre** el archivo "Lyra SARS-CoV-2 plate"
 - iv. **Guarde como tipo** "Plate File (*.pltd)"
 - v. Seleccione **Save** (guardar)
 - vi. Haga clic en **Ok** (aceptar) en la ventana **Plate Editor** (editor de placas).
 - k. Salga del software.

Procedimiento de prueba del termociclador Bio-Rad CFX96 Touch

Instrucciones de análisis:

1. Abra el archivo de análisis que necesite analizarse.
2. En la parte superior izquierda, seleccione **Quantification Tab** (pestaña de cuantificación).

3. En la curva de amplificación, marque la casilla delante de **Log Scale** (escala logarítmica).
4. Seleccione **Settings** (configuración) en la barra de herramientas de la parte superior izquierda de la pantalla.
 - a. Para el **Cq Determination Mode** (modo de determinación de Cq), seleccione **Single Threshold** (umbral único).
 - b. En **Baseline Setting** (configuración de punto de referencia), elija **Baseline Subtracted Curve Fit** (ajuste de la curva con sustracción de punto de referencia).
 - c. Para **Analysis Mode** (modo de análisis), seleccione **Target** (diana).
 - d. En **Cycles to Analyze** (ciclos para análisis), seleccione 1-30 y, a continuación, haga clic en **Ok** (aceptar)
 - e. Es preciso configurar los ciclos y el umbral del punto de referencia para cada diana.
 - i. Asegúrese de que en el diagrama de amplificación solo esté seleccionada la **casilla de SARS-CoV-2 box**.
 - ii. Vaya a **Settings**(configuración) en la barra de herramientas y seleccione **Baseline Threshold** (umbral de punto de referencia).
 1. En la parte superior de la casilla, seleccione **Auto Calculated** (cálculo automático) para los **Baseline Cycles** (ciclos de punto de referencia).
 2. Para el **Single Threshold** (umbral único) en la parte inferior del cuadro, seleccione **User Defined** (definido por el usuario)
 - a. Ajústelo a **164**
 - b. Seleccione Ok (aceptar)
 - iii. **Desmarque** la casilla **SARS-CoV-2 box** y **marque** la casilla **PRC** en el diagrama de amplificación
 - iv. Vaya a **Settings**(configuración) en la barra de herramientas y seleccione **Baseline Threshold** (umbral de punto de referencia).
 1. En la parte superior de la casilla, seleccione **Auto Calculated** (cálculo automático) para los **Baseline Cycles** (ciclos de punto de referencia).
 2. Para el **Single Threshold** (umbral único) en la parte inferior de la casilla, seleccione **User Defined** (definido por el usuario).
 - a. Ajuste esto a **100**
 - b. Seleccione Ok (aceptar)
5. Salga del software.
6. Interpretación de los resultados (véase la Tabla 4)

Instrucciones de programación de Qiagen Rotor-Gene Q

Consulte la parte número 1065453EN del Manual del usuario para obtener más información.

Instrucciones de programación:

1. Inicie el paquete de software de Rotor-Gene Q.
2. En la ventana emergente **New Run** (nuevo análisis), seleccione la pestaña **Advanced** (avanzado) en la parte superior de la pantalla.
3. Seleccione **Empty Run** (análisis vacío) y, a continuación, **New** (nuevo) en la parte inferior derecha de la ventana emergente para iniciar el **Advanced Run Wizard** (asistente de análisis avanzado).
 - a. Seleccione el tamaño de rotor adecuado en **Advanced Run Wizard** (asistente de análisis avanzado), en la parte superior izquierda de la pantalla.
 - b. Haga clic en la casilla que indica **Locking Ring is Attached** (anillo de bloqueo colocado) y seleccione **Next** (siguiente).
 - c. Deje vacías las secciones **Operator** (operador) y **Notes** (notas).
 - d. Introduzca **20 ul** como **Reaction Volume** (volumen de reacción) en la parte inferior izquierda de la pantalla.
 - e. Para el **Sample Layout** (diseño de la muestra), seleccione **1, 2, 3...** y, a continuación, seleccione **Next** (siguiente).
 - f. En **Channel Setup** (configuración del canal), seleccione **Create New** (crear nuevo) para introducir información para cada detector.
 - i. En **Name** (nombre), introduzca **SARS-CoV-2**.
 - ii. En **Source (fuente)** seleccione 470 nm.
 - iii. En **Detector (detector)** seleccione 510 nm.
 - iv. **No** ajuste la configuración **Gain** (ganancia) predeterminada de 7, ya que se configurará en un paso posterior.
 - v. Seleccione **Ok** (aceptar)

