



Lyra[®] Direct
SARS-CoV-2 ASSAY



Per la rilevazione qualitativa dell'RNA virale del coronavirus umano SARS-CoV-2 in campioni di tampone nasale, rinofaringeo o orofaringeo diretto.

Per uso diagnostico *in vitro*.

Alla pagina quidel.com/glossary è disponibile un glossario dei simboli.

INDICE

USO PREVISTO	2
RIASSUNTO E SPIEGAZIONE	3
PRINCIPIO DELLA PROCEDURA	3
MATERIALE FORNITO	4
MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO	4
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	5
Conservazione e manipolazione dei reagenti del kit	6
Indicatori di instabilità o deterioramento dei reagenti	6
Raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni	6
Conservazione del campione trattato	6
PROCEDURA DI DOSAGGIO	6
Procedura di trattamento del campione	6
Procedura di reidratazione del Master Mix	7
Procedura di configurazione RT-PCR	7
CONTROLLO QUALITÀ	7
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEI CAMPIONI DEL PAZIENTE	8
PRESTAZIONI CLINICHE	9
Studio 1	9
Studio 2	9
PRESTAZIONI ANALITICHE	10
Limiti di rilevamento	10
Studio 1	10
Studio 2 – Studio comparativo della LoD per Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay e Lyra SARS-CoV-2 Assay	10
Risultati dello studio, conferma LoD	11
REATTIVITÀ ANALITICA (Inclusività)	12
SPECIFICITÀ ANALITICA (Reattività crociata)	12
Sostanze interferenti	14

LIMITAZIONI.....	14
ASSISTENZA TECNICA E ALLA CLIENTELA	15
PROPRIETÀ INTELLETTUALE	15
BIBLIOGRAFIA	15
APPENDICE: (programmazione e protocolli di analisi specifici di ciascun termociclatore)	16
Istruzioni per la programmazione di Applied Biosystems 7500 Fast Dx.....	16
Procedura di analisi per termociclatore Applied Biosystems 7500 Fast Dx	17
Istruzioni per la programmazione di Applied Biosystems 7500 Standard.....	18
Procedura di analisi per termociclatore Applied Biosystems 7500 Standard	20
Procedura di programmazione del termociclatore Bio-Rad CFX96 Touch.....	21
Procedura di programmazione del termociclatore Bio-Rad CFX96 Touch.....	23
Istruzioni per la programmazione di Qiagen Rotor-Gene Q.....	23
Ciclo di analisi con Qiagen Rotor-Gene Q.....	25
Istruzioni per la programmazione di Roche LightCycler 480 Instrument II	26
Creazione di un modello di ciclo del dosaggio con LightCycler 480 Instrument II	26
Creazione di una procedura di analisi del dosaggio di LightCycler 480 Instrument II	27
Istruzioni per la programmazione di Roche cobas z 480 Instrument	28
Creazione di un modello di esecuzione del dosaggio con cobas z 480	28
Creazione di una procedura di analisi del dosaggio con cobas z 480	30
Istruzioni per la programmazione di Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro	31
Creazione di una procedura di analisi con Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro	32
GLOSSARIO	35



USO PREVISTO

Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay è un dosaggio real-time RT-PCR per la rilevazione qualitativa dell'acido nucleico di SARS-CoV-2 in campioni di tamponi nasali (NS), rinofaringei (RF) o orofaringei (OF) ottenuti da pazienti che, a parere dell'operatore sanitario di riferimento, presentano una sospetta infezione da COVID-19. Il test ha come obiettivo la poliproteina non strutturale (pp1ab) del virus SARS-CoV-2.

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

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

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

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Il virus SARS-CoV-2, noto anche come COVID-19, è stato identificato per la prima volta a Wuhan, nella provincia cinese dello Hubei, nel dicembre del 2019. Si ritiene che il virus, così come i nuovi coronavirus SARS-1 e MERS, abbia avuto origine nei pipistrelli, tuttavia il SARS-CoV-2 potrebbe avere avuto ospiti intermedi come pangolini, maiali o zibetti.¹ All'inizio di aprile 2020, l'infezione nell'essere umano si era diffusa in 180 Paesi, infettando oltre 846.000 persone e uccidendone oltre 41.400.¹ In data 11 marzo, l'OMS ha dichiarato l'epidemia da SARS-CoV-2 una pandemia globale.

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

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

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

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

Etichette delle sonde di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay	
Target	Colorante
Poliproteina non strutturale (pp1ab)	FAM
Controllo di processo (PRC)	Quasar® 670 o Cy5

Di seguito è riportato un riepilogo della procedura:

- Raccolta dei campioni:** ottenere mediante tecniche standard i tamponi nasali, rinofaringei e orofaringei. Tali campioni sono trasportati, conservati e trattati secondo le seguenti istruzioni.¹
- Estrazione dell'acido nucleico:** estrarre gli acidi nucleici aggiungendo il campione di tampone a 400 µl del Process Buffer e riscaldandolo a 95 °C per 10 minuti. Il controllo di processo (PRC) si trova nel Process Buffer e serve a monitorare gli inibitori nel campione estratto, e garantisce che sia avvenuta un'amplificazione adeguata.
- Reidratazione del master mix:** reidratare il master mix liofilizzato utilizzando 135 µl di soluzione reidratante. Il master mix contiene primer oligonucleotidici, sonde etichettate con fluoroforo e quencher che hanno come target le regioni conservate di SARS-CoV-2, e una sequenza di controllo del processo. Le sonde presentano una doppia etichettatura con colorante reporter legato all'estremità 5' e un quencher legato all'estremità 3'. Il master mix reidratato è sufficiente per otto reazioni.
- Amplificazione e rilevazione dell'acido nucleico:** aggiungere 15 µl di master mix reidratato a ciascun pozzetto (Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Roche LightCycler 480 Instrument II, Roche cobas z 480, Bio-Rad CFX96 Touch, Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro) o provetta (Qiagen Rotor-Gene Q). Quindi, aggiungere 5 µl di acidi nucleici estratti (campione con PRC) al pozzetto della piastra o alla provetta. Collocare la piastra o la provetta nello strumento appropriato.

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

colorante vengono separate dai rispettivi quencher andando a intensificare ulteriormente il segnale. Se viene raggiunta una fluorescenza sufficiente, il campione viene segnalato come positivo per la sequenza target rilevata.

MATERIALE FORNITO

Cat. N. M124

kit di rilevazione (96 reazioni) – Conservare a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C		
N.	Componente	Quantità
1	Soluzione reidratante diretta Parte N. M5287	1 flacone/kit da 1,9 ml
2	Lyra SARS-CoV-2 Master Mix Parte N. M5150 Contenuto liofilizzato: enzima DNA polimerasi con attività di trascrittasi inversa coppie di primer oligonucleotidici; sonde oligonucleotidiche dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP) Stabilizzanti	12 flaconi/kit, 8 reazioni/flacone
3	Process Buffer Parte M5281	1 provetta/kit da 40 ml
CONTROL +	Controllo positivo contenente RNA di SARS-CoV-2 sintetico, Parte N. M5274	1 flacone/kit da 1,0 ml
CONTROL -	Controllo negativo Parte N. M5275	1 flacone/kit da 1,0 ml

- Istruzioni per l'uso di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

- Tamponi rinofaringei floccati per la raccolta di campioni RF
- Tampone nasale floccato o a maglia in poliestere per la raccolta di campioni NS
- Tampone regolare floccato o a maglia in poliestere per la raccolta di campioni OF
- Provetta per il trasporto del tampone
- Micropipettatori (di capacità compresa tra 1 e 10 µl e tra 100 e 1000 µl)
- Puntali non aerosol con barriera filtrante per pipette
- Applied Biosystems 7500 Fast Dx, versione software 1.4 o successiva
- Applied Biosystems Standard, versione software 2.0.6 o successiva
- Roche LightCycler 480 Instrument II, versione software 1.5.0.39 o successiva
- Roche cobas z 480 Instrument, versione software 1.5.1.62 SP2- o successiva
- Qiagen Rotor-Gene Q, versione software 2.0.2.4 o successiva
- Bio-Rad CFX96 Touch, versione software 3.1 o successiva
- Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro, versione software 2.0 o successiva
- Piastra PCR da 96 pozzetti n.:
 - ▶ Applied Biosystems 7500 Fast Dx: 4344906
 - ▶ Applied Biosystems Standard: N8010560
 - ▶ Roche LightCycler 480: 04729692001, pellicola inclusa
 - ▶ Bio-Rad CFX96 Touch: HSP9631, sigilli MSB1001
 - ▶ Thermo Fisher Quantstudio 7 Pro: 4483354
- Pellicole piastra ottica
- Qiagen 72-Well Rotor (N. cat. 9018903)
- Qiagen Locking Ring 72-Well Rotor (N. cat. 9018904)
- Qiagen Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250) (N. cat. 981103)
- Centrifuga per piastra da 96 pozzetti
- Blocco di riscaldamento a secco con capacità di riscaldamento di provette da 1,5 ml, a 95 °C ±1° per 10 minuti
- Provette per microcentrifuga da 1,5 ml
- Blocco di riscaldamento a secco con capacità per piastra di microtitolazione con pozzetti profondi a 95 °C ±1° per 10 minuti (Eppendorf ThermoMixer® C, con inserto Deep Well, numeri di parte 5382000023, 531000002)
- Piastra di microtitolazione con pozzetti profondi (Eppendorf 951033103 o simile)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

- Per uso diagnostico *in vitro*
- I risultati positivi sono indicativi della presenza dell'RNA di SARS-CoV-2.
- I laboratori degli Stati Uniti e relativi territori sono tenuti a segnalare tutti i risultati positivi alle autorità sanitarie competenti.
- Le caratteristiche prestazionali di questo test sono state stabilite esclusivamente con i tipi di campioni indicati nella **sezione Uso previsto**. Le prestazioni di questo dosaggio con altri tipi di campioni non sono state valutate.
- L'uso di campioni sui mezzi di trasporto ha un impatto negativo sulla sensibilità del dosaggio; tali campioni non dovranno essere utilizzati con il dosaggio.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Applied Biosystems 7500 Fast Dx, versione 1.4 o successiva. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Applied Biosystems 7500 Fast Dx, versione 2.0.6 o successiva. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Roche LightCycler 480 Instrument II, versione 1.5.0.39. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Roche LightCycler 480 Instrument II, versione 1.5.0.39 o successiva. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Roche cobas z 480 Instrument, versione 1.5.1.62 SP2- o successiva. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Qiagen Rotor-Gene Q, versione 2.0.2.4 o successiva. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Bio-Rad CFX96 Touch, versione 3.1 o successiva. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Il dosaggio è stato convalidato utilizzando il software Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro, versione 2.4 o successiva. Contattare l'assistenza tecnica Quidel prima di eseguire modifiche o aggiornamenti a versioni successive del software.
- Questo prodotto è destinato all'uso esclusivo da parte di personale in possesso di un'adeguata formazione sulle tecniche di PCR e RT-PCR.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infetti. Seguire le precauzioni universali quando si manipolano i campioni, questo kit e il relativo contenuto.
- Per ottenere risultati corretti è essenziale che le condizioni di raccolta, conservazione e trasporto dei campioni siano adeguate.
- Conservare i reagenti del dosaggio come indicato sulle relative etichette.
- Durante l'utilizzo del kit indossare idonei indumenti protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il volto.
- Per ottenere risultati accurati, pipettare con delicatezza utilizzando solo apparecchiature calibrate.
- Pulire e disinfettare con cura tutte le superfici con una soluzione di candeggina al 10% e poi con acqua per biologia molecolare.
- Utilizzare micropipette con barriera aerosol o con puntali a spostamento positivo per tutte le procedure.
- Evitare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti del kit. Attenersi alle buone pratiche di laboratorio.
- Non mischiare reagenti di kit con numeri di lotto diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti con questo kit.
- Non usare il prodotto dopo la data di scadenza.
- Un'adeguata pianificazione del flusso di lavoro è essenziale per ridurre al minimo il rischio di contaminazione. Programmare sempre il flusso di lavoro del laboratorio in maniera unidirezionale, iniziando dalla pre-amplificazione e procedendo con l'amplificazione e la rilevazione.