- g. Repita el paso anterior seleccionando **Create New** (crear nuevo).
 - i. En **Name** (nombre), introduzca **PRC**.
 - ii. En **Source (fuente)** seleccione 625 nm.
 - iii. En **Detector (detector)** seleccione 660 nm.
 - iv. No ajuste la configuración **Gain** (ganancia) predeterminada de 7, ya que se configurará en un paso posterior.
 - v. Seleccione **Ok** (aceptar)
- h. Para configurar un perfil de ciclado, seleccione el botón **Edit Profile** en la mitad de la ventana.
 - i. En la ventana **Edit Profile** (editar perfil), vaya a la parte superior izquierda de la pantalla a **Newy** seleccione **Cycling**(ciclado) en el menú desplegable. Deberá aparecer una fase de espera y de ciclado de tres pasos.
 - ii. Modifique la fase de espera para tener una temperatura de **55 °C** y una duración de **5:00 minutos**.
 - iii. Seleccione el botón **Insert After** (insertar después) en la mitad de la ventana emergente y, a continuación, seleccione **New Hold at Temperature**(nueva espera en temperatura).
 - iv. Modifique la segunda fase de espera para tener una temperatura de **60 °C** y una duración de **5:00 minutos**.
 - v. Seleccione el botón **Insert After** (insertar después) en la mitad de la ventana emergente y, a continuación, seleccione **New Hold at Temperature** (nueva espera en temperatura) para insertar una tercera fase de espera.
 - vi. Modifique la tercera fase de espera para tener una temperatura de **65 °C** y una duración de **5:00 minutos**.
 - vii. Resalte la siguiente **fase de ciclado** y modifíquela de la siguiente manera:
 - 1. Este ciclo se repite **10** veces.
 - 2. Seleccione **Timed Step** (paso cronometrado) en el menú desplegable en la mitad izquierda de la pantalla.
 - 3. No seleccione **Long Range** (intervalo largo) ni **Touchdown** (con temperatura decreciente) en la parte izquierda de la pantalla.
 - 4. El primer paso:
 - a. **92 °C**
 - b. **5 segundos**
 - c. **No se adquiere**
 - 5. Seleccione el paso dos y configúrelo de la siguiente manera:
 - a. **57 °C**
 - b. **40 segundos**
 - c. **No se adquiere**
 - 6. Resalte el paso tres y elimínelo seleccionando el botón “-“ en la mitad de la ventana.
 - 7. Seleccione el botón **Insert After** (insertar después) en la mitad de la ventana emergente y, a continuación, seleccione **New Cycling** (nuevo ciclado).
 - viii. Resalte la segunda **fase de ciclado** y modifíquela de la siguiente manera:
 - 1. Este ciclo se repite **30** veces
 - 2. Seleccione **Timed Step** (paso cronometrado) en el menú desplegable en la mitad izquierda de la pantalla.
 - 3. No seleccione **Long Range** (intervalo largo) ni **Touchdown** (con temperatura decreciente) en la parte izquierda de la pantalla.
 - 4. El primer paso:
 - a. **92 °C**
 - b. **5 segundos**
 - c. **No se adquiere**
 - 5. Seleccione el paso dos y configúrelo de la siguiente manera:
 - a. **57 °C**
 - b. **40 segundos**
 - c. Seleccione **Acquiring to Cycling A** (adquisición para el ciclado A).
 - i. En **Acquiring Channels** (canales de adquisición), resalte el nombre de canal por defecto (Verde) y seleccione el botón < para desplazarse a la lista de **Available Channels** (canales disponibles).

- ii. En la lista de **Available Channels** (canales disponibles), seleccione **SARS-CoV-2** y seleccione el botón > para desplazarlo a la lista de **Acquiring Channels** (canales de adquisición).
 - iii. Repita el paso anterior para el **PRC** y, a continuación, seleccione **OK** (aceptar).
 - 6. Resalte el paso tres y elimínelo seleccionando el botón “-“ en la mitad de la ventana.
 - ix. En la ventana **Edit Profile** (editar perfil), seleccione **OK** (aceptar).
 - i. En la ventana **New Run Wizard** (nuevo asistente de análisis), seleccione **Gain Optimisation** (optimización de la ganancia).
 - i. En la mitad de la ventana **Auto-Gain Optimisation Setup** (configuración de optimización de ganancia automática), seleccione el menú desplegable en **Channel Settings** (configuración de canales) y seleccione **SARS-CoV-2**.
 - ii. Seleccione el botón **Add** (añadir) a la derecha.
 - 1. En la ventana **Auto-Gain Optimisation Channel Settings** (configuración de canales de optimización de la ganancia automática), asegúrese de que la **posición del tubo** de SARS-CoV-2 esté establecida en **1**. Esto requiere analizar un control positivo, con SARS-CoV-2 y PRC, en cada análisis de PCR y su colocación en el primer tubo. Si no se hace, puede provocar un ajuste incorrecto de la ganancia.
 - 2. Deje los valores de **Target Sample Range** (intervalo de la muestra diana) y **Acceptable Gain Range** (intervalo de ganancia aceptable) en los predeterminados, 5-10FI y de -10 a 10, respectivamente.
 - 3. Seleccione **Ok** (aceptar)
 - 4. Repita los pasos 3. j. ii. 1-3. para el **PRC**
 - iii. En la ventana **Auto-Gain Optimisation Setup** (configuración de la optimización de ganancia automática) marque la casilla junto a **Perform Optimisation Before 1st Acquisition (realizar optimización antes de la primera adquisición)**.
 - iv. Seleccione **Close** (cerrar)
 - j. En la ventana **New Run Wizard** (nuevo asistente de análisis), seleccione el botón **Next** (siguiente).
 - k. Guarde el nuevo protocolo como una plantilla para su uso futuro.
 - i. En la parte inferior derecha de la ventana, seleccione **Save Template** (guardar plantilla).
 - ii. **Guardar en:** C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates
 - iii. **Nombre del archivo:** “Lyra SARS-CoV-2”
 - iv. **Guardar como tipo:** “Template (*.ret)”
 - l. Salga del software.

Análisis de prueba de Qiagen Rotor-Gene Q

Instrucciones de análisis:

1. En el New Run Wizard (nuevo asistente de análisis), cargue la plantilla SARS-CoV-2.
2. Pulse Start (inicio).
3. Abra el archivo de análisis que necesite analizarse.
4. En la barra de herramientas del menú superior, seleccione el **Analysis** (análisis)
 - a. Seleccione **Quantitation** (cuantificación) y, a continuación, **Cycling A. SARS-CoV-2** (ciclado A.SARS-CoV-2) y **Show** (mostrar).
 - b. Debe ajustarse el umbral para SARS-CoV-2.
 - i. En el botón más a la derecha de la pantalla en **CT Calculation** (cálculo de CT), introduzca **0,03** como **SARS-CoV-2 Threshold** (umbral de SARS-CoV-2).
 - ii. En el recuadro **Eliminate Cycles before** (eliminar ciclos antes de), asegúrese de introducir el valor por defecto de **1**.
 - iii. Asegúrese de que el gráfico de amplificación esté ajustado en **Log Scale** (escala logarítmica) (el botón de conmutación de la parte inferior izquierda del gráfico indica Linear Scale [escala lineal] o Log Scale [escala logarítmica]).
 - c. Seleccione **Quantitation** (cuantificación) y, a continuación, **Cycling A. PRC** (ciclado A. PRC) y **Show** (mostrar).
 - d. Debe ajustarse el umbral para PRC
 - i. En el botón más a la derecha de la pantalla en **CT Calculation** (cálculo de CT), introduzca **0,05** como **PRC Threshold** (umbral de PRC).