- Nelle aree di pre-amplificazione e amplificazione, utilizzare gli appositi materiali e attrezzature.
- Non consentire spostamenti crociati di personale o attrezzature tra aree diverse.
- Conservare sempre il materiale per l'amplificazione separatamente dal materiale per la pre-amplificazione.
- Non aprire le provette dei campioni né rimuovere il sigillo delle piastre dopo l'amplificazione.
- Smaltire adeguatamente il materiale amplificato secondo le leggi e le normative locali al fine di ridurre al minimo il rischio di contaminazione da ampliconi.
- Non utilizzare per il processamento dell'acido nucleico target materiali specifici per la preparazione dei reagenti o dei campioni.
- Per ulteriori informazioni su simboli di pericolo, sicurezza, manipolazione e smaltimento dei componenti di questo kit, consultare la scheda di sicurezza (SDS) reperibile sul sito web quidel.com.

CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI REAGENTI DEL KIT

- Conservare il kit sigillato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino alla data di scadenza indicata sulla confezione esterna del kit.
- Il Master Mix reidratato deve essere usato entro 2 ore dalla reidratazione, mentre il Master Mix residuo può essere conservato a -20 °C per un massimo di 24 ore.

Indicatori di instabilità o deterioramento dei reagenti

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

RACCOLTA, CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

I tamponi nasali, rinofaringei o orofaringei devono essere raccolti e collocati in una provetta di trasporto pulita e asciutta. I campioni devono essere trasportati e testati il prima possibile dopo il prelievo. I campioni rimangono stabili fino a 24 ore a temperatura ambiente o fino a 72 ore se conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C. Se non è possibile analizzare i campioni entro 72 ore dalla raccolta, è necessario congelarli ad almeno -70 °C fino al momento dell'analisi.

CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE TRATTATO

I campioni trattati nel Process Buffer possono essere conservati a una temperatura tra 2 °C e 8 °C, -20 °C o -70 °C per un massimo di 7 giorni.

PROCEDURA DI DOSAGGIO

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

Procedura di trattamento del campione

1. 25 minuti prima della fase della lisi a calore, scaldare un blocco di calore a 95 °C.
2. Aggiungere 400 µl di process buffer al numero di pozzetti richiesto (2 per i controlli e 1 per il paziente) in una piastra per microtitolazione a pozzetto profondo o in una provetta per microcentrifuga.
3. Inserire un tampone nel pozzetto o nella provetta identificativi del paziente e ruotare vigorosamente il tampone per 10 secondi per eluire il campione. Ruotare la punta del tampone contro l'interno del pozzo durante la rimozione. Smaltire il tampone usato nei rifiuti a rischio biologico.
4. Riscaldare la piastra o le provette a $95 \pm 1^\circ\text{C}$ per 10 minuti:

Nota: non sigillare o coprire la piastra durante la fase di riscaldamento.

 - a. Per la piastra a pozzetto profondo utilizzare un'impostazione di rotazione di 300 giri/min;
 - b. Per le provette, agitare per 5 secondi prima e dopo la fase di riscaldamento

Nota: iniziare la procedura di lisi di 10 minuti dopo avere collocato le provette nel blocco e avere atteso che il blocco abbia raggiunto nuovamente una temperatura di 95 °C
5. Rimuovere i campioni trattati dal blocco di riscaldamento della provetta o della piastra e lasciare raffreddare a una temperatura compresa tra quella ambiente e quella refrigerata. Questo comprende i campioni in una piastra per microtitolazione a pozzetto profondo o in una provetta per microcentrifuga. Il campione apparirà torbido.

Nota: i campioni lisati possono essere conservati a una temperatura tra 2 °C e 8 °C, -20 °C o -70 °C per un massimo di 7 giorni.

Procedura di reidratazione del Master Mix

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

Nota: il Master Mix reidratato è sufficiente per otto reazioni.

Nota: il Master Mix reidratato può essere conservato a temperatura ambiente (tra 20 °C e 25 °C) per un massimo di 2 ore.

Procedura di configurazione RT-PCR

1. Aggiungere 15 µl di master mix reidratato a ciascun pozzetto della piastra o a ciascuna provetta.
2. Per le provette per microcentrifuga, agitare ogni provetta per 10 minuti prima di aggiungerla alla piastra. Assicurarsi che tutto il precipitato sia tornato nella soluzione. Aggiungere 5 µl di campione trattato (campione con controllo di processo) al pozzetto della piastra o a ciascuna provetta PCR. Non è necessario miscelare i reagenti.

Nota: utilizzare un nuovo puntale per micropipettatore con barriera per ciascun campione estratto.

Nota: l'agitazione e il trasferimento di 5 µl della provetta devono essere eseguiti singolarmente. L'agitazione delle provette prima del trasferimento non può essere effettuata in lotti.

3. Per la piastra di microtitolazione a pozzetto profondo, pipettare ogni pozzetto su e giù per tre volte per miscelare. La pipetta deve essere impostata su 150 µl. Trasferire immediatamente 5 µl di campione trattato nella piastra o nella provetta PCR.

Nota: utilizzare un nuovo puntale per micropipettatore con barriera per ciascun campione estratto.

Nota: la miscelazione e il trasferimento di 5 µl della provetta devono essere eseguiti singolarmente. La miscelazione di tutti i pozzetti della piastra prima del trasferimento non può essere effettuata in lotti.

4. Sigillare la piastra o le provette.
5. Centrifugare la piastra per almeno 15 secondi. Verificare che tutto il liquido si trovi sul fondo dei pozzetti dei campioni e che non siano presenti bolle.

Nota: le provette utilizzate nel Qiagen Rotor-Gene Q non richiedono una fase di centrifuga prima di essere caricate nello strumento.

6. Accendere il termociclatore appropriato.
7. Inserire la piastra o le provette nell'apposito termociclatore.

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

CONTROLLO QUALITÀ

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

1. Il **controllo di processo** (PRC) consiste in un batteriofago MS2 inattivato e stabilizzato contenente il genoma dell'RNA, compreso nel Process Buffer. Il PRC consente di monitorare gli inibitori nel campione estratto e assicura che sia avvenuta un'amplificazione adeguata.
2. Il **controllo positivo** (contenente RNA di SARS-CoV-2, Parte M5274) deve essere trattato come un campione di paziente e va incluso in ogni ciclo di estrazione e di RT-PCR. Il controllo positivo può essere immerso inserendo un tampone rinofaringeo asciutto nel controllo per dieci secondi e quindi agitandolo energicamente per 10 secondi nel process buffer aliquotato, oppure è possibile trasferire 50 µl nel process buffer aliquotato.
3. Il **controllo negativo** (Parte M5275) deve essere trattato come un campione di paziente e va incluso in ogni ciclo di estrazione e di RT-PCR. Il controllo negativo può essere immerso inserendo un tampone rinofaringeo asciutto nel controllo per dieci secondi e quindi agitandolo energicamente per 10 secondi nel process buffer aliquotato, oppure è possibile trasferire 50 µl nel process buffer aliquotato.
4. Il mancato esito del **controllo positivo** o del **controllo negativo** invalida il ciclo di RT-PCR, pertanto i risultati non devono essere comunicati. Il ciclo di RT-PCR deve essere ripetuto innanzitutto con i campioni e i controlli

estratti. Eseguire nuovamente l'estrazione e rianalizzare un'altra aliquota dei controlli e dei campioni oppure ottenere nuovi campioni e ripetere l'analisi se i controlli non vanno di nuovo a buon fine.

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

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

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

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

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEI CAMPIONI DEL PAZIENTE

Interpretazione dei risultati di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay su Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Bio-Rad CFX96 Touch, Qiagen Rotor-Gene Q o Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro				
Risultato del dosaggio	Rilevatore: SARS-CoV-2	Rilevatore: controllo di processo	Interpretazione dei risultati	Note e indicazioni speciali
Negativo	Nessun Ct rilevato	5,0 ≤ Ct ≤ 30,0	Nessun RNA virale di SARS-CoV-2 rilevato; PRC rilevato.	
Positivo per SARS-CoV-2	5,0 ≤ Ct ≤ 30,0	n/p ¹	RNA virale del SARS-CoV-2 rilevato.	
Nulla	Nessun Ct rilevato	Nessun Ct rilevato	Nessun RNA virale di SARS-CoV-2 e nessun RNA del PRC rilevato.	Test non valido. Rianalizzare lo stesso campione trattato. Se il test è ancora non valido, ottenere un altro campione e rianalizzarlo.

Interpretazione dei risultati di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay su Roche LightCycler 480 e Roche cobas z 480				
Risultato del dosaggio	Rilevatore: SARS-CoV-2	Rilevatore: controllo di processo	Interpretazione dei risultati	Note e indicazioni speciali
Negativo	Nessun Ct rilevato	5,0 ≤ Ct ≤ 40,0	Nessun RNA virale di SARS-CoV-2 rilevato; PRC rilevato.	
Positivo per SARS-CoV-2	5,0 ≤ Ct ≤ 40,0	n/p ¹	RNA virale del SARS-CoV-2 rilevato.	

Interpretazione dei risultati di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay su Roche LightCycler 480 e Roche cobas z 480				
Risultato del dosaggio	Rilevatore: SARS-CoV-2	Rilevatore: controllo di processo	Interpretazione dei risultati	Note e indicazioni speciali
Nulla	Nessun Ct rilevato	Nessun Ct rilevato	Nessun RNA virale di SARS-CoV-2 e nessun RNA del PRC rilevato.	Test non valido. Rianalizzare lo stesso campione trattato. Se il test è ancora non valido, ottenere un nuovo campione e rianalizzarlo.

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

PRESTAZIONI CLINICHE

Le prestazioni cliniche di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay sono state valutate utilizzando studi su campioni positivi completamente artificiali con tamponi rinofaringei e campioni orofaringei.

Studio 1

Trenta (30) campioni positivi artificiali di RF sono stati creati mediante lo spiking di trenta (30) campioni clinici individuali risultati negativi al SARS-CoV-2 mediante Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. I campioni spiked sono stati aggiunti ai tamponi (circa 50 µl) e quindi trattati e testati secondo il foglietto illustrativo di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Venti (20) campioni sono stati sottoposti a spiking con 1x LoD (3,40e+4 cp/ml) di virus. Dieci (10) campioni addizionali sono stati sottoposti a spiking con 5x LoD (1,7E+5 cp/ml) di virus.

Ventinueve (29) campioni artificiali su trenta (30) sono risultati positivi con Lyra SARS-CoV-2 Assay. I risultati relativi ai campioni artificiali positivi sono riportati nella tabella seguente:

Valutazione clinica dei campioni spiked di tamponi rinofaringei			
Concentrazione di RNA nel campione	N. positivi/n. analizzati	Ct SARS-CoV-2 medio	% CV
non spiked	0/30	n/p	n/p
1x LoD	19/20	27,06	6,6
5 x LoD	10/10	23,51	4,7

Le prestazioni rispetto ai risultati attesi sono le seguenti:

Percentuale di concordanza positiva 29/30 = 97% (95% CI: 83,3%-99,4%)
 Percentuale di concordanza negativa 30/30 = 100% (IC al 95%: 88,6%-100%)

Studio 2

Quindici (15) campioni positivi artificiali di OF sono stati creati mediante lo spiking di quindici (15) campioni clinici individuali risultati negativi al SARS-CoV-2 mediante Lyra SARS-CoV-2 Assay. I campioni spiked sono stati aggiunti ai tamponi (circa 50 µl) e quindi trattati e testati secondo il foglietto illustrativo di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Sette (7) campioni sono stati sottoposti a spiking con 1x LoD (3,40e+4 cp/ml), quattro (4) campioni sono stati sottoposti a spiking con 10x LoD (3,4e+5cp/ml), e quattro (4) campioni sono stati sottoposti a spiking con 100x LoD (3,4e+6cp/ml) di virus.. Otto (8) campioni aggiuntivi negativi di OF, mediante Lyra SARS-CoV-2 Assay, sono stati testati secondo il foglietto illustrativo di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.

Tutti i quindici (15) campioni artificiali sono risultati positivi con Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. I risultati relativi ai campioni OF sono riportati nella tabella seguente:

Valutazione clinica dei campioni spiked di tamponi OF			
Concentrazione di RNA nel campione	N. positivi/n. analizzati	Ct SARS-CoV-2 medio	% CV
non spiked	0/8	n/p	n/p
1x LoD	7/7	23,2	5,1
10x LoD	4/4	20,1	0,6
100x LoD	4/4	17,1	0,5

Le prestazioni rispetto ai risultati attesi sono le seguenti:

Percentuale di concordanza positiva 15/15 = 100% (IC al 95%: 79,6%-100%)

Percentuale di concordanza negativa 8/8 = 100% (IC al 95%: 67,6%-100%)

PRESTAZIONI ANALITICHE

Limiti di rilevamento

Studio 1

Il limite di rivelabilità (LoD) in Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay ha utilizzato diluizioni limitanti di Coronavirus 2 correlato alla SARS (SARS-CoV-2) sottoposto a radiazioni gamma sottoposto a spiking nella matrice rinofaringea negativa del tampone. Ciascuna diluizione è stata aggiunta ai campioni (circa 50 µl), e quindi trattata e analizzata su Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Roche LightCycler 480, Roche cobas z 480, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96 Touch, o Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro. La sensibilità analitica (LoD) è definita come la concentrazione minima a cui almeno il 95% di tutti i duplicati risulta positivo.

Questo studio ha consentito di determinare il LoD per Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay come indicato qui sotto, in seguito confermato analizzando 20 duplicati.

La conferma dei risultati della LoD è stata eseguita su Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Roche LightCycler 480 e cobas z 480, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96 Touch o Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro.							
Termociclatori	Tamponi RF - 7500 Fast Dx	Tamponi RF - 7500 Standard	Tamponi RF - LightCycler 480 ²	Tamponi RF - cobas z 480 ²	Tamponi RF - CFX96 Touch	Tamponi RF - Rotor-Gene Q	Tamponi RF - QuantStudio 7 Pro
Concentrazione ¹	3,40E+04	3,40E+04	3,40E+04	3,40E+04	3,40E+04	3,40E+04	6,80E+04
COVID-19							
AVE globale	25,85	28,48	33,87	33,55	25,10	26,89	26,47
STDEV globale	1,25	0,95	1,55	1,19	1,06	1,24	0,77
% CV generale	4,8%	3,3%	4,6%	3,6%	4,2%	4,6%	2,9%
Rilevamento	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
PRC							
AVE globale	21,69	20,03	21,96	23,98	17,85	19,79	23,20
STDEV globale	0,68	0,20	1,13	1,07	1,29	0,33	0,75
% CV generale	3,1%	1,0%	5,1%	4,5%	7,2%	1,6%	3,2%
Rilevamento	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20

¹ La concentrazione è presentata in copie/ml di RNA

² I risultati includono 10 cicli non rilevati dagli altri strumenti

Studio 2 – Studio comparativo della LoD per Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay e Lyra SARS-CoV-2 Assay

È stato eseguito un secondo studio LoD per confrontare il limite di rivelabilità (LoD) di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay e Lyra SARS-CoV-2 Assay sull'ABI 7500 Fast Dx utilizzando diluizioni limitanti del virus SARS-CoV-2 sottoposto a raggi gamma. In questo studio è stata inoculata una concentrazione di 1x LoD (basata su test preliminari) del virus in matrice negativa RF su tampone RF. Venti (20) repliche dei tamponi inoculati sono state testate direttamente in base al PI per Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay o sono state aggiunte a 3,0 ml di UTM per il test di Lyra SARS-CoV-2 Assay (quaranta duplicati totali del tampone). Il test è stato eseguito utilizzando ABI 7500 Fast Dx.

Risultati dello studio, conferma LoD

Dosaggio estratto da Lyra	1,28E+04 cp/ml	
Duplicato	SARS-CoV-2	PRC
1	26,03	18,62
2	24,02	18,41
3	23,58	18,59
4	24,00	18,48
5	23,70	18,63
6	25,27	18,71
7	24,70	19,13
8	24,42	19,19
9	23,99	19,26
10	26,63	19,21
11	25,29	19,65
12	24,73	19,84
13	25,28	19,56
14	25,01	19,56
15	25,66	19,44
16	26,34	19,57
17	26,23	19,29
18	24,12	19,43
19	25,30	19,24
20	24,40	19,47
% rilevata	100%	100%
Media di Pos	24,93	19,16
STDEV di Pos	0,92	0,44
% CV	3,7%	2,3%

Lyra Direct Assay	1,28E+04 cp/ml	
Duplicato	SARS-CoV-2	PRC
1	24,93	18,37
2	24,02	17,71
3	27,80	18,21
4	24,62	17,75
5	24,75	18,07
6	23,67	18,03
7	23,32	17,83
8	22,53	17,64
9	24,15	17,91
10	22,93	18,47
11	24,07	17,59
12	24,38	18,45
13	25,80	18,01
14	24,99	17,87
15	23,11	17,67
16	24,52	18,42

Lyra Direct Assay	1,28E+04 cp/ml	
Duplicato	SARS-CoV-2	PRC
17	24,72	18,35
18	24,26	18,30
19	24,70	18,45
20	26,59	18,31
% rilevata:	100%	100%
Media di Pos	24,49	18,07
STDEV di Pos	1,23	0,31
% CV	5,0%	1,7%

Sulla base di questo progetto di studio, la LoD per le 2 versioni di Lyra Assay (Lyra SARS-CoV-2 Assay e Lyra Direct SARS-CoV-2) ha un valore LoD di ingresso di $1,28 \times 10^4$ equivalenti genomici/ml. Da notare che il LoD pubblicato per Lyra SARS-CoV-2 Assay ($8,00E-01$ copie di RNA genomico/ μ l) è accurato. La concentrazione finale del virus testato nel dosaggio, dopo la diluizione in 3,0 ml di UTM e la concentrazione durante il processo di estrazione, è di circa 800 cp/ml.

REATTIVITÀ ANALITICA (INCLUSIVITÀ)

L'inclusività di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay è stata stabilita testando il coronavirus 2 correlato a SARS (SARS-CoV-2) sottoposto a raggi gamma, isolato USA-WA1/2020 e mediante analisi *in silico*. L'analisi *in silico* ha dimostrato che i primer di Lyra Direct SARS-CoV-2 sono conservati con una percentuale >95% in 998 sequenze e 11.708 sequenze di SARS-CoV-2 disponibili presso l'NCBI (National Center for Biotechnology Information, Centro nazionale per le informazioni sulle biotecnologie) e la GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data, Iniziativa globale sulla condivisione di tutti i dati sull'influenza) alla data del 24 aprile 2020.

SPECIFICITÀ ANALITICA (REATTIVITÀ CROCIATA)

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

Risultati del test di reattività crociata				
Virus/batterio/parassita	Ceppo	Origine/tipo di campione	Concentrazione	Risultati
Adenovirus	Tipo 1	Isolato	$1 \times 10^{7,53}$ U/ml	Neg, Neg, Neg
Coronavirus	229e	Isolato	$1 \times 10^{6,10}$ U/ml	Neg, Neg, Neg
Coronavirus	OC43	Isolato	$9,55 \times 10^6$ TCID ₅₀ /ml	Neg, Neg, Neg
Coronavirus	NL63	Isolato	$1 \times 10^{4,67}$ U/ml	Neg, Neg, Neg
MERS-CoV (inattivato mediante calore)	Florida/USA-2_Saudia Arabia_2014	Isolato	$4,17 \times 10^5$ TCID ₅₀ /ml	Neg, Neg, Neg
SARS-1	2003-00592	Virus inattivato	Non disponibile	Neg, Neg, Neg
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129	Isolato	3×10^7 CCU/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Z018	Isolato	$3,8 \times 10^9$ cfu/ml	Neg, Neg, Neg
Influenza A H3N2	Brisbane/10/07	Isolato	$1 \times 10^{5,07}$ U/ml	Neg, Neg, Neg
Influenza A H1N1	Nuova Caledonia/20/99	Isolato	$1 \times 10^{6,66}$ U/ml	Neg, Neg, Neg
Influenza B	Brisbane/33/08	Isolato	$1 \times 10^{5,15}$ U/ml	Neg, Neg, Neg
Parainfluenza	Tipo 1	Isolato	$1 \times 10^{8,01}$ U/ml	Neg, Neg, Neg
Parainfluenza	Tipo 2	Isolato	$1 \times 10^{6,34}$ U/ml	Neg, Neg, Neg
Parainfluenza	Tipo 3	Isolato	$8,51 \times 10^7$ TCID ₅₀ /ml	Neg, Neg, Neg
Parainfluenza	Tipo 4b	Isolato	$1 \times 10^{7,53}$ U/ml	Neg, Neg, Neg
Enterovirus	Tipo 68	Isolato	$1 \times 10^{6,5}$ U/ml	Neg, Neg, Neg

Risultati del test di reattività crociata				
Virus/batterio/parassita	Ceppo	Origine/tipo di campione	Concentrazione	Risultati
Metapneumovirus umano	A1 (IA10-s003)	Isolato	1 x 10 ^{5,55} U/ml	Neg, Neg, Neg
Virus sinciziale respiratorio	Tipo A (3/2015 isolato n. 3)	Isolato	1 x 10 ^{5,62} U/ml	Neg, Neg, Neg
Rhinovirus umano	n/d	Virus inattivato	Non disponibile	Neg, Neg, Neg
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	AR-39	Isolato	2,9 x 10 ⁷ IFU/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Haemophilus influenzae</i>	Tipo b; Eagan	Isolato	7,87 x 10 ⁸ cfu/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Legionella pneumophila</i>	Philadelphia	Isolato	6,82 x 10 ⁹ cfu/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Z022; 19f	Isolato	2,26 x 10 ⁹ cfu/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Bordetella pertussis</i>		Isolato		Neg, Neg, Neg
<i>Pneumocystis jirovecii</i> - <i>S. cerevisiae</i> ricombinante	W303-Pji	Isolato	1,56 x 10 ⁸ cfu/ml	Neg, Neg, Neg

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

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

Organismi con reattività crociata			
Organismo	N. totale di sequenze	N. di genomi completi	N. di ceppi WGS

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

^B Per BLAST, "Max Target Seqs" (Max sequenze target) è stato impostato su 5000.

^C Sono state incluse anche 4 sequenze codificanti della poliproteina.

L'analisi *in silico* ha dimostrato un'omologia <80% tra tutti gli organismi tranne i seguenti: tre (3) sequenze di Enterovirus sono risultate conservate all'80,9% nel primer inverso; tuttavia, il primer diretto è conservato solo al 76% e l'allineamento delle sonde ha evidenziato un'omologia complessiva del 56%. Le sequenze di SARS-1 sono conservate all'≥80% in entrambi i primer, ma l'ultima base delle estremità 3' di entrambi i primer non è conservata. L'analisi WET dell'unico ceppo di SARS-1 disponibile utilizzando Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay ha evidenziato un risultato non rilevabile.

SOSTANZE INTERFERENTI

È stato condotto uno studio per dimostrare che le sostanze potenzialmente interferenti che possono essere presenti nel tratto respiratorio superiore non reagiscono in modo incrociato e non interferiscono con il rilevamento dell'RNA di SARS-CoV-2 in Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.

Quattordici (14) sostanze potenzialmente interferenti nella concentrazione indicata di seguito sono state testate in assenza o presenza di SARS-CoV-2.

Elenco delle sostanze per lo studio di interferenza		
Sostanze	Ingrediente attivo	Concentrazione analizzata
Afrin – spray nasale	Ossimetazolina	5%
Sangue (umano)	Sangue	5%
Clorasettico, Cepacol	Benzocaina, mentolo	0,7 g/ml
Flonase	Fluticasone	5%
Halls Relief alla ciliegia	Mentolo	0,8 g/ml
Nasocort Allergy 24 ore	Triamcinolone	5%
Neo-sinefrina	Fenilefrina cloridrato	5%
Oseltamivir	Oseltamivir	2,2 µg/ml
Proteina mucina purificata	Proteina mucina	2,5 mg/ml
Rhinocort	Budesonide (glucocorticoide)	5%
Spray nasale con soluzione salina	Soluzione salina	15%
Tobramicina	Tobramicina	1,25 mg/ml
Zanamivir	Zanamivir	282,0 ng/ml
Zicam Cold Remedy	Galphimia glauca, Luffa operculata, Sabadilla	5%

Nessuna delle quattordici (14) sostanze potenzialmente interferenti testate nello studio ha dimostrato reattività crociata o interferenza.