- ii. En el recuadro **Eliminate Cycles before** (eliminar ciclos antes de), asegúrese de introducir el valor por defecto de **1**.
 - iii. Asegúrese de que el gráfico de amplificación esté ajustado en **Log Scale** (escala logarítmica) (el botón de conmutación de la parte inferior izquierda del gráfico indica Linear Scale [escala lineal] o Log Scale [escala logarítmica]).
5. Interpretación de los resultados (véase la Tabla 4)

Instrucciones de programación de Roche LightCycler 480 Instrument II

Consulte la parte número 05152062001 0208 del Manual del usuario para obtener más información.

Creación de una plantilla de análisis de LightCycler 480 II Assay

1. Inicie el paquete de software LightCycler 480
2. El **Detection Format** (formato de detección) debe establecerse para especificar los canales en los que se leerá la fluorescencia.
 - a. Seleccione **Tools** (herramientas) en la pantalla de inicio en la parte inferior derecha de la pantalla.
 - b. Seleccione **Detection Formats** (formatos de detección) y, a continuación, elija **New** (nuevo).
 - c. Nombre el formato Lyra SARS-CoV-2
 - d. En la ventana **Filter Combination Selection** (selección de combinación de filtros) seleccione 465-510 y 618-660.
 - e. En la ventana **Selected Filter Combination List** (lista de combinación de filtros seleccionados), en el nombre, introduzca SARS-CoV-2 para 465-510 y PRC para 618-660.
 - f. Deje todos los valores de configuración por defecto en 1 en Melt Factor (factor de fusión), Quant Factor (factor de cuantificación) y Max Integration Time (tiempo de integración máximo).
 - g. Seleccione **Close** (cerrar) para guardar un nuevo formato de detección y vuelva a la pantalla de arranque.
 - h. Para acceder a este **Detection Format** (formato de detección) recientemente creado, el software LightCycler 480 debe cerrarse y, luego, volver a cargarse.
3. Después de cerrar y recargar el software, seleccione **White Plates** (placas blancas) y **New Experiment** (nuevo experimento) en la ventana Experiment Creation (creación de experimentos).
4. En la siguiente pantalla seleccione "Lyra SARS-CoV-2" en el menú desplegable en **Detection Formats** (formatos de detección).
5. Introduzca **20 ul** como **Reaction Volume** (volumen de reacción) en la parte superior derecha de la pantalla.
6. Introduzca los nombres para cada uno de los programas de RT-PCR.
 - a. En **Program Name** (nombre de programa) introduzca **Stage 1** (fase 1); en **Cycles** (ciclos), introduzca **1** y en **Analysis Mode** (modo de análisis), seleccione **none** (ninguno).
 - b. Seleccione el icono "+" para añadir un programa.
 - c. Nombre el siguiente programa **Stage 2** (fase 2), en **Cycles** (ciclos) introduzca **1** y en **Analysis Mode** (modo de análisis), seleccione **none** (ninguno).
 - d. Seleccione el icono "+" para añadir un programa.
 - e. Nombre el siguiente programa **Stage 3** (fase 3); en **Cycles** (ciclos) introduzca **1** y en **Analysis Mode** (modo de análisis), seleccione **none** (ninguno).
 - f. Seleccione el icono "+" para añadir un programa.
 - g. Nombre el siguiente programa **Stage 4** (fase 4); en **Cycles** (ciclos) introduzca **40** y en **Analysis Mode** (modo de análisis), seleccione **none** (ninguno).
7. Configure los tiempos de ciclo de RT-PCR y la temperatura.
 - a. Resalte **Stage 1** (fase 1) en **Program Name** (nombre de programa) y cambie **Stage 1 Temperature Targets** (objetivos de temperatura para la fase 1) de la siguiente manera:
 - i. **Objetivo (°C)** ajustado a **55**
 - ii. **En Acquisition Mode** (modo de adquisición), seleccione **none** (ninguno)
 - iii. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **5:00**.
 - iv. **Ajuste Ramp Rate (tasa de rampa) (°C/s)** a **4,4**.
 - v. **Para las fases 1-4, Sec Target (sec. diana) (°C), Step Size (tamaño del paso) (°C) y Step Delay (retraso del paso) (ciclos)** se dejarán en **0**.
 - b. Resalte **Stage 2** (fase 2) en **Program Name** (nombre de programa) y cambie **Stage 2 Temperature Targets** (objetivos de temperatura para la fase 2) de la siguiente manera:
 - i. **Objetivo (°C)** ajustado a **60**
 - ii. **En Acquisition Mode (modo de adquisición)** seleccione **none** (ninguno)
 - iii. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **5:00**.