LIMITAZIONI

- I campioni sui mezzi di trasporto non possono essere utilizzati in questo dosaggio.
- Un risultato negativo non preclude l'infezione da SARS-CoV-2 e non deve essere utilizzato quale sola base per le decisioni di gestione del paziente.
- I risultati negativi devono essere trattati come presunti e confermati con un test molecolare autorizzato dalla FDA che utilizza una fase di lisi chimica seguita da un'estrazione in fase solida di acido nucleico, se necessario, per la gestione clinica.
- Le prestazioni di questo test sono state valutate utilizzando campioni di tampone rinofaringeo e orofaringeo. Anche i tamponi nasali e i tamponi delle conche nasali medie (raccolti autonomamente sotto la supervisione o raccolti da un operatore sanitario) sono considerati accettabili per l'uso con Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.
- Errate condizioni di raccolta, conservazione o trasporto dei campioni possono dare luogo a risultati falsi negativi.

- La presenza di inibitori nel campione e/o eventuali errori nella procedura di dosaggio possono dare luogo a risultati falsi negativi.
- I risultati del dosaggio devono essere interpretati da un operatore sanitario in possesso della formazione necessaria congiuntamente all'anamnesi medica del paziente, ai suoi segni e sintomi clinici e ai risultati di altri test diagnostici.
- Gli analiti target (sequenze virali) possono persistere *in vivo*, indipendentemente dalla vitalità del virus. La rilevazione di uno o più analiti target non implica che i virus corrispondenti siano infettivi, né che questi siano gli agenti causativi dei sintomi clinici.
- Esiste un rischio di valori falsi positivi dovuto alla contaminazione crociata da parte di organismi target, dei loro acidi nucleici o del prodotto amplificato oppure a segnali aspecifici nel dosaggio.
- Esiste il rischio di valori falsi negativi dovuto alla presenza di varianti di sequenza nei target virali del dosaggio.
- Le prestazioni del dosaggio non sono state verificate in pazienti immunocompromessi.

ASSISTENZA TECNICA E ALLA CLIENTELA

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

Paese	Tel.	Indirizzo e-mail
Europa, Medio Oriente e Africa	+353 (91) 412 474 (principale) 0 1800 200441 (numero verde)	emeatechnicalsupport@quidel.com
Austria	+43 316 231239	
Francia	0 (805) 371674	
Germania	+49 (0) 7154 1593912	
Paesi Bassi	0 800 0224198	
Svizzera	0 800 554864	
Regno Unito	0 800 3688248	
Italia	+39 (800) 620 549	
America del Nord, Asia Pacifico, America Latina	+1.858.552.1100	technicalsupport@quidel.com
Canada	437.266.1704 (principale) 888.415.8764 (numero verde)	technicalsupport@quidel.com
Cina	0400 920 9366 oppure +86 021 3217 8300	chinatechnicalservice@quidel.com

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

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

Quasar e FAM sono marchi di fabbrica di Biosearch. NucliSENS, easyMAG e EMAG sono marchi di fabbrica di bioMérieux. TaqMan e LightCycler sono marchi di fabbrica di Roche. Applied Biosystems e QuantStudio sono marchi di fabbrica di Thermo Fisher Scientific. Rotor-Gene Q e QIAamp sono marchi di fabbrica di Qiagen. CFX96 Touch e ddPCR sono marchi di fabbrica di Bio-Rad Laboratories.

BIBLIOGRAFIA

1. Mahbubani, R., McFall-Johnsen, M., and Baker, S., Coronavirus live updates: Death toll soars past 41,400 with more than 846,000 people infected around the world. Business Insider. 31 marzo 2020.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Viral Culture; Approved Guidelines. Documento CLSI n. M41-A [ISBN 1562386239] Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2006.
3. Lauer, S.A., et. al. The incubation period of Coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application, Ann Intern Med. 2020
4. www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html

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

Istruzioni per la programmazione di Applied Biosystems 7500 Fast Dx

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

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

- a. Definire il documento: la maggior parte delle voci seguenti dovrebbe corrispondere all'impostazione predefinita. In caso contrario, modificare secondo necessità.
 - i. Confermare o inserire le informazioni seguenti.

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

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

- i. Inserire le informazioni seguenti per ciascun rilevatore.

Nome	Colorante reporter	Colorante quencher	Colore
SARS-CoV-2	FAM	(nessuno)	(Selezionare)
PRC	Cy5	(nessuno)	(Selezionare)

- ii. Selezionare un colore univoco che rappresenti ciascun rilevatore.
- iii. Evidenziare i nuovi rilevatori e aggiungerli alla colonna **Detectors in Document** (Rilevatori nel documento) utilizzando il pulsante **Add** (Aggiungi).
- iv. Selezionare **(none)** (nessuno) nel menu a discesa **Passive Reference** (Riferimento passivo).
- v. Selezionare il pulsante **Next** (Avanti).
- vi. Selezionare il pulsante **Finish** (Fine) senza impostare alcun pozzetto.
- c. La procedura guidata viene chiusa e il software si avvia, visualizzando la scheda **Setup** (Configurazione). La scheda visualizza la piastra dei campioni impostata durante l'avvio rapido. Per la configurazione iniziale non occorre modificare nulla in questa fase.
- d. Definizione del protocollo del termociclatore: selezionare la scheda **Instrument** (Strumento) per impostare i tempi e le temperature di RT-PCR di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. In **Thermal Profile** (Profilo termico) dovrebbe essere presente un protocollo predefinito in 2 fasi. Ciascuna fase include 3 caselle di testo modificabili dall'utente. La prima rappresenta il numero di duplicati o cicli per la fase in questione. La casella centrale rappresenta la temperatura (°C) e quella inferiore rappresenta il tempo (minuti: secondi).

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

1. Fase 1

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

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

3. Fase 2
 - a. Dupl: 1
 - b. Temp: 60
 - c. Tempo: 5:00
4. Selezionare la barra tra la Fase 2 e la Fase 3. Selezionare il pulsante **Add Hold** (Aggiungi attesa) per aggiungere un'altra fase.
5. Fase 3
 - a. Dupl: 1
 - b. Temp: 65
 - c. Tempo: 5:00
6. Fase 4 (fase di dissociazione in 2 passaggi)
 - a. Dupl: 10
 - b. Passaggio 1
 - i. Temp: 92
 - ii. Tempo: 0:05
 - c. Passaggio 2
 - i. Temp: 57
 - ii. Tempo: 0:40
7. Selezionare la barra a destra della Fase 4. Selezionare il pulsante **Add Cycle** (Aggiungi ciclo) per aggiungere un'altra fase.
8. Fase 5 (fase di dissociazione in 2 passaggi)
 - a. Dupl: 30
 - b. Passaggio 1
 - i. Temp: 92
 - ii. Tempo: 0:05
 - c. Passaggio 2
 - i. Temp: 57
 - ii. Tempo: 0:40
9. Se la fase aggiunta è errata, è possibile rimuoverla premendo il pulsante **Delete** (Elimina) dopo aver evidenziato la fase tra le linee verticali
- ii. In **Settings** (Impostazioni) inserire quanto segue:

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

- e. Impostare la soglia per ciascun analita.
 - i. Selezionare la scheda **Results** (Risultati).
 - ii. Selezionare la scheda **Amplification Plot** (Grafico di amplificazione).
 - iii. Selezionare SARS-CoV-2 nella scheda del rilevatore in alto a destra.
 - iv. Nel blocco **Analysis Settings** (Impostazioni di analisi) impostare **Threshold** (Soglia) su **7,5e+004**.
 - v. Selezionare il pulsante di opzione **Manual Baseline** (Basale manuale).
 - vi. Inserire "3" per Start (inizio) e "15" per End (fine).
 - vii. Selezionare PRC nella scheda del rilevatore in alto a destra.
 - viii. Nel blocco **Analysis Settings** (Impostazioni di analisi) impostare **Threshold** (Soglia) su **1,0e+004**.
 - ix. Selezionare il pulsante di opzione **Manual Baseline** (Basale manuale).
 - x. Inserire "3" per Start (inizio) e "15" per End (fine)
- f. Salvare il nuovo protocollo come modello per usi futuri.
 - i. Nella parte superiore della schermata selezionare **File** e quindi **Save As** (Salva con nome).
 - ii. **Salvare nel percorso:** D:\Applied Biosystems\7500 Fast System\Templates\
 - iii. **Nome file:** "Lyra Direct SARS-CoV-2"
 - iv. **Salva come:** "Modelli SDS (*.sdt)"
- g. Uscire dal software.

Procedura di analisi per termociclatore Applied Biosystems 7500 Fast Dx

1. Avviare il programma software Applied Biosystems® 7500 Fast Dx v1.4.

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

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

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

IMPORTANTE: premere OK al termine del ciclo.

 - a. Analizzare i dati premendo il pulsante **Analyze** (Analizza) nel menu in alto e salvare il file.
 - b. Salvare il file premendo **Save Document** (Salva documento) nella barra attività. Si apre la finestra con la richiesta "Reason for change of entry" (Motivo della modifica del dato).
 - c. Inserire **Data analysis post run** (Analisi dei dati post ciclo) ed eventuali altri commenti relativi al ciclo.
8. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 5)

Istruzioni per la programmazione di Applied Biosystems 7500 Standard

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

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

Nome	Colorante reporter	Colorante quencher	Colore
SARS-CoV-2	FAM	(nessuno)	(Selezionare)
PRC	Cy5	(nessuno)	(Selezionare)

- ii. Selezionare il pulsante **Add New Target** (Aggiungi nuovo target) per ogni target.
 - iii. Da ogni menu a discesa, selezionare reporter, quencher e colore
 - iv. Selezionare un colore univoco che rappresenti ciascun rilevatore
 - b. Assign Targets and Samples (Assegnare target e campioni): in questa scheda nell'angolo inferiore sinistro, selezionare **none** (nessuno) come Passive Reference (Riferimento passivo).
4. Selezionare **Run Method** (Esegui metodo) nel menu in alto a sinistra
- a. Impostare il **Reaction Volume** (Volume di reazione) per pozzetto su 20 µl nella visualizzazione **Graphical** (grafica) o **Tabular View** (tabulare)
 - b. Definire il protocollo del termociclatore: nella visualizzazione **grafica o tabulare**, il profilo predefinito dovrebbe prevedere 2 fasi di attesa e un periodo di funzionamento in 2 passaggi. Ciascuna fase include 3 caselle di testo modificabili dall'utente. La prima casella riporta il tasso di rampa (%) per quella fase, la seconda casella riporta la temperatura (°C), mentre la terza riporta il tempo (minuti:secondi).
 - i. Apportare le modifiche seguenti al protocollo del termociclatore:
 1. Passaggio 1 Prima **fase di attesa**
 - a. Tasso di rampa: 100%
 - b. Temp: 55
 - c. Tempo: 5:00
 2. Passaggio 1 Seconda **fase di attesa**.
 - a. Tasso di rampa: 100%
 - b. Temp: 60
 - c. Tempo: 5:00
 3. Evidenziare la seconda **fase di attesa** e selezionare il pulsante **Add Stage** (Aggiungi fase). Nel menu a discesa, selezionare **Holding** (attesa)
 4. Passaggio 1 **Terza fase di attesa**
 - a. Tasso di rampa: 100%
 - b. Temp: 65
 - c. Tempo: 5:00
 5. Prima **fase di funzionamento in 2 passaggi**
 - a. Numero di cicli: 10
 - b. NON selezionare Enable Auto Delta (Abilita Auto Delta)
 - c. Passaggio 1
 - i. Tasso di rampa: 100%
 - ii. Temp: 92
 - iii. Tempo: 0:05
 - d. Passaggio 2
 - i. Tasso di rampa: 100%
 - ii. Temp: 57
 - iii. Tempo: 0:40
 - iv. Disattivare la raccolta dati selezionando il pulsante **Data Selection** (Selezione dati) in fondo al passaggio.
 6. Evidenziare il passaggio 2 e selezionare il pulsante **Add Stage** (Aggiungi fase). Nel menu a discesa, selezionare **Cycling** (Funzionamento)
 7. Seconda **fase di funzionamento** in 2 passaggi
 - a. Numero di cicli: 30
 - b. NON selezionare Enable Auto Delta (Abilita Auto Delta)
 - c. Passaggio 1
 - i. Tasso di rampa: 100%
 - ii. Temp: 92
 - iii. Tempo: 0:05
 - d. Passaggio 2
 - i. Tasso di rampa: 100%
 - ii. Temp: 57
 - iii. Tempo: 0:40
 - iv. Assicurarsi che per questo passaggio la raccolta dati sia attivata (configurazione predefinita)