- iv. **Ajuste Ramp Rate (tasa de rampa) (°C/s)** a 4,4.
- c. Resalte **Stage 3** (fase 3) en **Program Name** (nombre de programa) y cambie **Stage 3 Temperature Targets** (objetivos de temperatura para la fase 3) de la siguiente manera:
 - i. **Objetivo (°C)** ajustado a 65
 - ii. **En Acquisition Mode (modo de adquisición)** seleccione **none (ninguno)**
 - iii. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **5:00**.
 - iv. **Ajuste Ramp Rate (tasa de rampa) (°C/s)** a 4,4.
- d. Resalte **Stage 4** (fase 4) en **Program Name** (nombre de programa) y cambie **Stage 4 Temperature Targets** (objetivos de temperatura para la fase 4) de la siguiente manera:
 - i. El primer paso:
 1. **Objetivo (°C)** ajustado a 92
 2. **En Acquisition Mode (modo de adquisición)** seleccione **none (ninguno)**
 3. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **0:05**.
 4. **Ajuste Ramp Rate (tasa de rampa) (°C/s)** a 4,4.
 - ii. Seleccione el icono "+" para añadir un paso y establezca el segundo paso:
 1. **Objetivo (°C)** ajustado a 57
 2. **En Acquisition Mode (modo de adquisición)** seleccione **none (ninguno)**
 3. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **0:40**.
 4. **Ajuste Ramp Rate (tasa de rampa) (°C/s)** a 2,2.
8. Guarde el nuevo protocolo como una plantilla de análisis para su uso futuro.
 - a. En la esquina inferior izquierda de la pantalla seleccione el menú desplegable junto al botón **Apply Template** (aplicar plantilla).
 - b. Elija **Save as Template** (guardar como plantilla).
 - c. Seleccione **Templates Folder** (carpeta de plantillas).
 - d. Resalte la **Run Templates Folder** (carpeta de plantillas de análisis).
 - e. Nombre la plantilla "Lyra SARS-CoV-2 run template" y haga clic en el botón "Check" (comprobar).
9. Salga del software.

Creación de un procedimiento de análisis en LightCycler 480 II Assay

1. Cargue la plantilla de análisis Lyra SARS-CoV-2.
2. Pulse Start (inicio).
3. La plantilla de análisis solo puede establecerse después de haber realizado el experimento inicial.
4. En el análisis de Lyra SARS-CoV-2 seleccione el botón **Analysis** (análisis) en la barra del módulo.
 - a. Seleccione **Abs Quant/Fit Points** (cuantificación Abs/puntos de ajuste).
 - b. En la ventana emergente **Create New Analysis** (crear nuevo análisis), seleccione su subgrupo predefinido en el menú desplegable **subset** (subgrupo) y, a continuación, seleccione el botón "check" (comprobar).
 - c. Ajuste **Background** (fondo) a 2-10 para todos los analitos.
 - i. Ajuste **Min Offset** (compensación mínima) a 1.
 - ii. Ajuste **Max Offset** (compensación máxima) a 9.
 - d. En el botón central de la pantalla asegúrese de que **Color Compensation** (compensación de color) esté apagada para todos los analitos.
 - e. Deje la configuración por defecto como **First Cycle** (primer ciclo) 1 y **Last Cycle** (último ciclo) 40.
5. En la parte superior central de la pantalla seleccione **Noise Band** (banda de ruido).
6. Seleccione el menú desplegable junto al botón **Noise Band** (banda de ruido) y seleccione **Noise Band Fluorescence** (fluorescencia de la banda de ruido).
7. Para cada analito en el botón **Filter Comb** (combinación de filtros), ajuste la banda de ruido de la siguiente manera:
 - a. SARS-CoV-2 a 1,95.
 - b. PRC a 1,4619.
8. Seleccione **Calculate** (calcular) en la parte inferior izquierda de la pantalla.
9. Guarde el nuevo protocolo de análisis como una plantilla para su uso futuro.
 - a. En la esquina inferior izquierda de la pantalla, seleccione el menú desplegable junto al botón **Apply Template** (aplicar plantilla).
 - b. Elija **Save as Template** (guardar como plantilla).
 - c. Seleccione **Templates Folder** (carpeta de plantillas).
 - d. Resalte la **Analysis Templates Folder** (carpeta de plantillas de análisis).
 - e. Nombre la plantilla "Lyra SARS-CoV-2 analysis template" y haga clic en el botón "Check" (comprobar).
10. Cree un informe.