8. Se la fase aggiunta è errata, è possibile rimuoverla premendo il pulsante **Undo "Add Stage"** (Annulla "Aggiungi fase") subito dopo aver aggiunto la fase oppure evidenziare la fase tra le linee verticali e selezionare il pulsante **Delete Selected** (Elimina selezione)
5. Impostare la soglia per ciascun analita.
 - a. Selezionare la scheda **Analysis** (Analisi) nel menu in alto a sinistra.
 - b. Selezionare il pulsante **Analysis Settings** (Impostazioni analisi) nell'angolo in alto a destra.
 - c. Evidenziare SARS-CoV-2 e deselezionare la casella **Use Default Settings** (Usa impostazioni predefinite). Deselezionare **Automatic Threshold** (Soglia automatica) e modificare il valore soglia a 75.000. Deselezionare **Automatic Baseline (Basale automatico)**. Inserire 3 per **Baseline Start Cycle** (Inizio ciclo basale) e 15 per **End Cycle** (Fine ciclo) facendo clic sul pulsante "Analysis Setting" (Impostazioni analisi) nell'angolo in alto a destra.
 - d. Evidenziare PRC e deselezionare la casella **Use Default Settings** (Usa impostazioni predefinite). Deselezionare **Automatic Threshold** (Soglia automatica) e modificare il valore soglia a 10.000. Deselezionare **Automatic Baseline**(Basale automatico). Inserire 3 per **Baseline Start Cycle (Inizio ciclo basale)** e 15 per **End Cycle (Fine ciclo)** facendo clic sul pulsante "Analysis Setting" (Impostazioni analisi) nell'angolo in alto a destra.
 - e. In fondo alla casella, selezionare **Apply Analysis Settings** (Applica impostazioni analisi)

Target	Soglia	Inizio basale	Fine basale
SARS-CoV-2	75.000	3	15
PRC	10.000	3	15

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

Procedura di analisi per termociclatore Applied Biosystems 7500 Standard

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

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

5. Configurare la piastra dei campioni
 - a. Nelle schede **Setup** (Configurazione) e **Plate** (Piastra) viene visualizzata la configurazione della piastra.
 - b. Selezionare tutti i pozzetti destinati a contenere il campione, fare clic con il tasto destro e selezionare **Well Inspector** (Ispettore pozzetto) dal menu a discesa. Quando si apre la finestra popup **Well Inspector** (Ispettore pozzetto), selezionare i rilevatori per SARS-CoV-2 e PRC.
 - c. Utilizzare **Well Inspector** (Ispettore pozzetto) per inserire i nomi dei campioni. Nella finestra Well Inspector (Ispettore pozzetto) è possibile inserire gli ID dei pazienti. Tuttavia, si consiglia di eseguire questa operazione prima di risospendere il master mix liofilizzato, dopo il ciclo o utilizzando la funzione di importazione, per ridurre al minimo i tempi di attesa delle reazioni PCR a temperatura ambiente prima di avviare il ciclo.
 - d. Salvare il ciclo con il nome **AAMMGG- Lyra SARS-CoV-2.sds**.

- e. Si apre la finestra con la richiesta "Reason for change of entry" (Motivo della modifica del dato). Inserire "**Setup**" (Configurazione) ed eventuali altri commenti relativi al ciclo.
6. Avvio della PCR
 - a. Selezionare la scheda **Instrument** (Strumento).
 - b. Inserire la piastra PCR a 96 pozzetti nel dispositivo.
 - c. In **Instrument Control** (Controllo strumento), selezionare il pulsante **Start** (Avvio) per iniziare il ciclo.
7. Dopo la PCR

IMPORTANTE: premere OK al termine del ciclo.

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

Procedura di programmazione del termociclatore Bio-Rad CFX96 Touch

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

Istruzioni per la programmazione:

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

- iv. Selezionare **step 6** (passaggio 6), il **GOTO step** (passaggio GOTO), e modificare lo stato in **GOTO step 4** (passaggio GOTO 4) e modificare il numero di volte a **9**
 - g. **Passaggio 7** (fase di amplificazione in 2 passaggi)
 - i. Dopo aver evidenziato il passaggio 6, selezionare il pulsante **Insert Step** (Inserisci passaggio) nella parte inferiore sinistra della finestra un totale di 2 volte (fino a raggiungere il passaggio 8)
 - ii. Evidenziare **step 7** (passaggio 7) e immettere le seguenti impostazioni:
 - 1. Temp: 92 °C
 - 2. Tempo: 0:05
 - iii. Evidenziare **step 8** (passaggio 8) e immettere le seguenti impostazioni:
 - 1. Temp: 57 °C
 - 2. Tempo: 0:40
 - 3. Sulla sinistra della finestra, selezionare il pulsante **Add Plate Read to Step** (Aggiungi lettura piastra al passaggio)
 - 4. Evidenziare **step 8** (passaggio 8) e selezionare il pulsante **Insert GOTO** (Inserisci GOTO) nella parte inferiore sinistra della finestra
 - iv. Selezionare **step 9** (passaggio 9), il **GOTO step** (passaggio GOTO), e modificare lo stato in **GOTO step 7** (passaggio GOTO 7) e il numero di ripetizione delle volte a **29**
 - h. Salvare le nuove condizioni di ciclo come protocollo per uso futuro
 - i. Nella parte superiore sinistra dello schermo, selezionare il pulsante **Save** (Salva)
 - ii. Salvare nella cartella **ExpressLoad**
 - iii. **Denominare** il file "Lyra Direct SARS-CoV-2"
 - iv. **Salvare come** 'File di protocollo (*.prcl)'
 - v. Selezionare **Save** (Salva)
 - vi. Fare clic su **Ok** nella finestra dell'editor del protocollo
6. Definire la configurazione della piastra
- a. Nella finestra **Run Setup** (Impostazione ciclo), selezionare la scheda **Plate** (Piastra)
 - b. In **Express Load** nel menu a discesa, selezionare **Quick Plate 96 wells All Channels.pltd**
 - c. Selezionare il pulsante **Edit Selected** (Modifica selezione) per personalizzare la configurazione della piastra
 - d. Nella barra strumenti superiore, selezionare **Settings** (Impostazioni). È necessario configurare le impostazioni predefinite.
 - i. **Plate Size** (Dimensioni piastra) selezionare **96 Wells (96 pozzetti)**
 - ii. **Plate Type** (Tipo piastra) selezionare **BR Clear (Trasparente BR)**
 - iii. **Number Convention** (Convenzione numerica) selezionare **Scientific Notation (Numerazione scientifica)**
 - iv. **Units** (Unità) selezionare **Copy Number (Numero copia)**
 - e. Lasciare **Scan Mode** (Modalità scansione) impostata su **All Channels** (Tutti i canali) nella parte superiore della finestra
 - f. Selezionare il pulsante **Select Fluorophores** (Seleziona fluorofori) nella parte superiore destra della finestra Plate Editor (Editor piastra)
 - i. Deselezionare tutti i fluorofori predefiniti
 - ii. Selezionare **FAM** e **Cy5** e fare clic su OK
 - g. Nella finestra **Plate Editor** (Editor piastra), evidenziare l'intera piastra e fare clic sulla casella di controllo davanti a tutti i fluorofori: **FAM** e **Cy5**
 - h. Selezionare il pulsante **Experiment Settings** (Impostazioni esperimento) per definire i target
 - i. Nella parte inferiore sinistra della finestra **Experiment Settings** (Impostazioni esperimento) nella casella **New** (Nuovo), digitare **SARS-CoV-2** e selezionare **Add** (Aggiungi)
 - ii. Ripetere il tutto per il **PRC**
 - iii. Selezionare **OK**
 - i. Nella finestra **Plate Editor** (Editor piastra) accanto a **FAM** nel menu a discesa in **Target Name** (Nome target), selezionare **SARS-CoV-2** e per Cy5 selezionare **PRC**
 - j. Salvare la nuova configurazione della piastra per uso futuro
 - i. Nella parte superiore sinistra dello schermo, selezionare il pulsante **Save** (Salva)
 - ii. Salvare nella cartella **ExpressLoad**
 - iii. **Denominare** il file "Lyra Direct SARS-CoV-2"
 - iv. **Salva come** "File piastra (*.pltd)"
 - v. Selezionare **Save** (Salva)

- vi. Fare clic su **Ok** nella finestra **Plate Editor** (Editor piastra)
- k. Uscire dal software

Procedura di programmazione del termociclatore Bio-Rad CFX96 Touch

Istruzioni per l'analisi:

1. Aprire il file del ciclo da analizzare
2. In alto a sinistra, selezionare **Quantification Tab** (Scheda quantificazione)
3. Nella curva di amplificazione, selezionare la casella davanti a **Log Scale** (Scala Log)
4. Selezionare **Settings** (Impostazioni) nella barra degli strumenti in alto a sinistra nello schermo
 - a. Per **Cq Determination Mode** (Modalità determinazione Cq), selezionare **Single Threshold** (Soglia unica)
 - b. In **Baseline Setting** (Impostazione basale), selezionare **Baseline Subtracted Curve Fit** (Adattamento curva sottratta basale)
 - c. In **Analysis Mode** (Modalità analisi), selezionare **Target**
 - d. In **Cycles to Analyze** (Cicli da analizzare), scegliere 1-30, quindi fare clic su **OK**
 - e. È necessario configurare i cicli basali e la soglia per ciascun target
 - i. Assicurarsi che nel grafico di amplificazione sia selezionata solo la **casella SARS-CoV-2**
 - ii. Andare a **Settings** (Impostazioni) nella barra degli strumenti e selezionare **Baseline Threshold** (Soglia basale)
 1. Nella parte superiore della casella, selezionare **Auto Calculated** (Calcolo automatico) per **Baseline Cycles** (Cicli basali)
 2. Per **Single Threshold** (Soglia unica) in fondo alla casella, selezionare **User Defined** (Definita dall'utente)
 - a. Impostare su **164**
 - b. Selezionare OK
 - iii. **Deselezionare** la **casella SARS-CoV-2** e **selezionare** la **casella PRC** nel grafico di amplificazione
 - iv. Andare a **Settings** (Impostazioni) nella barra degli strumenti e selezionare **Baseline Threshold** (Soglia basale)
 1. Nella parte superiore della casella, selezionare **Auto Calculated** (Calcolo automatico) per **Baseline Cycles** (Cicli basali)
 2. Per **Single Threshold** (Soglia unica) in fondo alla casella, selezionare **User Defined** (Definita dall'utente)
 - a. Impostare su **25**
 - b. Selezionare OK
5. Uscire dal software
6. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 5)

Istruzioni per la programmazione di Qiagen Rotor-Gene Q

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

Istruzioni per la programmazione:

1. Avviare il programma software Rotor-Gene Q
2. Nella finestra popup **New Run** (Nuovo ciclo), selezionare la scheda **Advanced** (Avanzate) nella parte superiore dello schermo
3. Selezionare **Empty Run** (Ciclo vuoto) e poi **New** (Nuovo) nella finestra popup in basso a destra per avviare a **Advanced Run Wizard** (Procedura guidata ciclo avanzato)
 - a. Selezionare le dimensioni adeguate del rotore nella **Advanced Run Wizard** (Procedura guidata ciclo avanzato) in alto a sinistra nello schermo
 - b. Selezionare la casella che dichiara che il **Locking Ring** (Anello di bloccaggio) è **Attached** (Attaccato) e selezionare **Next** (Avanti)
 - c. Lasciare vuote le sezioni **Operator** (Operatore) e **Notes** (Note)
 - d. Immettere **20 µl** come **Reaction Volume** (Volume di reazione) nella parte inferiore sinistra dello schermo