- a. Seleccione el icono **Save** (guardar) en la barra de acción global en la parte derecha de la pantalla.
 - b. Elija el botón **Report** (informe) en la barra del módulo en la parte izquierda de la pantalla.
 - c. Seleccione los ajustes adecuados y pulse el botón **Generate** (generar).
11. Para aplicar una Analysis Template (plantilla de análisis) a los análisis posteriores:
- a. Una vez finalizado el análisis, seleccione el botón **Analysis** (análisis) en la barra del módulo.
 - b. Seleccione **Abs Quant/Fit Points** (cuantificación Abs/puntos de ajuste).
 - c. En la ventana emergente **Create New Analysis** (crear nuevo análisis), seleccione su subgrupo predefinido en el menú desplegable **subset** (subgrupo) y, a continuación, seleccione el botón “check” (comprobar).
 - d. Seleccione el botón **Apply Template** (aplicar plantilla) en la parte más a la izquierda de la pantalla y seleccione la plantilla de análisis Lyra SARS-CoV-2 de **Analysis Templates Folder** (carpeta de plantillas de análisis).
 - e. Seleccione Yes (Sí) en la ventana emergente.
12. Interpretación de los resultados (véase la Tabla 4)

Instrucciones de programación de Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro

Consulte la parte número 4489822, Revisión A, del Manual del usuario para obtener más información.

Instrucciones de programación:

1. Abra el software Design and Analysis
2. Seleccione la opción “SET UP PLATE” (configurar placa).
3. Desde la barra lateral de la pantalla, seleccione las siguientes propiedades para filtrar:
 - a. Instrument (instrumento): QuantStudio 7 Pro.
 - b. Block (bloque): 96 pocillos de 0,2 ml.
 - c. Run Mode (modo de análisis): Fast (rápido).
 - d. Las opciones de análisis se dejan en blanco.
4. A partir de las selecciones de la placa presentes en la pantalla, seleccione la plantilla de sistema “PCR Only” (PCR solo) y el sistema navegará automáticamente a la pestaña “Run Method” (método de análisis).
5. Run Method (método de análisis)
 - a. Modifique el volumen de reacción a 20,0 ul.
 - b. La temperatura de la cubierta calentada habilitada permanecerá a 105,0 grados C.
 - c. Desplácese por la fase de espera presente en los parámetros de ciclado y aparecerán los botones de adición/sustracción tanto en la parte superior como en la parte inferior de la primera fase.
 - d. Haga clic con el botón de adición derecho en la parte superior y aparecerá una lista de opciones de fases. Desplácese hacia abajo y seleccione Hold (espera).
 - e. Repita los pasos anteriores para que haya tres fases de espera en los parámetros de ciclado.
 - f. Desplácese por la fase de PCR y aparecerán los botones de adición/sustracción tanto en la parte superior como en la parte inferior. Haga clic con el botón de adición derecho en la parte superior y aparecerá una lista de opciones de fases. Desplácese hacia abajo y seleccione PCR.
 - g. De vuelta en la primera fase, seleccione los siguientes parámetros:
 - i. Espera de la fase 1
 1. Tasa de rampa 2,63
 2. 55 °C
 3. 5 minutos
 - ii. Espera de la fase 2
 1. Tasa de rampa 2,63
 2. 60 °C
 3. 5 minutos
 - iii. Espera de la fase 3
 1. Tasa de rampa 2,63
 2. 65 °C
 3. 5 minutos
 - iv. PCR de la fase 4
 1. Paso 1:
 - a. Tasa de rampa 2,63
 - b. 92 °C
 - c. 5 segundos
 2. Paso 2:

- a. Tasa de rampa 2,32
 - b. 57 °C
 - c. 40 segundos
 - d. Haga clic en el icono de cámara en el Paso 2. Aparecerá una ventana solicitando confirmación para desactivar la recogida de datos durante este paso. Haga clic en “Ok” (aceptar).
 - v. Situado en la parte inferior de PCR de la fase 4, cambie el número de ciclos a 10.
 - vi. PCR de la fase 5
 - 1. Paso 1:
 - a. Tasa de rampa 2,63
 - b. 92 °C
 - c. 5 segundos
 - 2. Paso 2:
 - a. Tasa de rampa 2,32
 - b. 57 °C
 - c. 40 segundos
 - d. Asegúrese de que la imagen del icono de cámara esté en negrita/activada para la recogida de datos durante los 30 ciclos de la fase 5, Paso 2.
 - vii. Situado en la parte inferior de PCR de la fase 5, cambie el número de ciclos a 30.
 - h. Desplácese hacia arriba y seleccione la pestaña “Plate Setup” (configuración de placas) cerca de la parte superior de la pantalla.
- 6. Plate Setup (configuración de placas)
 - a. Cambie la referencia pasiva a “NONE” (ninguno).
 - b. En la parte inferior derecha de la pantalla, asegúrese de que la pestaña Targets (dianas) esté seleccionada y, a continuación, resalte y pulse el botón de adición para añadir “Target 1” (diana 1). Pulse de nuevo para añadir “Target 2” (diana 2).
 - c. Haga clic en la casilla “Target 1” (diana 1) y cambie el nombre a CoV-2.
 - d. Haga clic en la casilla de indicador asociado debajo de la pestaña Reporter (indicador) y, desde el menú desplegable, elija FAM.
 - e. Haga clic en la casilla “Target 2” (diana 2) y cambie el nombre a PRC.
 - f. Haga clic en la casilla de notificador asociado debajo de la pestaña Reporter (Notificador) y, desde el menú desplegable, elija CY5.
 - g. Resalte el botón “Actions” (acciones) situado en la parte superior derecha de la pantalla y pulse el botón desplegable. En el menú desplegable, seleccione “Analysis Setting” (configuración de análisis).
 - h. En Analysis Setting (configuración de análisis) deshabilite, para todas las dianas, lo siguiente:
 - i. Use Default Column (usar columna por defecto).
 - ii. Auto Threshold Column (columna con umbral automático).
 - iii. Auto Baseline Column (columna de punto de referencia automático).
 - iv. El inicio del punto de referencia y el final del punto de referencia deben ser por defecto 3 y 15.
 - i. En “Threshold” (umbral) haga clic en la casilla asociada a la diana de CoV e introduzca 70000.
 - j. En “Threshold” (umbral) haga clic en la casilla asociada a la diana de PRC e introduzca 20000.
 - k. Haga clic en “Save” (guardar)
 - l. Navegue de nuevo al botón “Actions” (acciones), pulse el botón desplegable y seleccione “Save As” (guardar como). Esto guardará su plantilla a la localización que elija. Guarde la plantilla como “Lyra SARS Cov-2 Assay”.

Creación de un procedimiento de análisis en Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro

Nota: estas instrucciones se basan en que el usuario no tenga el instrumento de PCR en tiempo real QuantStudio 7 Pro y el software Applied Biosystems Design y Analysis 2.2 conectados. El usuario debe abrir la plantilla Lyra SARS CoV-2 creada previamente con el software y guardar cualquier plantilla de análisis de muestras de reciente creación en un USB y transferir la plantilla al instrumento.

Para obtener información sobre la conectividad relacionada con el software y el instrumento, póngase en contacto con el representante de Thermo Fisher/Applied Biosystems QuantStudio.

1. Abra la plantilla Lyra SARS CoV-2 Assay previamente generada.
2. Haga clic en la pestaña Plate Setup (configuración de placas) cerca de la parte superior de la pantalla.

3. En la parte derecha de la pantalla asegúrese de que la pestaña “Samples” (muestras) esté resaltada y pulse el botón de adición para añadir el número de muestras que se van a analizar.
4. Haga clic en la casilla “Sample 1” (muestra 1) para renombrar la muestra. Repita este paso para todas las muestras posteriores que vayan a introducirse.
5. Haga clic en el pocillo situado en el mapa de placas y, a continuación, marque la casilla junto al nombre de la muestra de la barra del lado derecho para asociar el nombre al pocillo.
 - a. El usuario también tiene la opción de resaltar la localización del pocillo en el mapa de placas y hacer clic en la casilla “Enter sample” (introducir muestra). Introduzca la ID de la muestra y pulse la pestaña para pasar al siguiente pocillo en el mapa de placas. Esto cargará automáticamente el nombre de la muestra a la barra lateral.
6. Una vez que se hayan introducido los nombres de las muestras, los pocillos pueden resaltarse haciendo clic con el botón izquierdo del ratón sobre el pocillo inicial y arrastrando el ratón por los pocillos asociados en el análisis. Las dianas se eligen a continuación haciendo clic en las casillas de comprobación junto a cada diana de la barra lateral.
7. Haga clic en el botón Actions (acciones) situado en la parte superior derecha de la pantalla y elija “Save As” (guardar como) en el menú desplegable.
 - a. Aparecerá una ventana emergente que pedirá al usuario que ponga un título al archivo de acuerdo con la información correspondiente al análisis de muestra y la localización en la que debe guardarse el archivo.
 - b. Guarde el archivo de análisis recién nombrado (.edt) en un USB insertado en el ordenador.
8. Transfiera el USB al puerto situado en la parte anterior del instrumento.
9. En las opciones de la pantalla del instrumento, pulse “Load plate file” (cargar archivo de placas). QuantStudio 7 Pro es un dispositivo con pantalla táctil.
10. En la pantalla “Run Queue” (cola de análisis), pulse “USB drive” (memoria USB) en el lado derecho. Aparecerá cualquier archivo de placas guardado en el USB.
11. Pulse el archivo de placa asociado al análisis que va a realizarse.
12. Aparecerá una nueva pantalla que solicitará la localización de los resultados una vez finalizado el análisis.
 - a. Pulse “USB drive Connected” (memoria USB conectada) si el icono no está ya resaltado y pulse “Done” (completado).
13. Centrifugue la placa de muestra de 96 pocillos para asegurarse de que todo el líquido se encuentre en la parte inferior de cada pocillo.
 - a. Asegúrese de que la centrifugadora esté correctamente equilibrada.
 - b. Retire suavemente la placa de la centrifugadora para asegurarse de que todos los líquidos se mantengan en la parte inferior de los pocillos.
14. Pulse el icono de doble flecha situado en la parte superior derecha de la pantalla en el instrumento.
 - a. El cajón del instrumento se abrirá desde la parte anterior.
15. Coloque la placa de la centrifugadora en el soporte de placas y asegúrese de la orientación correcta de la placa.
 - a. El pocillo A1 debe estar en la esquina superior izquierda.
 - b. La placa aparecerá ligeramente suspendida por encima del bloque debido a que hay dos tiras de silicona colocadas por encima y por debajo de esta placa. Es lo que cabe esperar y la tapa del instrumento apretará hacia abajo la placa una vez que se cierre el cajón.
16. Pulse “Start Run” (iniciar análisis) en la pantalla del instrumento.
 - a. Aparecerá una pantalla emergente que pedirá al usuario que confirme que se ha cargado la placa.
 - b. Si se ha cargado la placa, pulse “Start Run” (iniciar análisis) de nuevo o pulse “Open Drawer” (abrir cajón) para colocar la placa en el bloque y, a continuación, pulse “Start Run” (iniciar análisis)
17. Interpretación de los resultados (véase la Tabla 4)

REF

M120 – Kit del Lyra SARS-CoV-2 Assay

IVD



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanover,
Alemania



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

PIM120102ES00 (09/21)

GLOSARIO

REF

Número de referencia



Marca de conformidad de la CE

EC REP

Representante autorizado en la Comunidad Europea

LOT

Código del lote



Fecha de caducidad



Fabricante



Límite de temperatura



Uso previsto

Rx ONLY

Exclusivamente por prescripción facultativa



Consulte la etiqueta electrónica para ver las instrucciones de uso



Riesgos biológicos

IVD

Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



Contiene cantidad suficiente para <n> determinaciones

CONT

Contenido/Contiene

CONTROL

Control