- e. Per **Sample Layout** (Disposizione campioni) scegliere **1, 2, 3...**, quindi selezionare **Next** (Avanti)
- f. In **Channel Setup** (Impostazione canale), selezionare **Create New** (Crea nuovo) per immettere le informazioni relative a ciascun rilevatore
 - i. In **Name** (Nome), immettere **SARS-CoV-2**
 - ii. **Source** (Fonte) selezionare 470 nm
 - iii. **Detector** (Rilevatore) selezionare 510 nm
 - iv. Non regolare l'impostazione predefinita **Gain** (Acquisizione) di 7, dato che verrà impostata in un passaggio successivo
 - v. Selezionare **OK**
- g. Ripetere il passaggio precedente selezionando **Create New** (Crea nuovo)
 - i. In **Name** (Nome), immettere **PRC**
 - ii. **Source** (Fonte) selezionare 625 nm
 - iii. **Detector** (Rilevatore) selezionare 660 nm
 - iv. Non regolare l'impostazione predefinita **Gain** (Acquisizione) di 7, dato che verrà impostata in un passaggio successivo
 - v. Selezionare **OK**
- h. Selezionare il pulsante **Edit Profile** (Modifica profilo) in centro alla finestra per impostare un profilo di ciclo
 - i. Nella finestra **Edit Profile** (Modifica profilo), andare nella parte superiore sinistra dello schermo a **New** (Nuovo), quindi selezionare **Cycling** (Ciclo) nel menu a discesa. Dovrebbe essere visualizzata una fase di attesa e di ciclo in tre passaggi.
 - ii. Modificare la fase di attesa per ottenere una temperatura di **55 °C** e un tempo di **5:00 minuti**
 - iii. Selezionare il pulsante **Insert After** (Inserisci dopo) al centro della finestra popup, quindi selezionare **New Hold at Temperature** (Nuova attesa alla temperatura)
 - iv. Modificare la seconda fase di attesa per ottenere una temperatura di **60 °C** e un tempo di **5:00 minuti**
 - v. Selezionare il pulsante **Insert After** (Inserisci dopo) al centro della finestra popup, quindi selezionare **New Hold at Temperature** (Nuova attesa alla temperatura) per inserire una terza fase di attesa
 - vi. Modificare la terza fase di attesa per ottenere una temperatura di **65 °C** e un tempo di **5:00 minuti**
 - vii. Evidenziare la prima **fase del ciclo** e modificarla come segue:
 - 1. Questo ciclo viene ripetuto **10** volte
 - 2. Selezionare **Timed Step** (Passaggio cronometrato) dal menu a discesa nella parte centrale-sinistra dello schermo
 - 3. Non selezionare **Long Range** (Lungo intervallo) o **Touchdown** sulla sinistra dello schermo
 - 4. Il primo passaggio:
 - a. **92 °C**
 - b. **5 secondi**
 - c. **Acquisizione non avvenuta**
 - 5. Selezionare il passaggio due e configurarlo come segue:
 - a. **57 °C**
 - b. **40 secondi**
 - c. **Acquisizione non avvenuta**
 - 6. Evidenziare il passaggio tre ed eliminarlo selezionando il pulsante “-“ al centro della finestra
 - 7. Selezionare il pulsante **Insert After** (Inserisci dopo) al centro della finestra popup, quindi selezionare **New Cycling** (Nuova esecuzione del ciclo)
 - viii. Evidenziare la seconda **fase del ciclo** e modificarla come segue:
 - 1. Questo ciclo viene ripetuto **30** volte
 - 2. Selezionare **Timed Step** (Passaggio cronometrato) dal menu a discesa nella parte centrale-sinistra dello schermo
 - 3. Non selezionare **Long Range** (Lungo intervallo) o **Touchdown** sulla sinistra dello schermo

4. Il primo passaggio:
 - a. **92 °C**
 - b. **5 secondi**
 - c. **Acquisizione non avvenuta**
 5. Selezionare il passaggio due e configurarlo come segue:
 - a. **57 °C**
 - b. **40 secondi**
 - c. Selezionare **Acquiring to Cycling A** (Acquisizione per ciclo A)
 - i. In **Acquiring Channels (Canali di acquisizione)** evidenziare il nome predefinito del canale (Green) e selezionare il pulsante < per spostarlo nell'elenco **Available Channels** (Canali disponibili)
 - ii. Nell'elenco **Available Channels** (Canali disponibili), selezionare **SARS-CoV-2** e il pulsante > per spostarlo nell'elenco **Acquiring Channels** (Canali di acquisizione)
 - iii. Ripetere il passaggio precedente per **PRC**, quindi selezionare **OK**
 6. Evidenziare il passaggio tre ed eliminarlo selezionando il pulsante “-“ al centro della finestra
 - ix. Nella finestra **Edit Profile** (Modifica profilo), selezionare **OK**
 - i. Nella finestra **New Run Wizard** (Procedura guidata nuovo ciclo), selezionare **Gain Optimisation** (Ottimizzazione acquisizione)
 - i. Al centro della finestra **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configurazione ottimizzazione auto-acquisizione), selezionare il menu a discesa in **Channel Settings** (Impostazioni canale) e selezionare **SARS-CoV-2**.
 - ii. Selezionare il pulsante **Add** (Aggiungi) a destra
 1. Nella finestra **Auto-Gain Optimisation Channel Settings** (Impostazioni canale ottimizzazione auto-acquisizione), assicurarsi che **Tube Position** (Posizione provetta) per SARS-CoV-2 sia impostata su **1**. A tal fine, è necessario che un controllo positivo contenente SARS-CoV-2 e PRC venga analizzato a ogni ciclo di PCR e collocato nella prima provetta. In caso contrario, l'acquisizione potrebbe non essere impostata correttamente.
 2. Lasciare l'impostazione di **Target Sample Range** (Intervallo target campione) e **Acceptable Gain Range** (Intervallo accettabile acquisizione) impostata sui valori predefiniti, ovvero rispettivamente 5-10 FI e tra -10 e 10.
 3. Selezionare **OK**
 4. Ripetere i passaggi 3. j. ii. 1-3. per il **PRC**
 - iii. Nella finestra **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configurazione ottimizzazione auto-acquisizione), selezionare la casella accanto a **Perform Optimisation Before 1st Acquisition (Esegui ottimizzazione prima della 1° acquisizione)**
 - iv. Selezionare **Close** (Chiudi)
 - j. Nella finestra **New Run Wizard** (Procedura guidata nuovo ciclo), selezionare il pulsante **Next** (Avanti)
 - k. Salvare il nuovo protocollo come modello per usi futuri
 - i. Nella parte inferiore destra della finestra, selezionare il pulsante **Save Template** (Salva modello)
 - ii. **Salva in:** C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates
 - iii. **Nome file:** "Lyra Direct SARS-CoV-2"
 - iv. **Salva come:** "Modello (*.ret)"
- l. Uscire dal software

Ciclo di analisi con Qiagen Rotor-Gene Q

Istruzioni per l'analisi:

1. In **New Run Wizard** (Procedura guidata nuovo ciclo), caricare il modello Direct SARS-CoV-2.
2. Premere **Start** (Avvio).
3. Aprire il file del ciclo da analizzare
4. Nella barra strumenti superiore, selezionare il pulsante **Analysis** (Analisi)
 - a. Selezionare **Quantitation** (Quantificazione), quindi **Cycling A. SARS-CoV-2** (Ciclo A. SARS-CoV-2) e **Show** (Visualizza)

- b. È necessario stabilire una soglia per SARS-CoV-2
 - i. Nella parte inferiore destra dello schermo sotto a **CT Calculation** (Calcolo CT), immettere **0,03** come **SARS-CoV-2 Threshold** (Soglia SARS-CoV-2)
 - ii. Nella casella **Eliminate Cycles before** (Elimina cicli precedenti a), assicurarsi di aver immesso il valore **1**
 - iii. Assicurarsi che il grafico di amplificazione sia impostato su **Log Scale** (Scala Log) (il pulsante di scelta in basso a sinistra nel grafico dice Linear Scale [Scala lineare] o Log Scale [Scala Log])
 - c. Selezionare **Quantitation** (Quantificazione), quindi **Cycling A. PRC** (Ciclo A. PRC) e **Show** (Visualizza)
 - d. È necessario stabilire una soglia per PRC
 - i. Nella parte inferiore destra dello schermo sotto a **CT Calculation** (Calcolo CT), immettere **0,05** come **PRC Threshold** (Soglia PRC)
 - ii. Nella casella **Eliminate Cycles before** (Elimina cicli precedenti a), assicurarsi di aver immesso il valore **1**
 - iii. Assicurarsi che il grafico di amplificazione sia impostato su **Log Scale** (Scala Log) (il pulsante di scelta in basso a sinistra nel grafico dice Linear Scale [Scala lineare] o Log Scale [Scala Log])
5. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 5)

Istruzioni per la programmazione di Roche LightCycler 480 Instrument II

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

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

1. Avviare il programma software di LightCycler 480
2. È necessario stabilire il **Detection Format** (Formato rilevazione) per specificare i canali in cui verrà letta la fluorescenza
 - a. Selezionare **Tools** (Strumenti) in basso a destra nello schermo di avvio
 - b. Selezionare **Detection Formats** (Formati rilevazione), quindi scegliere **New** (Nuovo)
 - c. Denominare il formato Lyra Direct SARS-CoV-2
 - d. Nella finestra **Filter Combination Selection** (Selezione combinazione filtri), selezionare 465-510 e 618-660
 - e. Nella finestra **Selected Filter Combination List** (Elenco combinazioni filtri selezionate), digitare SARS-CoV-2 per 465-510 e PRC per 618-660
 - f. Lasciare i valori predefiniti su 1 in Melt Factor (Fattore Melt), Quant Factor (Fattore Quant) e Max Integration Time (Tempo massimo integrazione)
 - g. Selezionare **Close** (Chiudi) per salvare il nuovo formato di rilevazione e tornare allo schermo iniziale
 - h. Per accedere al nuovo **Detection Format** (Formato rilevazione), è necessario chiudere e quindi ricaricare il software LightCycler 480
3. Dopo aver chiuso e ricaricato il software, selezionare **White Plates** (Piastre bianche) e **New Experiment** (Nuovo esperimento) nella finestra Experiment Creation (Creazione esperimento)
4. Nella schermata successiva, selezionare "Lyra Direct SARS-CoV-2" dal menu a discesa in **Detection Formats** (Formati rilevazione)
5. Immettere **20 µl** come **Reaction Volume** (Volume di reazione) nella parte superiore destra dello schermo
6. Immettere i nomi per ciascuno dei programmi di RT-PCR
 - a. In **Program Name** (Nome programma) immettere **Stage 1** (Fase 1), in **Cycles** (Cicli) immettere **1**, e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **none** (nessuna)
 - b. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un programma
 - c. Denominare il programma successivo **Stage 2** (Fase 2), in **Cycles** (Cicli) immettere **1**, e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **none** (nessuna)
 - d. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un programma
 - e. Denominare il programma successivo **Stage 3** (Fase 3), in **Cycles** (Cicli) immettere **1**, e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **none** (nessuna)
 - f. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un programma
 - g. Denominare il programma successivo **Stage 4** (Fase 4), in **Cycles** (Cicli) immettere **40**, e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **quantification** (quantificazione)

7. Impostare i tempi e le temperature dei cicli di RT-PCR
 - a. Evidenziare **Stage 1** (Fase 1) in **Program Name** (Nome programma) e modificare **Stage 1 Temperature Targets** (Temperatura dei target Fase 1) come segue:
 - i. **Target (°C)** impostato su **55**
 - ii. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **none (nessuna)**
 - iii. **Hold [Attesa]** (hh:mm:ss) impostata su **5:00**
 - iv. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 4,4
 - v. **Sec Target (°C), Step Size [Dimensione passaggio] (°C) e Step Delay [Ritardo passaggio] (cicli)** devono essere lasciati su 0 per le fasi 1-4.
 - b. Evidenziare **Stage 2** (Fase 2) in **Program Name** (Nome programma) e modificare **Stage 2 Temperature Targets** (Temperatura dei target Fase 2) come segue:
 - i. **Target (°C)** impostato su **60**
 - ii. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **none (nessuna)**
 - iii. **Hold [Attesa]** (hh:mm:ss) impostata su **5:00**
 - iv. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 4,4
 - c. Evidenziare **Stage 3** (Fase 3) in **Program Name** (Nome programma) e modificare **Stage 3 Temperature Targets** (Temperatura dei target Fase 3) come segue:
 - i. **Target (°C)** impostato su **65**
 - ii. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **none (nessuna)**
 - iii. **Hold [Attesa]** (hh:mm:ss) impostata su **5:00**
 - iv. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 4,4
 - d. Evidenziare **Stage 4** (Fase 4) in **Program Name** (Nome programma) e modificare **Stage 4 Temperature Targets** (Temperatura dei target Fase 4) come segue:
 - i. Il primo passaggio:
 1. **Target (°C)** impostato su **92**
 2. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **none (nessuna)**
 3. **Hold [Attesa]** (hh:mm:ss) impostata su **0:05**
 4. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 4,4
 - ii. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un passaggio e configurare il secondo passaggio:
 1. **Target (°C)** impostato su **57**
 2. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **single (singola)**
 3. **Hold [Attesa]** (hh:mm:ss) impostata su **0:40**
 4. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 2,2
8. Salvare il nuovo protocollo come modello del ciclo per usi futuri.
 - a. Nell'angolo inferiore sinistro dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto al pulsante **Apply Template** (Usa modello)
 - b. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
 - c. Selezionare **Templates Folder** (Cartella modelli)
 - d. Evidenziare **Run Templates Folder** (Cartella modelli ciclo)
 - e. Denominare il modello di ciclo Lyra Direct SARS-CoV-2 e fare clic sul pulsante di selezione
9. Uscire dal software.

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

1. Caricare il modello ciclo Lyra Direct SARS-CoV-2.
2. Premere Start (Avvio).
3. Il modello di analisi può essere stabilito solo dopo il completamento dell'esperimento iniziale e saranno stabiliti due modelli: uno per il rilevamento del SARS-CoV-2 e uno per il rilevamento del PRC.
4. Nel ciclo Lyra Direct SARS-CoV-2, selezionare il pulsante **Analysis** (Analisi) nella barra del modulo
 - a. Scegliere **Abs Quant/Fit Points** (Quant Abs/Punti adattamento)
 - b. Nella finestra popup **Create New Analysis** (Crea nuova analisi), selezionare il sottoinsieme predefinito dal menu a discesa **subset** (sottoinsieme), quindi selezionare il pulsante di selezione
 - c. Fare clic su **Background** (Sfondo) per tutti gli analiti
 - i. Impostare **Min Offset** (Scarto minimo) su 1
 - ii. Impostare **Max Offset** (Scarto massimo) su 9
 - d. Nella parte centrale inferiore dello schermo, assicurarsi che **Color Compensation** (Compensazione colore) sia spenta per tutti gli analiti

- e. Modificare le impostazioni predefinite per **First Cycle** (Primo ciclo) su 7 e confermare **Last Cycle** (Ultimo ciclo) su 40
5. Nella parte centrale superiore dello schermo, selezionare **Noise Band** (Banda di rumore)
6. Scegliere **Filter Comb** 465-510
7. Scegliere il menu a discesa accanto al pulsante **Noise Band** (Banda di rumore) e selezionare quanto segue:
 - a. Banda di rumore fluorescenza del SARS-CoV-2 Impostare su 1,5
8. Scegliere **Calculate** (Calcola) in basso a sinistra nello schermo
9. Salvare il nuovo protocollo di analisi SARS-CoV-2 come modello per usi futuri.
 - a. Nell'angolo inferiore sinistro dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto al pulsante **Apply Template** (Usa modello)
 - b. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
 - c. Selezionare **Templates Folder** (Cartella modelli)
 - d. Evidenziare **Run Templates Folder** (Cartella modelli ciclo)
 - e. Denominare il modello di analisi Lyra Direct SARS-CoV-2 465-510 e fare clic sul pulsante di selezione
10. Tornare indietro per avviare e scegliere **Filter Comb** 618-660
11. Scegliere il menu a discesa accanto al pulsante **Noise Band** (Banda di rumore) e selezionare quanto segue:
 - a. PRC Noiseband Auto
12. Scegliere **Calculate** (Calcola) in basso a sinistra nello schermo
13. Salvare il protocollo di analisi SARS-CoV-2 come modello per usi futuri
 - a. Nell'angolo inferiore sinistro dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto al pulsante **Apply Template** (Usa modello)
 - b. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
 - c. Selezionare **Templates Folder** (Cartella modelli)
 - d. Evidenziare **Run Templates Folder** (Cartella modelli ciclo)
 - e. Denominare il modello di analisi Lyra Direct SARS-CoV-2_618-660 e fare clic sul pulsante di selezione
14. Creare un rapporto
 - a. Selezionare l'icona **Save** (Salva) nella barra delle azioni globale sul lato destro dello schermo
 - b. Ciò sarà eseguito sotto ogni canale analizzato
 - c. Scegliere il pulsante **Report** sulla barra del modulo sul lato sinistro dello schermo
 - d. Selezionare le impostazioni appropriate e premere il pulsante **Generate** (Genera)
 - e.
15. Per applicare un modello di analisi a cicli successivi
 - a. Una volta terminato il ciclo, selezionare il pulsante **Analysis** (Analisi) nella barra del modulo
 - b. Scegliere **Abs Quant/Fit Points** (Quant Abs/Punti adattamento)
 - c. Nella finestra popup **Create New Analysis** (Crea nuova analisi), selezionare il sottoinsieme predefinito dal menu a discesa **subset** (sottoinsieme), quindi selezionare il pulsante di selezione
 - d. Selezionare il pulsante **Apply Template** (Usa modello) all'estrema sinistra dello schermo e scegliere il modello di analisi Lyra Direct SARS-CoV-2_465-510 or Lyra Direct SARS-CoV-2_618-660 dalla **Analysis Templates Folder** (Cartella modelli analisi)
 - e. Selezionare sì nella finestra popup
16. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 5)

Istruzioni per la programmazione di Roche cobas z 480 Instrument

Per ulteriori informazioni, fare riferimento al Manuale per l'utente con versione 1.1.2.

Creazione di un modello di esecuzione del dosaggio con cobas z 480

1. Avviare il programma software di cobas z 480
2. È necessario stabilire il **Detection Format** (Formato rilevazione) per specificare i canali in cui verrà letta la fluorescenza
 - a. Selezionare **Tools** (Strumenti) in basso a destra nello schermo di avvio
 - b. Selezionare **Detection Formats** (Formati rilevazione), quindi scegliere **New** (Nuovo)
 - c. Denominare il formato Lyra Direct SARS-CoV-2
 - d. Nella finestra **Filter Combination Selection** (Selezione combinazione filtri), selezionare 465-510 e 610-670

- e. Nella finestra **Selected Filter Combination List** (Elenco combinazioni filtri selezionate), digitare SARS-CoV-2 per 465-510 e PRC per 610-670
 - f. Lasciare i valori predefiniti su 1 in Melt Factor (Fattore Melt), Quant Factor (Fattore Quant) e Max Integration Time (Tempo massimo integrazione)
 - g. Selezionare **Close** (Chiudi) per salvare il nuovo formato di rilevazione e tornare allo schermo iniziale
 - h. Per accedere al nuovo **Detection Format** (Formato rilevazione), è necessario chiudere e quindi ricaricare il software cobas z 480
3. Dopo aver chiuso e ricaricato il software, selezionare **White Plates** (Piastrine bianche) e **New Experiment** (Nuovo esperimento) nella finestra Experiment Creation (Creazione esperimento)
 4. Nella schermata successiva, selezionare "Lyra Direct SARS-CoV-2" dal menu a discesa in **Detection Formats** (Formati rilevazione)
 5. Immettere **20 µl** come **Reaction Volume** (Volume di reazione) nella parte superiore destra dello schermo
 6. Immettere i nomi per ciascuno dei programmi di RT-PCR
 - a. In **Program Name** (Nome programma) immettere **Stage 1** (Fase 1), in **Cycles** (Cicli) immettere **1**, e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **none** (nessuna)
 - b. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un programma
 - c. Denominare il programma successivo **Stage 2** (Fase 2), in **Cycles** (Cicli) immettere **1**, e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **none** (nessuna)
 - d. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un programma
 - e. Denominare il programma successivo **Stage 3** (Fase 3), in **Cycles** (Cicli) immettere **1**, e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **none** (nessuna)
 - f. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un programma
 - g. Denominare il programma successivo **Stage 4** (Fase 4), in **Cycles** (Cicli) immettere **40**, e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **quantification** (quantificazione)
 7. Impostare i tempi e le temperature dei cicli di RT-PCR
 - a. Evidenziare **Stage 1** (Fase 1) in **Program Name** (Nome programma) e modificare **Stage 1 Temperature Targets** (Temperatura dei target Fase 1) come segue:
 - i. **Target (°C)** impostato su **55**
 - ii. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **none** (nessuna)
 - iii. **Hold [Attesa]** (hh:mm:ss) impostata su **5:00**
 - iv. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 4,4
 - v. **Sec Target (°C)**, **Step Size [Dimensione passaggio] (°C)** e **Step Delay [Ritardo passaggio] (cicli)** devono essere lasciati su 0 per le fasi 1-4.
 - b. Evidenziare **Stage 2** (Fase 2) in **Program Name** (Nome programma) e modificare **Stage 2 Temperature Targets** (Temperatura dei target Fase 2) come segue:
 - i. **Target (°C)** impostato su **60**
 - ii. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **none** (nessuna)
 - iii. **Hold [Attesa]** (hh:mm:ss) impostata su **5:00**
 - iv. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 4,4
 - c. Evidenziare **Stage 3** (Fase 3) in **Program Name** (Nome programma) e modificare **Stage 3 Temperature Targets** (Temperatura dei target Fase 3) come segue:
 - i. **Target (°C)** impostato su **65**
 - ii. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **none** (nessuna)
 - iii. **Hold [Attesa]** (hh:mm:ss) impostata su **5:00**
 - iv. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 4,4
 - d. Evidenziare **Stage 4** (Fase 4) in **Program Name** (Nome programma) e modificare **Stage 4 Temperature Targets** (Temperatura dei target Fase 4) come segue:
 - i. Il primo passaggio:
 1. **Target (°C)** impostato su **92**
 2. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **none** (nessuna)
 3. **Hold [Attesa]** (hh:mm:ss) impostata su **0:05**
 4. **Ramp Rate [Tasso di rampa] (°C/s)** su 4,4
 - ii. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un passaggio e configurare il secondo passaggio:
 1. **Target (°C)** impostato su **57**
 2. **Acquisition Mode** (Modalità acquisizione) selezionare **single** (singola)
 3. **Hold [Attesa]** (hh:mm:ss) impostata su **0:40**

4. **Ramp Rate** [Tasso di rampa] (°C/s) su 2,2
8. Salvare il nuovo protocollo come modello del ciclo per usi futuri.
 - a. Nell'angolo inferiore sinistro dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto al pulsante **Apply Template** (Usa modello)
 - b. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
 - c. Selezionare **Templates Folder** (Cartella modelli)
 - d. Evidenziare **Run Templates Folder** (Cartella modelli ciclo)
 - e. Denominare il modello di ciclo Lyra Direct SARS-CoV-2 e fare clic sul pulsante di selezione
9. Uscire dal software.

Creazione di una procedura di analisi del dosaggio con cobas z 480

1. Caricare il modello ciclo Lyra Direct SARS-CoV-2.
2. Premere Start (Avvio).
3. Il modello di analisi può essere stabilito solo dopo il completamento dell'esperimento iniziale e saranno stabiliti due modelli: uno per il rilevamento del SARS-CoV-2 e uno per il rilevamento del PRC.
4. Nel ciclo Lyra Direct SARS-CoV-2, selezionare il pulsante **Analysis** (Analisi) nella barra del modulo
 - a. Scegliere **Abs Quant/Fit Points** (Quant Abs/Punti adattamento)
 - b. Nella finestra popup **Create New Analysis** (Crea nuova analisi), selezionare il sottoinsieme predefinito dal menu a discesa **subset** (sottoinsieme), quindi selezionare il pulsante di selezione
 - c. Fare clic su **Background** (Sfondo) per tutti gli analiti
 - i. Impostare **Min Offset** (Scarto minimo) su 1
 - ii. Impostare **Max Offset** (Scarto massimo) su 9
 - d. Nella parte centrale inferiore dello schermo, assicurarsi che **Color Compensation** (Compensazione colore) sia spenta per tutti gli analiti
 - e. Modificare l'impostazione predefinita per **First Cycle** (Primo ciclo) su 7 e confermare **Last Cycle** (Ultimo ciclo) su 40
5. Nella parte centrale superiore dello schermo, selezionare **Noise Band** (Banda di rumore)
6. Scegliere **Filter Comb** 465-510
7. Scegliere il menu a discesa accanto al pulsante **Noise Band** (Banda di rumore) e selezionare quanto segue:
 - a. Banda di rumore fluorescenza del SARS-CoV-2 Impostare su 1,5
8. Scegliere **Calculate** (Calcola) in basso a sinistra nello schermo
9. Salvare il protocollo di analisi SARS-CoV-2 come modello per usi futuri.
 - a. Nell'angolo inferiore sinistro dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto al pulsante **Apply Template** (Usa modello)
 - b. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
 - c. Selezionare **Templates Folder** (Cartella modelli)
 - d. Evidenziare **Run Templates Folder** (Cartella modelli ciclo)
 - e. Denominare il modello di analisi Lyra Direct SARS-CoV-2_465-510 e fare clic sul pulsante di selezione
10. Tornare indietro per avviare e scegliere **Filter Comb** 610-670
11. Scegliere il menu a discesa accanto al pulsante **Noise Band** (Banda di rumore) e selezionare quanto segue:
 - a. PRC Noiseband Auto
12. Scegliere **Calculate** (Calcola) in basso a sinistra nello schermo
13. Salvare il protocollo di analisi SARS-CoV-2 come modello per usi futuri.
 - a. Nell'angolo inferiore sinistro dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto al pulsante **Apply Template** (Usa modello)
 - b. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
 - c. Selezionare **Templates Folder** (Cartella modelli)
 - d. Evidenziare **Run Templates Folder** (Cartella modelli ciclo)
 - e. Denominare il modello di analisi Lyra Direct SARS-CoV-2_610-670 e fare clic sul pulsante di selezione
14. Creare un rapporto
 - a. Selezionare l'icona **Save** (Salva) nella barra delle azioni globale sul lato destro dello schermo
 - b. Ciò sarà eseguito sotto ogni canale analizzato
 - c. Scegliere il pulsante **Report** sulla barra del modulo sul lato sinistro dello schermo
 - d. Selezionare le impostazioni appropriate e premere il pulsante **Generate** (Genera)
15. Per applicare un modello di analisi a cicli successivi
 - a. Una volta terminato il ciclo, selezionare il pulsante **Analysis** (Analisi) nella barra del modulo

- b. Scegliere **Abs Quant/Fit Points** (Quant Abs/Punti adattamento)
 - c. Nella finestra popup **Create New Analysis** (Crea nuova analisi), selezionare il sottoinsieme predefinito dal menu a discesa **subset** (sottoinsieme), quindi selezionare il pulsante di selezione
 - d. Selezionare il pulsante **Apply Template** (Usa modello) all'estrema sinistra dello schermo e scegliere il modello di analisi Lyra Direct SARS-CoV-2_465-510 or Lyra Direct SARS-CoV-2_610-670 dalla **Analysis Templates Folder** (Cartella modelli analisi)
 - e. Selezionare sì nella finestra popup
16. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 5)

Istruzioni per la programmazione di Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro

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

Istruzioni per la programmazione del ciclo di analisi con Thermo Fisher QS7:

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

- d. Fare clic sull'icona della fotocamera al Passaggio 2. Compare una finestra che chiede di confermare se disabilitare la raccolta dati durante questo passaggio. Fare clic su OK.
 - v. In fondo alla Fase 4 PCR, modificare il numero di cicli a 10
 - vi. Fase 5 PCR
 - 1. Passaggio 1:
 - a. tasso di rampa 2,63
 - b. 92 °C
 - c. 5 secondi
 - 2. Passaggio 2:
 - a. tasso di rampa 2,32
 - b. 57 °C
 - c. 40 secondi
 - d. Assicurarsi che l'immagine dell'icona della fotocamera sia evidenziata/attivata per la raccolta dati durante i 30 cicli della Fase 5, Passaggio 2.
 - vii. In fondo alla Fase 4 PCR, modificare il numero di cicli a 30
 - h. Scorrere verso l'alto e scegliere la scheda "Plate Setup" (Configurazione piastra) nella parte superiore dello schermo.
- 6. Configurazione piastra
 - a. Modificare Passive Reference (Riferimento passivo) su "NONE" (NESSUNO)
 - b. Sul lato inferiore destro dello schermo, assicurarsi che sia stata selezionata la scheda Target, quindi evidenziare e premere il pulsante di addizione per aggiungere "Target 1". Premere nuovamente per aggiungere "Target 2".
 - c. Fare clic sulla casella "Target 1" e modificare il nome a CoV-2.
 - d. Fare clic sulla casella reporter associata sotto alla scheda Reporter e scegliere FAM dal menu a discesa.
 - e. Fare clic sulla casella "Target 2" e modificare il nome in PRC.
 - f. Fare clic sulla casella reporter associata sotto alla scheda Reporter e scegliere CY5 dal menu a discesa.
 - g. Evidenziare il pulsante "Actions" (Azioni) situato sul lato superiore destro dello schermo e premere il pulsante a discesa. Nel menu a discesa, scegliere "Analysis Setting" (Impostazione analisi)
 - h. In Analysis Setting (Impostazione analisi), disabilitare le seguenti opzioni per tutti i target:
 - i. Use Default Column (Usa colonna predefinita)
 - ii. Auto Threshold Column (Colonna soglia automatica)
 - iii. Auto Baseline Column (Colonna basale automatico)
 - iv. Baseline Start (Avvio basale) e Baseline End (Termine basale) dovrebbero visualizzare i valori predefiniti 3 e 15
 - i. In "Threshold" (Soglia), fare clic sulla casella associata al target CoV e immettere 40000.
 - j. In "Threshold" (Soglia), fare clic sulla casella associata al target PRC e immettere 10000.
 - k. Fare clic su "Save" (Salva).
 - l. Ritornare al pulsante "Actions" (Azioni) e premere il pulsante a discesa, scegliendo "Save As" (Salva con nome). Ciò consente di salvare il modello in un percorso di propria scelta. Salvare il modello come "Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay".

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

Nota: le presenti istruzioni sono rivolte agli utenti che non hanno lo strumento QuantStudio 7 Real-Time PCR e il software ABI Design and Analysis 2.4 connessi. L'utente deve aprire il modello Lyra Direct SARS CoV-2 creato in precedenza con il software, salvare eventuali nuovi modelli di analisi campioni su un supporto USB e trasferire il modello nello strumento.

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

1. Aprire il modello Lyra Direct SARS CoV-2 Assay generato in precedenza.
2. Fare clic sulla Plate Setup Tab (Scheda configurazione piastra) situata nella parte superiore dello schermo.
3. Sul lato destro dello schermo, assicurarsi che la scheda "Samples" (Campioni) sia evidenziata e premere il pulsante di addizione per aggiungere il numero di campioni da analizzare.

4. Fare clic sulla casella "Sample 1" (Campione 1) per rinominare il campione. Ripetere questo passaggio per tutti gli altri campioni che verranno immessi.
5. Fare clic sul pozzetto situato nella mappa della piastra, quindi selezionare la casella accanto al nome del campione nella barra laterale destra per associare il nome al pozzetto.
 - a. L'utente ha anche la possibilità di evidenziare la posizione del pozzetto sulla mappa della piastra e di fare clic sulla casella "Enter sample" (Inserisci campione). Immettere l'ID del campione e premere TAB per passare al pozzetto successivo sulla mappa della piastra. In tal modo, il nome del campione viene automaticamente caricato nella barra laterale.
6. Dopo aver immesso i nomi dei campioni, è possibile evidenziare i pozzetti facendo clic con il tasto sinistro del mouse sul pozzetto iniziale e trascinando il mouse sui pozzetti associati nel ciclo. Per scegliere i target, fare clic sulle caselle di controllo accanto a ciascun target sulla barra laterale.
7. Fare clic sul pulsante Actions (Azioni) sulla parte superiore destra dello schermo e scegliere "Save As" (Salva con nome) nel menu a discesa.
 - a. Viene visualizzata una finestra popup che richiede all'utente di assegnare un nome al file sulla base delle informazioni relative al ciclo di analisi del campione e alla posizione del file da salvare.
 - b. Salvare il file del ciclo di analisi con il nuovo nome (.edt) in un supporto USB inserito nel computer.
8. Trasferire il supporto USB nella porta sulla parte anteriore dello strumento.
9. Tra le opzioni visualizzate sullo schermo dello strumento, premere "Load plate file" (Carica file piastra). QuantStudio 7 è un dispositivo con touchscreen.
10. Sullo schermo "Run Queue" (Coda ciclo), premere "USB drive" (Drive USB) sulla destra. Verranno visualizzati tutti gli eventuali file piastra salvati sul supporto USB.
11. Premere il file piastra associato al ciclo da eseguire.
12. Viene visualizzata una nuova finestra che richiede la posizione dei risultati al termine del ciclo.
 - a. Premere "USB drive Connected" (Drive USB connesso) se l'icona non è già evidenziata e premere "Done" (Fatto).
13. Centrifugare la piastra campioni a 96 pozzetti per assicurare che tutto il liquido si trovi verso il fondo di ciascun pozzetto.
 - a. Assicurarsi che la centrifuga sia ben equilibrata.
 - b. Estrarre delicatamente la piastra dalla centrifuga per assicurarsi che tutti i liquidi restino sul fondo dei pozzetti.
14. Premere l'icona con doppia freccia situata nell'angolo superiore destro dello schermo dello strumento.
 - a. Il cassetto dello strumento si apre sul davanti.
15. Collocare la piastra centrifugata sul portapiastre accertandosi che l'orientamento della piastra sia corretto.
 - a. Il pozzetto A1 deve trovarsi nell'angolo superiore sinistro.
 - b. La piastra apparirà leggermente sospesa sul blocco a causa di due strisce in silicone situate sopra e sotto la piastra. Ciò è normale, e il coperchio dello strumento schiaccerà la piastra verso il basso dopo aver chiuso il cassetto.
16. Premere "Start Run" (Avvia ciclo) sullo schermo dello strumento.
 - a. Comparirà una finestra popup che richiede all'utente di confermare che la piastra sia stata caricata.
 - b. In caso affermativo, premere nuovamente "Start Run" (Avvia ciclo), oppure premere "Open Drawer" (Apri cassetto) per collocare la piastra nel blocco, quindi premere "Start Run" (Avvia ciclo).
17. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 5)



M124 – Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay kit



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germania



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

PIM124100IT00 (10/20)

GLOSSARIO

REF

Numero di catalogo



Marchio di conformità CE

EC REP

Rappresentante autorizzato nella
Comunità Europea

LOT

Codice lotto



Da utilizzarsi entro



Produttore



Limiti di temperatura



Uso previsto

R_x ONLY

Soggetto a prescrizione medica



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



Rischi biologici

IVD

Per uso diagnostico *in vitro*



Contiene materiale sufficiente per
96 determinazioni

CONT

Contenuto/Contiene

CONTROL

Controllo
